

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 السديق بن يحيى - جيجل

جامعة محمد السديق بن يحيى

كلية علوم الطبيعة والحياة

المكتبة

رقم الجرد : 2.4.16.....

Université Med-Seddik Benyahia-Jijel

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



كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم علوم المحيط و العلوم الفلاحية

## Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : Master 2 Académique en Biologie

Option : Phytopharmacie et gestion des agrosystèmes

### Thème



Contribution à l'étude phytochimique de  
deux lichens du Parc National de Taza et  
évaluation de leurs activités biologiques.

Jury de soutenance :

Président : M<sup>me</sup> : BENTERROUCHE I

Examineur : M<sup>me</sup> : LEMZERI H

Encadreur : M<sup>me</sup> : SALEM S.

Présenté par :

BOUMEDJIREK Yasmina

DEGHBAR Fatima Zohra

Session (Juin 2016)

Numéro d'ordre :..... /.....

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



## *Remerciements*

*En premier lieu, nous tenons à remercier notre DIEU, notre créateur le tout puissant, pour nous avoir donnée la force pour accomplir ce travail.*

*Nous remercions notre honorable encadreur, M<sup>me</sup> Salem S. pour sa précieuse aide, ses conseils et sa totale disponibilité*

*Nos vif remerciements s'adressent à tous les enseignant qui on participé de près ou de loin à notre formation, ainsi qu'au personnel du laboratoire d'ecotoxicologie*

- ✓ Nous remercions également M<sup>me</sup> Benterrouche I. d'avoir accepté de présider le jury et juger notre travail ainsi que M<sup>me</sup> Lemzeri H. d'avoir accepté de l'examiner aussi.*
- ✓ Aux personnels de la bibliothèque centrale el la faculté des sciences.*
- ✓ Nous derniers remerciements et ce ne sont pas moindres, vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour réaliser ce travail.*

*Yasmina et Fatima.Z*



## *Dédicace*

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

*Que je dédie :*

*A Ma très chère mère ; Source de l'amour et d'affection.*

*A Mon père pour son soutien durant mes années d'étude*

*A Mes frères : Samir, Mohammed, Haroune, Yassin, Ismail.*

*A Mes sœurs : Yamina, Fatima, Hayat*

*A tous mes chères amies: Fatima Zohra.*

*A Mes camarades de promotion*

*A Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce  
mémoire.*

*Yasmina*



## *Dédicace*

*Je remercie tout d'abord ALLAH le tout puissant de m'avoir donné la  
santé*

*la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.*

*Que je dédie :*

*A Ma très chère mère ; Source de l'amour et d'affection.*

*A Mon père pour son soutien durant mes années d'étude.*

*A Mes frères : Salah, Massoud, Menir.*

*A Mes sœurs : Basma, Razika Et Leur Enfants (Amin, Iman).*

*A ma famille : Deghbar et Dridi et surtout Mes oncles et Mes tantes.*

*A tous mes chères amies: Ratiba, Marwa, Soumia, Samira, Yasmina,  
Rafika, Leila, Iman, Amel.*

*A Mes camarades de promotion.*

*A Tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce  
mémoire.*

*Fatima Zohra*

The word "Sommaire" is centered on the page and enclosed within two large, orange, stylized brackets that curve inward from the left and right sides.

# *Sommaire*

# Sommaire

Liste des figures .....	i
Liste des tableaux.....	iii
Liste des abréviations.....	iv
Introduction .....	1

## Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Présentation des lichens

I.1. Définition .....	2
I.2. La symbiose lichéniques.....	2
I.2.1. Identité des partenaire lichénique .....	2
I.2.1.1. Photobiontes.....	2
I.2.1.2. Mycobiontes .....	3
I.3. La morphologie et l'anatomie de lichen .....	3
I.3.1. La morphologie .....	3
I.3.2. Anatomie.....	5
I.4. Echanges nutritionnels entre les partenaires .....	6
I.5. Le développement et la croissance .....	6
I.6. La reproduction des lichens.....	7
I.6.1. La Reproduction sexuée .....	7
I.6.2. La reproduction asexuée.....	7
I.7. Écologie des lichens.....	7
I.8. Utilisation des lichens .....	8
I.9. Bioindication lichénique .....	9

### Chapitre II : Les métabolites des lichens

II.1. Les métabolismes des lichens.....	10
II.1.1. Les métabolites Primaire .....	10
II.1.2. Les métabolites secondaires .....	10
II.1.3. La nature de substances lichénique.....	10
II.1.4. Les principales catégories des métabolites secondaires.....	11
II.1.4. 1. Les alcaloïdes .....	11
II.1.4.2. Les terpénoïdes .....	11
II.1.4.3. Les polyphénols .....	11
II.1.4.3.1. Les acides phénoliques.....	12
II.1.4.3.2. Les flavonoïdes.....	12
II.1.4.3.3. Les tanins.....	12
II.1.4.3.4. Les lignines.....	13
II.1.5. Propriétés des composés phénoliques .....	13
II.1.6. Voies de biogenèse des métabolites secondaires .....	13
II.1.6.1. La voie de l'acide shikimique .....	14
II.1.6.2. Voie acétate-malonate.....	14
II.1.6.3. Voie d'acide mévalonique.....	14
II.1.7. Rôle des substances lichéniques .....	15
II.1.8. La bioactivité des substances lichéniques .....	15
II.2. Les activités biologiques des lichens.....	16
II.2.1. L'activité antioxydants des lichens.....	16
II.2.1.1. Les antioxydants.....	16
II.2.1.2. Stress oxydant.....	16
II.2.1.3. Les radicaux libres.....	16
II.2.1.4. Nature des radicaux libres.....	16



II.2.1.5. Caractéristiques des antioxydants.....	17
II.2.1.6. Les types des antioxydants.....	17
II.2.1.6.1. Les antioxydants primaires ou radicalaires ou vra..is .....	17
II.2.1.6.2. Les antioxydants secondaires ou préventifs .....	18
II.2.1.7. Les systèmes antioxydants.....	18
II.2.1.7.1. Systèmes antioxydants enzymatiques.....	18
II.2.1.7.2. Système non enzymatique.....	18
II.2.1.8. Les sources des antioxydants .....	18
II.2.1.9. Mécanismes d'action des antioxydants.....	19
II.2.2. L'activité antimicrobienne .....	19
II.2.2.1. Les mécanismes d'action antimicrobienne des lichens.....	19

### Partie expérimentale

#### Chapitre III : Matérielles et Méthodes

III.1. Objectif .....	20
III.2. Présentation du site d'échantillonnage.....	20
III.2.1. Localisation du PNT .....	20
III.2.2. Biodiversité du Parc National de Taza .....	21
III.3. Méthodologies .....	21
III.3.1. Récolte et choix des espèces .....	21
III.4. Position systématique des deux lichens étudiés .....	22
III.5. Description des espèces.....	22
III.6. Préparation du matériel végétal (lichens) .....	23
III.7. Préparation des extraits des thalles lichéniques .....	24
III.8. Etude phytochimique .....	24

III.8.1. Analyse qualitative .....	24
III.8.2. Analyse quantitative .....	25
III.9. Evaluation de la bioactivité.....	27
III.9.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	27
III.9.1.1. Activité antiradicalaire contre le DPPH•.....	27
III.9.1.2. Pouvoir réducteur : (réduction de fer « FRAP »).....	29
III.9.2. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	30
III.10. Analyse statistique.....	31

## Chapitre IV : Résultats et Interprétation

IV.1. Le rendement d'extraction.....	32
IV.2. Etude phytochimique.....	32
IV.2.1. Analyse qualitative (screening phytochimique) .....	32
IV.2.2. Analyse quantitative.....	33
IV.3. L'activité antioxydant.....	36
IV.3.1. Pouvoir réducteur.....	36
IV.3.2. Activité antiradicalaire contre le DPPH•.....	37
IV.3.3. Calcul des IC50.....	39
IV.4. L'activité antibactérienne.....	40

## Chapitre V: Discussion

V. Discussion.....	44
Conclusion .....	46
Références bibliographiques .....	48
Annexes	

## Liste des figures

<b>Figures</b>	<b>Titre des figures</b>	<b>Page</b>
<b>Figure 01</b>	Principaux types de thalles lichéniques	5
<b>Figure 02</b>	Echanges nutritionnels entre les partenaires lichéniques	6
<b>Figure 03</b>	les isidies et les soralies	7
<b>Figure 04</b>	Structure chimique d'Acide usnique	10
<b>Figure 05</b>	Le phénol le plus simple des composés phénoliques	11
<b>Figure 06</b>	Structure de base des flavonoïdes	12
<b>Figure 07</b>	Voies de biogenèse des métabolites secondaires des lichéniques	14
<b>Figure 08</b>	Localisation du Parc National de Taza Plan de gestion (P N T, 2014)	20
<b>Figure 09</b>	Site de récolte (Forêt de Guerrouch)	21
<b>Figure 10</b>	Teneurs des phénols totaux dans les extraits méthanoliques des espèces étudiées	33
<b>Figure 11</b>	teneur des flavonoïdes dans les extraits méthanoliques des espèces de lichen étudiée.	34
<b>Figure 12</b>	teneur des tannins condensés dans les extraits méthanoliques des espèces de lichen étudiée.	35
<b>Figure 13</b>	Pouvoir réducteur des extraits lichéniques	36
<b>Figure 14</b>	pourcentages d'inhibitions contre le radical DPPH*	38
<b>Figure 15</b>	valeurs de l'IC50 de nos échantillons	39
<b>Photo 1</b>	<i>Parmelia perlata.</i>	22
<b>photo 2</b>	<i>Parmelia caperata</i>	23

## List des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre des tableaux</b>	<b>page</b>
Tableau 01	Rendement d'extraction méthanolique des deux espèces étudiées.	32
Tableau 02	Résultats des tests phytochimiques.	32
Tableau 03	Teneur en phénols totaux des extraits méthanolique.	33
Tableau 04	Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques.	34
Tableau 05	Teneur en tannins condensés des deux extraits méthanoliques.	35
Tableau 06	Variations des absorbances des deux lichens, <i>P.perlata</i> et <i>P.caperata</i> .	36
Tableau 07	Pourcentages d'inhibitions des deux extraits contre le radical DPPH*.	38
Tableau 08	Effet de méthanol sur l'activité antibactérienne (contrôle négatif).	40
Tableau 09	Effet de l'extrait méthanolique sur <i>Bacillus cereus</i> .	40
Tableau 10	Effet des deux extraits méthanolique sur <i>Listeria monocytogenes</i> .	41
Tableau 11	Effet de l'extrait méthanolique des deux espèces sur <i>Salmonella Spp.</i>	42
Tableau 12	Effet de l'extrait méthanolique sur <i>Entérocooccus faecalis</i> .	43

Abréviation

[ ] : Concentration

$\mu\text{g}$  : microgramme

/ : Pas d'inhibition

% : pourcentage

$1/2\text{O}_2$  : l'oxygène singulet

Abc : absorbance

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

ATCC : Américan type culture collection

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

$\text{CO}_2$  : dioxyde de carbone

DPPH : 2,2-Diphényle-1-picrylhydrazyl

EB : Extrait Brute

ERO : Espèces réactives dérivée de l'oxygène

$\text{FeCl}_3$  : Trichloro acétique

g : gramme

GPx : la glutathion peroxydase

$\text{H}_2\text{O}$  : eau

$\text{H}_2\text{O}_2$  : peroxyde d'hydrogène

HCl : Acide chlorhydrique

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

ml : millilitre

Moy : moyenne

nm : Nanomètre



**NO•** : monoxyde d'azote

**NS** : non significative

**O<sub>2</sub>** : oxygène

**O<sub>2</sub>•** : radical superoxyde

**OH•** : radical hydroxyl

**ONOO<sup>-</sup>** : peroxy nitrite

**PNT** : Parc national de TaZa

**RL** : radical libre

**ROS** : espèces réactives de l'oxygène

**SOD** : Superoxyde Dismutase

**TCA** : Acide Trichloracétique



*Introduction*

## Introduction

Dans le cadre de la recherche de nouveaux produits bioactifs d'origine naturelle, les lichens font l'objet d'étude de nombreuses équipes de recherche dans le monde (Fabian *et al.*, 2005).

Les lichens sont des organismes symbiotiques, généralement composés d'un partenaire fongique, et un ou plusieurs partenaires photosynthétiques, Bien que la nature double des lichens est maintenant largement reconnues (Zambare et christopher, 2012).

L'une de ses caractéristiques reconnaissables est leur production de divers métabolites, « substances lichéniques » qui peuvent être classées en deux groupes, substances aliphatiques et substances aromatiques, organisées en plusieurs classes des produit chimique distinct tel que les depsides, les depsidones, les dibenzofurans, et les xanthones (Kosanicet *al.*, 2013). Les lichens ont été utilisés depuis l'antiquité dans des divers domaines (pharmacologie, parfumerie, industrie, nourriture et en médecine comme plantes médicinales) (Ozenda, 2000).

Le métabolisme des lichens présente quelques caractères particuliers par rapport à celui des autres plantes, Les lichens élaborent de nombreux métabolites secondaires. Les acides lichéniques appelés aussi « substances lichéniques ».

Actuellement l'usage des lichens en médecine est basé sur le fait qu' ils contiennent ces molécules qui sont uniques dans la nature et biologiquement actifs, présentant un potentiel antimicrobien, antifongique, antiviral, antioxydant et anti-inflammatoire (Jeon *et al.*, 2009).

La diversité lichénique du Parc National de Taza est estimée par 60 espèces, dont la dominance de la famille des Parmeliacées, représentée par un seul genre *Parmelia*, qui compte 12 espèces *Parmelia borrieri* (Sm) Turner., *Parmelia caperata* (L.) Ach., *Parmelia loxodes* Nyl., *Parmelia perlata* (Huds.) Vain., *Parmelia quercina* (Willd.) Vain., *Parmelia reticulata* Taylor., *Parmelia saxatilis* (L.) Ach., *Parmelia Soredians* Nyl., *Parmelia subrudecta* Nyl., *Parmelia sulcata* Tylor., *Parmelia tiliacea* (Hoffm.) Achet *Parmelia sp.*, (Salem,2013).

Ce travail porte principalement sur l'étude phytochimique de deux lichens du genre *Parmelia*, son objectif vise à :

- Démontrer la richesse des lichens *Parmelia perlata* et *Parmelia caperata* en composés phénoliques par la quantification leur teneur en phénol totaux, flavonoïdes, et en tannins.
- Evaluer l'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait méthanolique de ces deux lichens.



*Synthèse*  
*Bibliographique*

*Chapitre I :*  
*Présentation des*  
*lichens*

## I. 1. Définition

Les lichens sont par définition des organismes symbiotiques, habituellement composés d'un partenaire fongique (le mycobionte), et un partenaire photosynthétique ou plus (le photobionte), qui est plus souvent une algue verte ou cyanobactérie. Bien que la nature double de la plupart des lichens soit maintenant largement reconnue, il est su communément que quelques lichens sont des symbioses impliquent trois ou plus de partenaires lichens tripartites (Nash, 2008).

Les lichens peuvent coloniser tous les milieux même les plus hostiles. D'ailleurs c'est là l'une des performances de la symbiose mycobionte-photobionte que de rendre le lichen cosmopolite. Ce qui n'est aucunement le cas de ses 2 constituants vivant indépendamment (Boullard, 1997).

## I. 2. Symbiose lichéniques

La symbiose est la forme la plus évoluée des interactions positives entre espèces et représente le type du mutualisme le plus achevé. Elle tient en un phénomène d'association obligatoire, donc permanente, entre les organismes qui la pratiquent (Ramade, 2008). Donc une symbiose est considérée généralement comme étant une association trophique de deux organismes dans laquelle les deux partenaires trouvent un bénéfice réciproque, De ce fait la symbiose lichénique représente un équilibre très sensible (Jahns, 1989).

### I.2.1. Identité des Partenaires lichéniques

#### I.2.1.1. Photobiontes

Phycobionte ou algue, le terme est commode mais ne recouvre pas totalement la réalité. En effet, s'il s'agit souvent d'algues véritables ou des chlorophycées, on trouve également des cyanophycées (appelée autrefois « algue bleues »), ce sont des procaryotes, dépourvus de vrai noyau cellulaire, c'est-à-dire des organismes beaucoup plus voisins des bactéries que des algues qui, elles sont, des eucaryotes (Durrieu, 1993). On peut distinguer 03 classes auxquelles appartient cet associé chlorophyllien ou algue :

Pour 90 % d'entre elles, appartient à la classe des chlorophycées, ou algue verte cette classe regroupe des *chlorococcacées*, les plus fréquentes avec le genre *Trebouxia* présent dans 50 % à 70 % des lichens, puis les *Trentepohliales* avec le genre *Trentepohlia*, le plus fréquent. La plus part des chlorophycées possèdent des cellules à noyau avec un chloroplaste de couleur verte, et des grains

d'amidon. Les *Trentpohlia* n'ont pas de grains d'amidon mais des gouttelettes lipidiques de carotène orange on les appelle souvent algues orange.

La seconde classe à laquelle appartiennent 10 % des algues des lichens est celles des cyanophytes (cyanobactéries) ou algue bleue. Dans cette classe, chez les *Nostocales*, le genre *Nostoc* est le plus commun. Elles se caractérisent, au niveau cellulaire par une absence de noyau, les cellules forment des chapelets, elles ont une coloration bleu vert due à la présence de chlorophylle (verte) et de phycocyanine (bleue) (Tiévant, 2001).

### **I.2.1.2. Mycobiontes**

Il s'agit essentiellement de différents groupes d'ascomycètes (Septomycètes, Discomycètes et Pyrénomycètes), ainsi que, dans quelques cas, de basidiomycètes (exemple : *omphalina*) ou d'un phycomycète (exemple de géosiphon) (Jahns, 1989). Dans l'immense majorité des cas (98 %) le mycobionte est un Ascomycète, très rare, respectivement 1,6 et 0,4 % sont les basidiomycètes ou les phycomycètes) (Boullard, 1997).

Mais à la différence des algues, ces champignons ne sont pas connus à l'état libre. Il s'agit soit des discomycètes à fructification en apothécies plus ou moins étalées, soit de Pyrénomycètes à fructifications closes (périthèces) (Durrieu, 1993).

## **I.3. La morphologie et l'anatomie de lichen**

### **I.3.1. La morphologie**

Les lichens sont des thallophytes. Leur appareil végétatif est un thalle ne représentent ni feuilles, ni tiges, ni racines, ni appareil conducteur et portant les organes de reproduction (Ozenda, 2000).

Selon la morphologie du thalle on peut distinguer 7 types de lichens.

#### **I.3.1.1. Lichens à Thalles crustacés**

Non séparable aux substrats, du moins sous forme de fragment important car très adhérents à celui-ci et même inclus dans ce dernier, exemples *Caloplaca*, *Aspicilia* ( Clauzade et Roux, 1987 )

### I.3.1.2. Lichens à Thalles fruticuleux

Jamais appliqués sur le substrat, mais n'adhérant à celui-ci que par une surface réduite, jouant le rôle de moyen de fixation, de crampon, ils sont dressés, pendants, ou étalés, exemples : *Ramalina*, *Evermia* (Clauzade et Roux, 1987)

### I.3.1.3. lichens à Thalle gélatineux

Sont noirâtres, rigides et opaques quand ils sont secs.ils gonflent en masses gélatineuses sombres mais translucides sous l'influence de l'humidité, exemple : *Collema*, *Leptogium* (Laberche, 2010).

### I.3.1.4. lichens à Thalle foliacés

Ils forment des lames plus ou moins divisées en lobes appliqués au support qui les porte.ils sont fixés par des crampons, exemples : *Parmelia Lobaria* (Laberche, 2010).

### I.3.1.5. lichens à Thalle lépreux

Thalles lépreux (pulvérulents ou granulo-pulvérulents), formés de petits granules (0,1 - 0,2 mm) avec surface non lisse, isolés ou juxtaposés en groupes, exemple : *Lepraria* (Clauzade et Roux, 1987)

### I.3.1.6. lichens à Thalle Squamuleux

Sont formés de compartiments (squamules) à face supérieure plane ou concave, dispersés ou rapprochés ou contigus ou même imbriqués, avec bord non adhérent au substrat, exemples : *Normandina*, *Squamarina* (Laberche, 2010).

### I.3.1.7.lichens à Thalle complexes

Ils sont formés de deux parties bien distinctes :

- Thalle primaire, crustacé, squamuleux ou plus rarement foliacé, plus ou moins étalé sur le substrat.
- Thalle secondaire, fruticuleux, formé d'éléments se développant plus ou moins perpendiculairement au substrat, exemple : *Cladonia*, *Stereocaulon* (Clauzade et Roux, 1987)



**Figure 01 :** Principaux types de thalles lichéniques (Franck *et al.*, 2001 ; Bellenfant *et al.*., 2010).

### I.3.2. Anatomie

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, et on peut distinguer deux catégories fondamentales de structures.

#### I.3.1. Structure homéomère

Les gonidies ou cellules de l'algue isolées ou formant des couronnes sont mélangée aux hyphes du champignon dans toute l'épaisseur du thalle. Néanmoins, on peut y observer une limite corticale supérieure et une limite inférieure (Amirouche *et al.*, 2009).

#### I.3.2. Structure hétéromère

Le thalle est limité par le cortex supérieur et le cortex inférieur. Les gonidies et les hyphes sont répartis en couches superposées ou concentriques La couche gonidiale, La médulle (hyphes), Le cortex inférieur peut présenter des filaments destinés à la fixation Ce sont des rhizines (Amirouche *et al.*, 2009).

#### I. 4. Echanges nutritionnels entre les partenaires

Il existe des relations anatomiques entre l'algue et le champignon. En autre termes, ces contacts s'établissent entre un producteur (l'algue ou la cyanobactérie autotrophe) et un consommateur (le champignon hétérotrophe) (Van Haluwyn et Lerond, 1993).

Le champignon grâce au feutrage de ses filaments, fournir un support à l'algue et évite sa déshydratation, l'algue assure l'alimentation carbonée de l'ensemble par ces pigment assimilateur (Guignard, 1983).

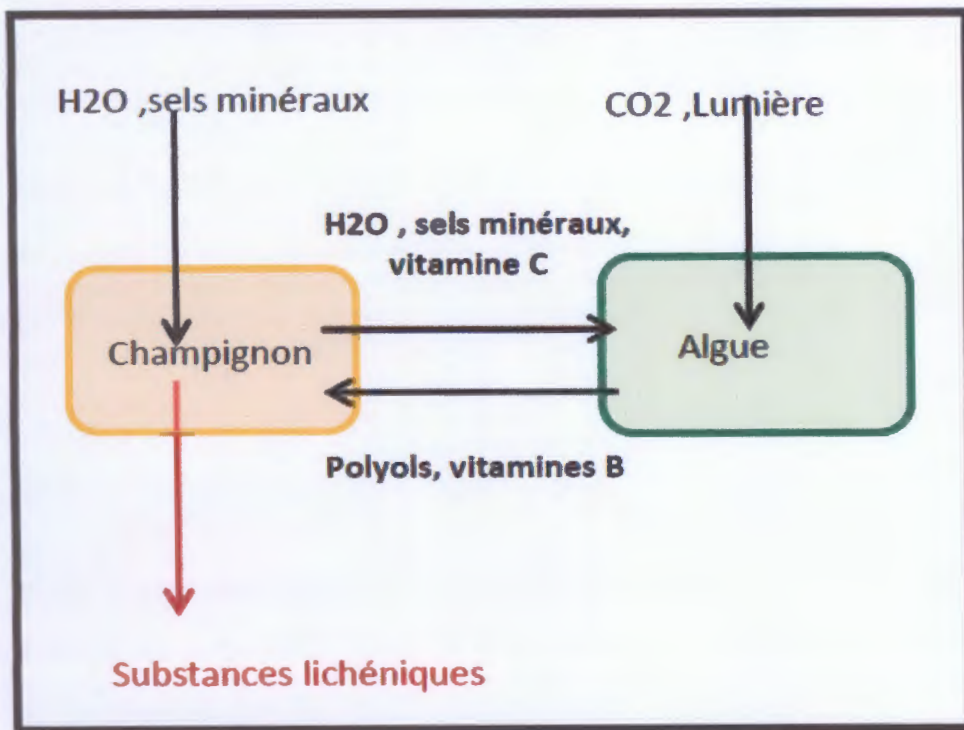


Figure 02 : Echanges nutritionnels entre les partenaires lichéniques (Sélosse, 2000).

#### I.5. Développement et la croissance

La croissance des lichens est extrêmement lente, leur rayon s'accroissant à des vitesses qui vont de 0,1 à 10 millimètres par an (Raven *et al.*, 2007). Ce chiffre peut varier selon les années humides ou les années sèches et a tendance à baisser avec l'âge. Les lichens à croissance lente sont ceux qui vivent le plus long temps, ils peuvent vivre plusieurs centaines d'années (Bellenfant *et al.*, 2010).

## I.6. Reproduction des lichens

La reproduction des lichens se fait par deux modes différents :

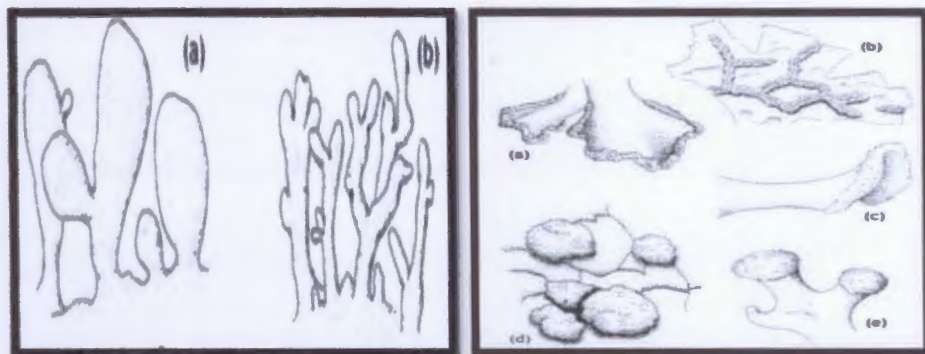
### I.6.1. Reproduction sexuée

La reproduction sexuée se déroule en deux phases :

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

### I.6.2. Reproduction asexuée

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



a. Les isidies

b. les soralies

Figure 03 : les isidies et les soralies (Sérusiaux *et al.*, 2004).

## I.7. Écologique des lichens

Les lichens peuvent coloniser. Comme plante pionnières des milieux où les conditions sont extrêmes étant donné leur forte tolérance à la déshydratation, au froid et à la chaleur, bien que les lichens soient résistants à des conditions externes particulières telles que la sécheresse et des températures extrêmes (Lüttge *et al.*, 1996).



On fonction de la nature du substrat on peut distinguer :

- Les lichens saxicoles : vivent sur les rochers et les pierres dominant.
- Les lichens corticoles : s'installent sur les troncs et les branches c'est là que l'on trouvera les grands lichens foliacés.
- Les lichens terricoles : vivent sur le sol nu. Parmi les plus fréquents on trouve divers. *cladonia* en haute montagne on rencontre souvent sur les sols acides.
- Les lichensfoliicoles : peu d'espèces colonisent les feuilles des arbres de nos climats. (Durrieu, 1993).

## I.8. utilisation des lichens

### I.8.1. En écologie

Ce sont de puissants bio-concentrateurs du fait de leur aptitude à prélever les contaminants présents dans l'air .en effet, ces organismes possèdent une écophysiologie particulière, liée à leur inféodation à des supports inertes ou très pauvres en éléments minéraux nutritifs disponibles (rochers, troncs d'arbres par exemple) (Ramade ,1993).

- Les lichens réagissent aux pluies acides et absorbent facilement des particules polluantes émises par les voitures et les usines.
- certaines espèces de lichens sont indicatrices de la présence de certains métaux dans les roches et les sols (Nabors, 2008).
- Les lichens fixent le sol après sa formation et permettent ainsi le développement d'une succession de plantes, les lichens peuvent ainsi fixer l'azote dans le sol (Raven *et al.*, 2007).

### I.8.2. lichens et médecine

Des lichens ont été appliqués largement dans la médecine folklorique pour traitement des diverses maladies, telles que l'eczéma, les maladies respiratoires, les maladies pulmonaires et arthrite ( Jayanthi *et al.*, 2012). Maladies de cœur, bronchite, lèpre, inflammations d'asthme, troubles d'estomac, etc.(Shrestha et clair,2013).

### I.8.3. lichens et alimentation

Un petit nombre d'espèces seulement sont utilisées dans la pratique, elles doivent leur pouvoir nutritif à la lichénine, susceptible de libérer par hydrolyse du glucose au cours de la digestion.

Dans l'alimentation humaine, seul *Certraria islandicadit* « Mousse d'Islande », a été utilisé autrefois d'une manière assez régulière, dans les pays nordiques, sous forme de farine.

*Certraria islandica*, ont été utilisés dans les pays nordiques à la nourriture des Porcs, des Chevaux et des vache (Ozenda, 2000).

#### **I.8.4.lichens et industrie**

Il s'agit surtout de matières colorantes, ce sont ordinairement des substances du groupe des depsides, ne sont plus guère utilisés en raison de l'emploi de colorants synthétiques, l'alcool a été aussi préparé par hydrolyse de la lichénine.

*Evernia prunastri* : est la plus utilisé il est connu universellement sous le nom de « mousse de chêne » et donne les parfums à odeur de « chypre », d' « orient » ; de fougère », de « cuir de Russie » (Ozenda, 2000).

#### **I.9. Bioindication lichénique**

Les bioindicateurs sont des espèces ou groupes d'espèces qui, par leur présence et/ou leur abondance, sont significatifs d'une ou de plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie (Lagadic *et al.* , 2008).

Les lichens répondent aux variations de la composition atmosphérique et peuvent être un utile pour la surveillance de la qualité de l'environnement, les lichens ont également différents sensibilité aux polluants spécifiques, les espèces tolérantes peuvent persister dans l'environnement pollué, tandis que les espèces sensibles deviendraient disparues, La sensibilité à différents polluants varie selon les différentes espèces, et la réponse à divers polluants et les substrats peuvent varier même au sein d'une même espèce (Dalip *et al.*,2015), La sensibilité des lichens résulte de la capacité de thalle à retenir et accumuler les ions minéraux les symptômes se traduisent par un blocage de la photosynthèse ,une tendance à se séparer du support , des changement de coloration dus à la dénaturation des acides lichéniques la fertilité décroît elle aussi très rapidement (Durrieu, 1993).

*Chapitre II :*  
*Les métabolites des*  
*lichens*

## II.1. Les métabolites des lichens

Les lichens produisent deux types différents de métabolites ; les métabolites primaire et les secondaire :

### II.1.1. Les métabolites Primaire

Les métabolites primaires sont d'origine intracellulaires et sont synthétisés indépendamment par les deux partenaires les composés Primaire consiste principalement en chitine, lichénine, isolichénin hémicellulose, pectines, disaccharides, polyols, acides aminés, enzymes...etc. les métabolites primaires de lichen avoir des fonctions et des rôles structuraux dans le métabolisme cellulaire (Shrestha et Clair, 2013).

### II.1.2. Les métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits exclusivement par le partenaire fongique et sont exportés dehors les hyphes fongiques et déposé comme cristaux dans les différent parties du thalles, souvent dans le cortex supérieur, l'interaction métabolique entre le mycobionte et le photobionte est essentiel à la production de ces métabolites secondaires, les métabolites secondaires des lichens peuvent comporter jusqu'à 20 % de poids sec du thalle mais dans la plupart des lichens la quantité change de 5 à 10 % (Shrestha et Clair, 2013).

### II.1.3. Nature des substances lichéniques

La plupart des substances lichéniques sont les composés phénoliques ;dibenzofurans (par exemple acide usnique) (figure4), depsides (par exemple acide barbatic ), depsidones (par exemple acide salazinic) depsones (par exemple acide picrolichenique), lactones (par exemple acide protolichesterinique , acide nephrosterinic), quinones (par exemple parietin) et dérivés acides pulvinic (par exemple acide vulpinic) (Shukla *et al.*, 2014).

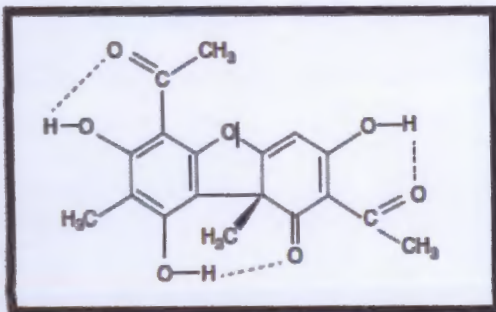


Figure 04 : Structure chimique d'Acide usnique (Shukla *et al.*, 2014).

## II.1.4. Les principales catégories des métabolites secondaires

### II.1.4.1. Les alcaloïdes

Le nom d'alcaloïde regroupe de nombreux composés azotés organiques à caractère basique. Les divers représentants de grandes différences dans leur structure. Chimique (Nultsch, 1998).

Ils dérivent de différents acides aminés ou de l'acide mévalonique en passant par différentes voies biosynthétiques (Judd *et al.*, 2002). Présentent des propriétés hydrophiles et alcalines (Meyer *et al.*, 2004).

### II.1.4.2. Les terpénoïdes

Appelés aussi terpènes, existent chez toutes les plantes et représentent de loin la plus vaste catégorie de métabolites secondaires, avec plus de 22000 composés décrits (Raven *et al.*, 2007). Ce sont des monomères ou des polymères, présentent des propriétés hydrophobes (Meyer *et al.*, 2004).

### II.1.4.3. Les polyphénols

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement l'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, ou hétéroside (Richter 1993 ; Bruneton 1999). Elles forment une grande famille de composés chimique très diverse depuis les simples acides phénoliques jusqu'aux grands polymères complexes que sont par exemple, les tanins et la lignine, en font également partie les flavonoïdes (Hopkins, 2003).

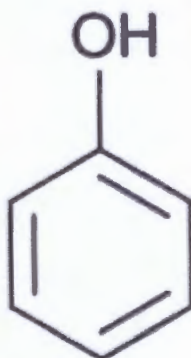


Figure 05 : Le phénol le plus simple des composés phénoliques (Bruneton ,1999).

phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide – l'acide éllagique (Guignard *et al.*, 2000).

#### **II.1.4.3.4. Les lignines**

Haut polymère organique de composition très complexe, à structure réticulée (Marouf, 2000). Les lignines sont les biopolymères les plus abondants après la cellulose, les lignines constituent un polymère amorphe et hydrophobe qui, en se déposant dans les parois cellulaires cellulosique leur confère une grande rigidité et résistance mécanique des plants (François *et al.*, 2009).

#### **II.1.5. Propriétés des composés phénoliques**

Parmi les antioxydants naturels ; les composés phénoliques, et plus particulièrement les acides phénoliques et les flavonoïdes, suscitent un intérêt grandissant. Ce sont des composés, naturels, qui permettent de ralentir le phénomène d'oxydation qui favorisent le vieillissement cellulaire en interrompant le passage du stress oxydatif et interceptant le « message » de l'apoptose (mort cellulaire programmé) (Macheix *et al.*, 2005).

#### **II.1.6. Voies de biogenèse des métabolites secondaires des lichens**

Les métabolites secondaires lichéniques peuvent être obtenus via trois voies de biogenèse, la majorité de ces composés est dérivée de la voie de l'acétate polymalonate ou polycétide synthase les autres métabolites secondaires sont issus des voies de l'acide shikimique et de l'acide mévalonique (Figure 6).

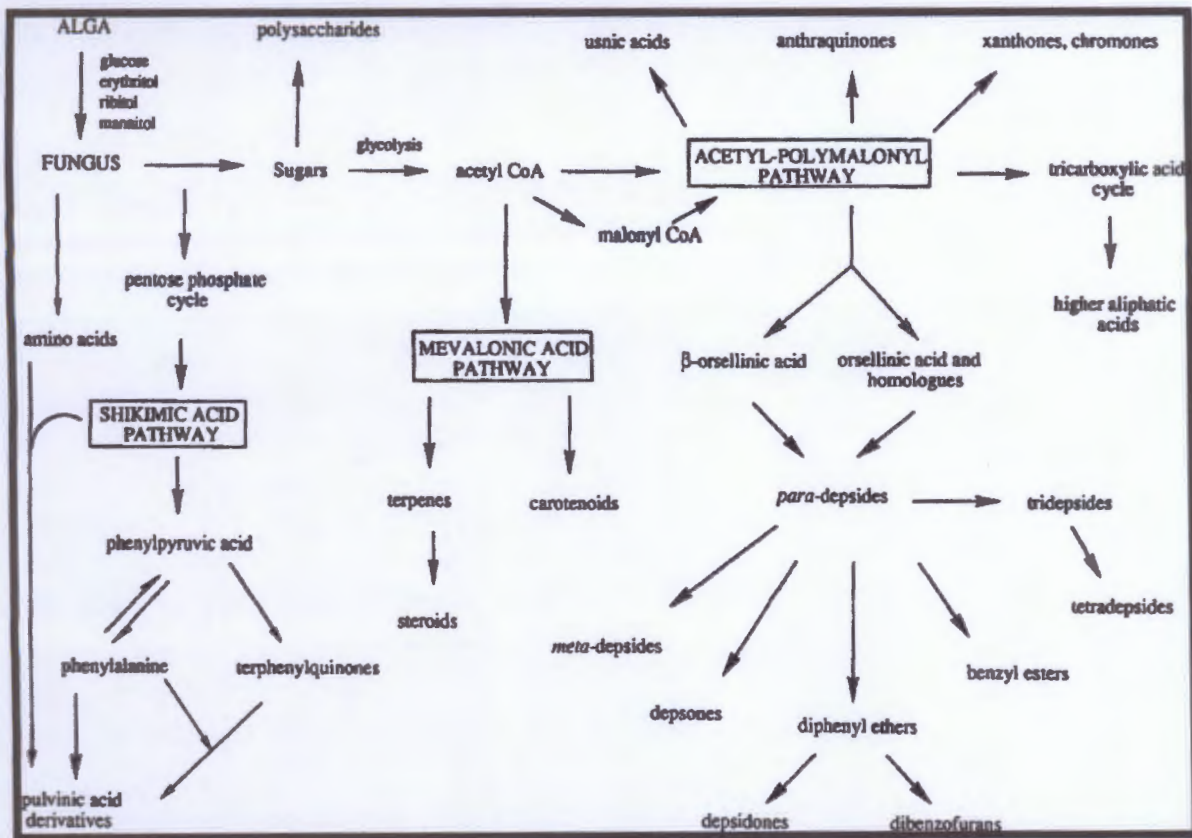


Figure 07: Voies de biogénéses des métabolites secondaires des lichens (Nash ,2008).

**II.1.6.1. La voie de l'acide shikimique**

Cette voie shikimate conduit à la formation des oses aux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénonnes, lignanes et lignines, coumarines (Bruneton, 1993).

**II.1.6.2. Voie acétate-malonate**

C'est la malonyl-CoA qui fournit, par décarboxylation, les unités en C2 pour allonger le complexe Acyle-CoA, comme dans la synthèse des acides gras (Richter, 1993), Cette voie acétate-malonate conduite à la formation de depsides, depsidones, dibenzofuranes (Veranja *et al.*, 2005).

### II.1.6.3. Voie d'acide mévalonique

Cette voie conduit à la formation de terpènes, stéroïdes, caroténoïdes, ceux-ci incluent des composés uniques aux lichens et à beaucoup qui se produisent à de plus hautes usines (Veranja *et al.*, 2005).

### II.1.7. Rôle des substances lichéniques

Selon (Ozenda et Clauzade, 1970) leurs rôles se résume dans :

-la protection contre les dégâts des animaux ; car certains lichens sont fortement toxiques et d'autres sont amères.

-la défense contre les organismes étrangers, certains lichens contiennent des antibiotiques et différentes substances lichéniques jouent un rôle d'inhibiteurs vis-à-vis des bactéries.

Ces substances produites uniquement chez les lichens, résultants de la symbiose jouent un rôle essentiel dans les mécanismes de défense contre les agressions extérieures, certains métabolites tels que les anthraquinones, pourraient agir comme pigments - en faible luminosité- de capter l'énergie solaire, ou à l'opposé de protéger l'organisme contre les effets nocifs générés par les radiations solaires (Nash, 2008).

### II.1.8. La bioactivité des substances lichéniques

Les lichens produisent des métabolites secondaires bioactifs (Vidyalakshi *et al.*, 2012), sont reconnus par leurs activités biologiques nombreuses qui comprennent des activités antimicrobienne, anti-inflammatoire, antioxydant, antiproliférative et cytotoxique (Boustie *et al.*, 2010).

Beaucoup des produits secondaires formés par les lichens sont désagréables et peut servir comme composés défensifs contre les herbivores aussi bien que décomposer (Nash, 2008).



## II.2. Les activités biologiques

### II.2.1. L'activité antioxydants des lichens

Les lichens sont une bonne source des antioxydants, la nature phénolique des métabolites secondaires est prévue à avoir les moyens des propriétés antioxydants. Les composés phénoliques de lichens jouent une fonction cruciale dans le règlement de la croissance et le développement du lichen en conditions climatiques stressantes et défavorables, il pourrait conclure que la nature antioxydante des lichens pourrait dépendre de leurs composés phénoliques.

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

#### II.2.1.1. Les antioxydants

Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ROS (reactive oxygen species). Notre organisme réagit donc de façon constante à cette production permanente de radicaux libres (Favier, 2003).

Au sens large un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Ladoh *et al.*, 2014).

#### II.2.1.2. Stress oxydant

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités Antioxydants de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (Pincemail *et al.*, 1999).

#### II.2.1.3. les radicaux libres

Un radical libre (RL) est une espèce chimique neutre ou chargée dont la couche périphérique contient un électron non couplé. Cet électron célibataire confère aux RL une certaine instabilité. La production de RL est permanente au sein de la matière vivante (Corinne, 2010).

#### II.2.1.4. Nature des radicaux libres

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène

proprement dit: radical superoxyde  $O_2^\bullet$ , radical hydroxyl  $OH^\bullet$ , monoxyde d'azote  $NO^\bullet$ , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante: l'oxygène singulet  $1/2O_2$ , peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , peroxyde d'azote  $ONOO^-$  (Favier, 2003).

- **Espèces réactives dérivée de l'oxygène (ERO)**

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon fonctionnement de l'organisme (Turrens et Alexandre, 1985).

- **Espèces libres non oxygénées**

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO).

Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs (Turrens et Alexandre, 1985).

### II.2.1.5. Caractéristiques des antioxydants

Un composé est considéré antioxydant *in vivo*, lorsqu'il requière les propriétés suivantes (Ursin et al, 1999).

- 1- il doit réagir avec les métabolites réactifs de l'oxygène qui sont biologiquement toxiques.
- 2- Le produit de la réaction de l'antioxydant avec l'oxydant ne doit pas être plus toxique pour l'organisme que le métabolite éliminé.
- 3- L'antioxydant potentiel doit être présent dans l'organisme en concentration suffisante.
- 4- La demi-vie de l'antioxydant doit être suffisamment longue pour réagir avec l'oxydant.

### II.2.1.6. Les types des antioxydants

#### II.2.1.6.1. Les antioxydants primaires ou radicalaires ou vrais

Qui permettent l'interruption de la chaîne autocatalytique :  $AH + R^\bullet \rightarrow A^\bullet + RH$ . La molécule AH est antioxydante si le radical formé  $A^\bullet$  est plus stable. La stabilité du radical  $A^\bullet$  peut s'expliquer par sa conversion en composés non radicalaires :  $A^\bullet + A^\bullet \rightarrow A-A$  ou  $A^\bullet + R^\bullet \rightarrow A-R$  (Rolland, 2004).

### II.2.1.6.2. Les antioxydants secondaires ou préventifs

Qui assurent l'inhibition de la production des radicaux libres. Ce sont des substances décomposant les hydro peroxydes en alcool, des thiols (glutathion, acides aminés soufrés) ou les disulfures, des protecteurs vis-à-vis des UV, comme les carotènes, des chélatants des métaux promoteurs d'oxydation type fer et cuivre, comme l'acide citrique et les lécithines) ou enfin de séquestrants d'oxygène comme l'acide ascorbique (Rolland, 2004).

### II.2.1.7. Les systèmes antioxydants

#### II.2.1.7.1. Système antioxydant enzymatique

Représentés principalement par trois enzymes; la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène conduisant à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Lehucher *et al*, 2001).

#### II.2.1.7.2. Système non enzymatique

Ces système antioxydants comportent des composés synthétise in vivo, tels que la bilirubine, les hormones sexuelles (œstrogènes), la mélatonine, l'acide lipoïque, la coenzyme Q, l'acide urique, les mélanines.. . etc. Et des composés apportés par l'alimentation, comme l'acide ascorbique (vitamine C), la vitamine E, les caroténoïdes ou les polyphénols.

Il est également possible de classer ces systèmes antioxydants selon qu'ils sont hydrosolubles, assurant une protection des milieux intra-et extracellulaires, ou liposolubles, agissant alors au niveau des membranes et des lipoprotéines circulantes (Delattre *et al*, 2003).

#### II.2.1.8. Les sources des antioxydants

- Premièrement, l'organisme a développé des défenses antioxydants qui sont d'abord composées d'enzymes spécifiques dont la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase. Ces enzymes ont la capacité de transformer les radicaux libres en des composés non agressifs.
- Le corps fabrique également d'autres types d'antioxydants, dont le glutathion, capables de neutraliser les radicaux libres en leur offrant directement un électron. Beaucoup de composés présents dans les aliments agissent également de cette manière (Ariane *et al.*, 2007).

### II.2.1.9. Mécanismes d'action des antioxydants

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

### II.2.2. L'activité antimicrobienne

Les métabolites secondaires du lichen sont des substances actives contre les micro-organismes pathogènes. La plupart des substances lichéniques sont connues par leur activité antimicrobienne sont les acides usniques, composés phénoliques, triterpènes, stéroïdes, anthraquinones, depsides, les depsidones, et les dapsones.

Concernant l'acide usnique, son activité antibiotique est considérée comme étant son principal rôle biologique au sein du lichen, c'est pourquoi de nombreuses études s'attachent à déterminer son activité antimicrobienne et à développer son utilisation dans le domaine des industries pharmaceutique et cosmétique (Rankovic , 2015).

#### II.2.2.1. Les Mécanismes d'action antimicrobienne des lichens

Les mécanismes d'action antimicrobienne se résument en 5 actions principales

- L'inhibition de la synthèse des cellules de la couche peptidoglycane, et empêchant la synthèse du peptidoglycane et la dégradation de la paroi cellulaire.
- L'inhibition de la synthèse des protéines du microbe pathogène.
- Le changement de la membrane bactérienne et les dommages mènent à la cellule la mort par la fuite du contenu de cellules.
- L'inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN).
- Inhibition concurrentielle des enzymes et par incorporation incorrecte dans les acides nucléiques, les cellules deviennent incapable de fonctionner normalement (Rankovic ,2015).

*Chapitre III :*  
*Matériel et*  
*Méthodes*



### III.1.Objectif

L'objectif de notre travail est l'étude phytochimique des deux espèces de lichens de façon à refléter leurs propriétés biologiques.

### III.2. Présentation du site d'échantillonnage

#### III.2.1. 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 7). 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  $36^{\circ} 35'$  et  $36^{\circ} 48'$  latitude Nord et entre  $5^{\circ} 29'$  et  $5^{\circ} 40'$  longitude Ouest.



Figure 08 : Localisation du Parc National de Taza (PNT, 2014)

### III.2.2. Biodiversité lichénique du Parc National de Taza

Outre sa diversité floristique (872 espèces), et faunistique (953 espèces), le PNT constitue un milieu favorable à la propagation et le développement d'une flore lichénique exceptionnelle estimée par 60 espèces répartissent en 26 genres et 18 familles dont la dominance de la famille des 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. Méthodologies

#### III.3.1. Récolte et choix des espèces

Une sortie sur le site a été réalisée en moi d'avril 2016, dans la Forêt de Guerrouch, les prélèvements ont été effectués au niveau de deux stations, sur une altitude de 900 m dont nous avons récolté plusieurs lichens deux espèces, deux espèces du genre *Parmelia*, sont en quantité suffisante, pour faire des recherches faciles à échantillonner ont fait l'objet de notre étude, sans menacer leur biodiversité tout en préservant leur biotope.

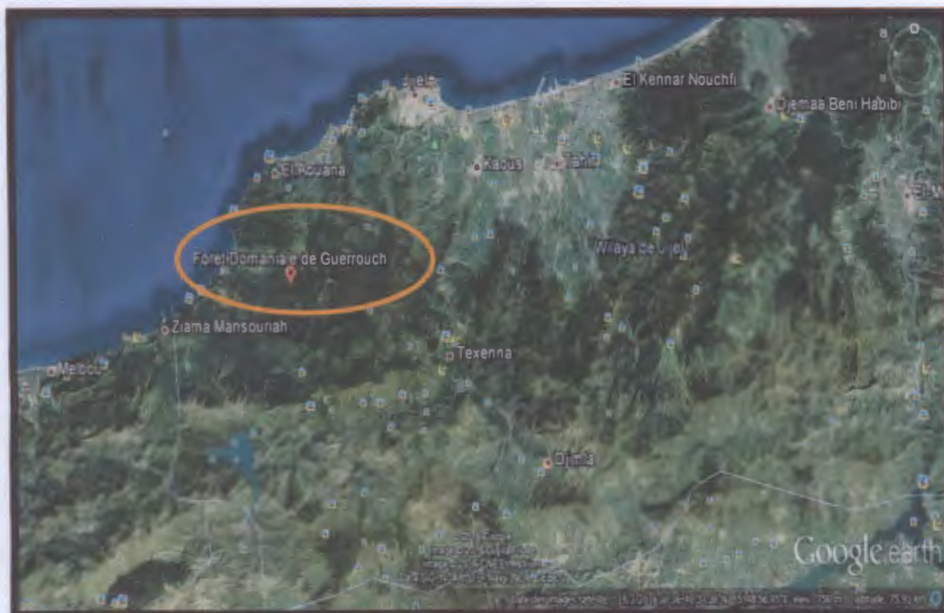


Figure 09 : Site de récolte (Forêt de Guerrouch) (Google earth).

### III.4. Position systématique des deux lichens étudiées

Pour la classification nous avons opté pour la nomenclature d'Ozenda et Clauzade (1970) :

Classe : Ascolichens

Sous classe : Discolichens

Ordre : Cyclocarpales

Sous ordre : Lécanorinées

Famille : Parméliacées

Genre : *Parmelia*

Espèce : *Parmelia perlata*.



Photo 1 : *Parmelia perlata* (Huds).

Classe : Ascolichens

Sous classe : Discolichens

Ordre : Cyclocarpales

Sous ordre : Lécanorinées

Famille : Parméliacées

Genre : *Parmelia*

Espèce : *Parmelia caperata* .



Photo 2: *Parmelia caperata* (L.) Ach

### III.5. Description des espèces

✓ *Parmelia caperata*

*Parmelia caperata*(L.) A C H est une espèce de lichen largement distribuée , elle se trouve, sur les écorces à pH légèrement acide (Canigliaet al, 1998) le Thalle est de 5-20 cm de diamètre, formant parfois de vastes taches, des lobes du pourtour arrondis, allongé de 5-13 mm de large , crénelés, la surface supérieure non ciliées de couleur vert jaune à jaune pâle, parfois gris-vert (à



l'ombre), lisse mais devenant rugueuse et pliée avec l'âge, les rhizines denses à clairsemées au centre de bord, de zone marron, noir, simple, parfois brun ou blanc basculé (Nash *et al.*, 2001).

#### ✓ *Parmelia perlata*

*Parmelia perlata* est un lichen trouvé sur les arbres vieux, les murs et distribué dans les zones montagneuses. Le thalle est foliacé, de feuille membraneuse 5-10 cm de long (Hussainet *al.*, 2014). de couleur gris tendre, lobes du pourtour très largement arrondis, à crénelures peu profondes, généralement ondulés et irrégulièrement relevés, les lobes du milieu relevés et portant souvent sur leurs bords de petites têtes farineuses grises, dessous noir à crampons noirs, à bord brun clair, quelque fois ciliés (Boistel, 1986).

### III.6. Préparation du matériel végétal (lichens)

Les lichens récoltés 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.7. Préparation des extraits des thalles lichéniques

Pour estimer le contenu polyphénolique des espèces étudiées un solvant a été utilisé qui est le méthanol.

#### ❖ Macération

Le principe consiste à faire imprégner 10 g de poudre de lichens de chaque espèce séparément dans un volume de 75 ml du solvant (méthanol), sous agitation magnétique pendant 48h, pour chaque lichens, 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.

Les extraits méthanoliques, prises séparément sont concentré sous vide au rotavapeur rotatif à température 60 °C pour évaporer le solvant (Yu et Dahlgren, 2005).

Les résidus secs obtenus sont repris séparément dans le solvant (méthanol). Les extraits sont ensuite 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.8. Etude phytochimique

#### III.8.1. Analyse qualitative

La recherche des grands groupes chimiques dans les extraits lichéniques est effectuée par une analyse phytochimique qualitative (screening phytochimique) sommaire à partir des tests de coloration suivant (Harbone, 1973., Cavé, 1993., Békro, 2007).

Cette étape préliminaire a permis de rechercher les composés tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les tanins, saponines.

Les tests phytochimiques sont basés surtout sur des essais de solubilité, sur des réactions de coloration et de précipitation.

#### ❖ Test de détection des flavonoïdes

Ce test consiste à traiter 5ml de l'extrait méthanolique avec 1ml de HCl concentré et 0,5g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe après 3 minutes (Cavé, 1993).

#### ❖ Test de détection des tannins

La présence des tannins est révélée en ajoutant à 1ml de l'extrait méthanolique, 2ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl<sub>3</sub> diluée (1 %). L'apparition d'une coloration bleu-noire caractérise la présence des tannins galliques, verte ou bleu-verte celle des tannins cathéchiques (Harbone, 1973).

### ❖ Test de détection des saponines

Les saponines ont été mises en évidence dans le résidu par le test de mousse, Les résidus sont repris dans 5 ml d'eau distillée, puis introduits dans un tube à essai. Le tube à essai est agité vigoureusement. La formation d'une mousse (hauteur supérieure à 1 cm) stable, persistant pendant 1 h indique la présence abondante de saponines (Békro *et al.*, 2007).

### ❖ Test de détection des terpénoïdes

Un volume de 2 ml de l'extrait méthanolique est placé dans un erlenmeyer. Après évaporation à sec, le résidu (petite quantité) est solubilisé avec 2 ml de chloroforme. Ensuite, on mélange 1 ml de la solution chloroformique avec 1 ml d'anhydride acétique en y ajoutant quelques gouttes d'acide sulfurique concentré, on agite et on laisse la solution se reposer.

Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C) (Harbone, 1973).

## III.8.2. Analyse quantitative

### III.8.2.1. Détermination de la teneur des phénols totaux

La teneur en phénols totaux de nos extraits a été déterminée par le réactif de Folin Ciocalteu .

#### ▪ 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 µl de chaque extrait à une concentration de 0,5 mg/ml avec 450 µl d'eau distillée et 250 µl de réactif Folin -Ciocalteu (0,2 N). Après 5 min, 1250 µl 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 de l'expérience à l'exception de l'extrait lichénique. La concentration en phénols totaux de nos extraits est calculée à partir de l'équation de régression obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique qui a été utilisé comme standard (annex2), la teneur en phénols totaux est donc exprimée comme un microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme de l'extrait sec [ $\mu g$  (EAG) / mg EB].

$$Y=0,0197x-0,039$$

$$R^2 = 0,990$$

### III. 8.2.2. Détermination de la teneur des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes de nos extraits 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 forme 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. (Lamien-Meda *et al.*, 2008).

#### ▪ 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 2) :

$$Y=0,192x-0,057$$

$$R^2=0,995$$

### III.7.2.3. 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 µl de l'extrait méthanolique est ajouté à 1500 µl de la solution vanilline / méthanol (4%, m/v) et mélangé à l'aide d'un vortex, ensuite un volume de 750 µl 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).

Une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide tannique comme produit standard (annexe2).

La teneur en tanins condensés de nos extraits a été exprimée par milligramme (mg) équivalent d'acide tannique par gramme (g) de la matière végétale sèche, à partir de l'équation suivante :

$$Y=0,0776x+0,0002$$

$$R^2= 0,998$$

## III.9. Evaluation de la bioactivité

### III.9.1. Evaluation de l'activité antioxydante

Pour estimer l'activité antioxydante de nos extraits méthanoliques nous avons effectué deux tests dont : le pouvoir de piégeage du radical DPPH (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl), pouvoir réducteur du fer.

#### III.9.1.1. Activité antiradicalaire contre le DPPH•

##### ▪ Principe de la méthode

L'activité antiradicalaire de nos extraits est mesurée *invitro* par le pouvoir du piégeage du DPPH• (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl) ; un radical libre et stable de couleur violacée, soluble dans le méthanol. En présence d'antioxydants ou de piègeurs de radicaux libres (cas des composés

phénoliques «  $\Phi\text{OH}$  »), le DPPH se réduit et change de couleur en virant au jaune (Molyneux, 2004).

Cette réduction se traduit par un transfert d'un atome d'hydrogène sur l'atome d'azote du radical DPPH :



#### ▪ Dosage

Selon la méthode décrite par (Dormanetal., 2004) :

2 millilitres de la solution méthanolique de DPPH (0,05 mg/ml) ont été ajoutés à 1ml de la solution d'extrait méthanolique testée à différentes concentrations (4mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml), le mélange est vigoureusement agité à l'aide d'un vortex, puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes.

L'absorbance a été lue à une longueur d'onde de 517 nm. L'acide ascorbique qui est un antioxydant standard est utilisé comme un contrôle positif.

Parallèlement un contrôle négatif est préparé en mélangeant 1ml de méthanol avec 2ml de la solution de DPPH.

#### ▪ Pourcentage d'inhibition

Le pouvoir antiradicalaire est exprimé en pourcentage d'inhibition (I%), calculé selon la formule suivante :

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

Où :

I% : pourcentage d'inhibition

**Abs contrôle négatif** : absorbance du DPPH (solution de DPPH + méthanol)

**Abstest** : absorbance de l'échantillon ou standard (contrôle positif)

#### ▪ Détermination des concentrations inhibitrice 50 (IC50) ou (EC50)

Ce paramètre permet de calculer la concentration de notre extrait nécessaire pour piéger 50% des radicaux DPPH. Il est inversement lié au pouvoir antioxydant (Molyneux, 2004) IC50 qui exprime

la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50% ( plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande).

L'IC50 a été calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentage d'inhibition en fonction de différentes concentrations de l'extrait et du standard utilisé.

### III.9.1.2. Pouvoir réducteur : (réduction de fer « FRAP »)

#### ▪ Principe

Le pouvoir réducteur est déterminé par la méthode FRAP ou *Ferric ion Reducing Antioxidant Power*, qui repose sur la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) dans un milieu acide, L'absorbance du mélange réactionnel est mesurée à une longueur d'onde de 700 nm, en effet, une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'échantillon testé (Oyaizu, 1986., Hubert, 2004).

#### ▪ Dosage

Nous avons utilisé la méthode FRAP pour évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, *in vitro* en utilisant le protocole décrit par (Diaz *et al.*, 2011).

Un volume de 200  $\mu$ l de l'extrait méthanolique à différentes concentrations [4mg/ml 2mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml] est mélangé avec 400  $\mu$ l du tampon phosphate (0,2 M à pH 6,6) et 400  $\mu$ l de ferricyanure de potassium ( $K_3Fe(CN)_6$ ) [10g/l, (1%)].

Après incubation du mélange à 50°C pendant 30 minutes, et après refroidissement un volume de 400  $\mu$ l de l'acide trichloracétique (TCA) à 10% a été additionné.

Le mélange obtenu est ensuite centrifugé à 3000 tour/min pendant environ 10 minutes. Un volume de 400  $\mu$ l de surnageant de chaque solution est mélangé avec 400  $\mu$ l de l'eau distillée et 100  $\mu$ l de chlorure de fer  $FeCl_3$  à (0,1%).

La lecture de l'absorbance a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 700 nm, contre un blanc constitué de tous les réactifs de l'expérience à l'exception de l'extrait. Un contrôle positif (acide ascorbique) a été préparé dans les mêmes conditions.

#### ▪ Expression des résultats

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés et donc un pouvoir antioxydant élevé.

*Chapitre IV :*  
*Résultats et*  
*interprétation*



### IV.1. Rendement d'extraction

A partir de la prise d'essai initiale de chaque échantillon utilisé pour l'extraction méthanolique nous avons obtenus les rendements représentés dans le tableau ci-dessous, qui sont exprimés en pourcentage.

**Tableau 1:** Rendement d'extraction méthanolique des deux espèces étudiées.

Espèces	Masses des extraits obtenus (g)	Rendement d'extraction (%)
<i>Parmelia caperata</i>	2.82	28.2%
<i>Parmelia perlata</i>	1.24	12.4%

Le rendement d'extraction le plus élevé est noté chez *Parmelia caperata* (28,2%), alors que celui estimé pour *Parmelia perlata* est deux fois plus faible avec (12,4 %).

### IV.2. Etude phytochimique

#### IV.2.1. Analyse qualitative (screening phytochimique) :

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de composées majoritaires dans les deux extraits méthanoliques des lichens (annexe 1).

Les tests de caractérisation phytochimique, réalisés sur nos extraits, ont donné les résultats que nous présentons dans le tableau et les figures ci-dessous.

**Tableau (02):** Résultats des tests phytochimiques

	Test	Couleur des espèces	
		<i>Parmelia caperata</i>	<i>Parmelia perlata</i>
Flavonoïdes	Test de tournures de magnésium	Rouge <sup>+</sup>	Rouge <sup>+</sup>
Tanins	Test de FeCL3	Bleu noir <sup>++</sup>	Bleu noire <sup>++</sup>
Saponines	test de mousse	La formation d'une mousse <sup>+++</sup> , avec précipitation	La formation d'une mousse <sup>+++</sup> , avec précipitation
Terpénoides	Test de Laskowski	Vert <sup>+++</sup>	Vert <sup>+++</sup>

(+++): Test fortement positif. (++) : Test moyennement positif. (+) : Test faible positif

Les tests phytochimiques réalisés sur les deux extraits méthanolique révèlent la présence de plusieurs familles de composés. Ces résultats montrent que les deux espèces *Parmelia caperata* et *Parmelia perlata* sont très riches en tanins, en flavonoïdes, en saponine, et en terpénoïdes.

#### IV.2.2. Analyse quantitative

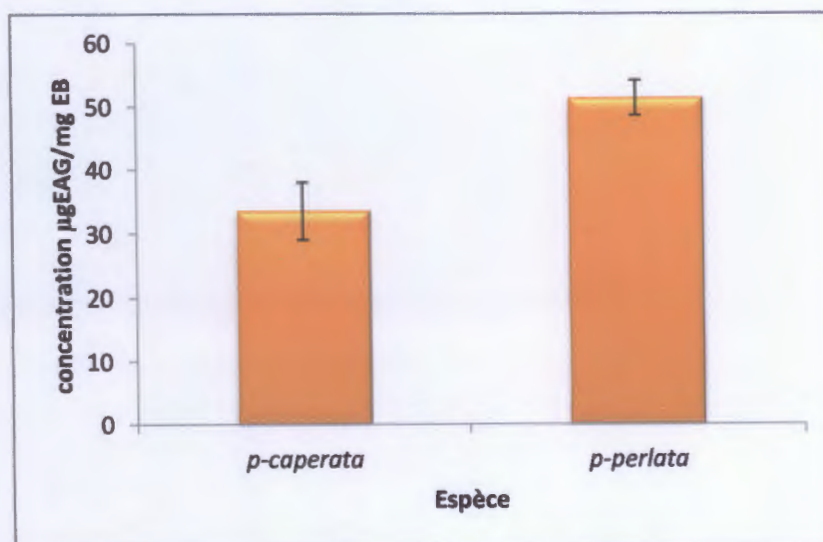
##### IV.2.2.1. Détermination de la teneur en phénols totaux

Afin de déterminer la teneur en phénol totaux de nos extraits méthanoliques nous avons utilisé la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin-ciocalteu, on utilisant l'acide gallique comme standard, qui nous a permis ainsi de tracer une courbe d'étalonnage avec  $R^2 = 0,99$ .

Les teneurs sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent d'acide gallique par milligramme de l'extrait sec ( $\mu\text{g}$  EAG/mg), montrées dans le tableau ci-dessous et représentées graphiquement dans la figure(12):

**Tableau 03:** Teneur en phénols totaux des extraits méthanolique

	Moyenne $\pm$ Ecartype
<i>Parmelia perlata</i>	51,36 $\pm$ 2,774
<i>Parmelia caperata</i>	33,58 $\pm$ 4,477



**Figure 10 :** Teneur des phénols totaux des extraits méthanoliques des espèces étudiées

On estime d'après ces résultats la richesse du lichens *Parmelia perlata* en phénols totaux qui enregistre la teneur la plus élevée (51,36 $\pm$  2,774)  $\mu\text{g}$  EAG/mg, par rapport à celle noté pour *Parmelia capérata* (33,58 $\pm$ 4,477)  $\mu\text{g}$  EAG/mg, cela montre une différence significative entre la teneurs en phénols totaux des deux extraits lichéniques ( $P=0,043$ ).

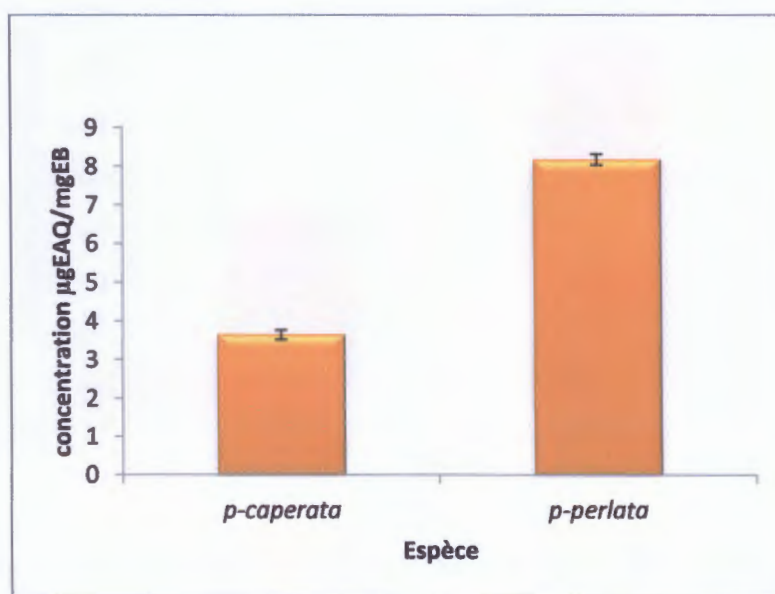
#### IV.2.2.2. Détermination de la teneur en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de tri-chlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>). La quercétine prise comme standard nous a permis de réaliser une courbe d'étalonnage avec  $R^2 = 0,995$ . La teneur en flavonoïdes de nos extraits est rapportée en  $\mu\text{g}$  équivalent de quercétine (EQC) par milligramme d'extrait sec de lichen.

Les résultats figurent dans le tableau (04) et illustrés graphiquement dans la figure (13)

**Tableau 04:** Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques

	Moyenne±Ecartype
<i>Parmelia perlata</i>	8,170±0,1413
<i>Parmelia caperata</i>	3,649± 0,119



**Figure 11 :** Teneur en flavonoïdes des extraits méthanoliques des espèces étudiées.

Comme le montre l'histogramme ci-dessus, montre que l'extrait méthanolique du lichens *Parmelia perlata* est riche en flavonoides (8,1701±0,1413)  $\mu\text{g}$  EAG/mg, par rapport a celui de *Parmelia caperata* (3,6493± 0,1199)  $\mu\text{g}$  EAG/mg, ces résultats rélévent une difference significative ( $P=0,02$ ) entre les deux espèces étudiées.

### IV.3. L'activité antioxydante

#### IV.3.1. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur de nos extraits méthanolique de *Parmelia perlata* et *Parmelia caperata* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP, une analyse simple, rapide et reproductible. Cependant, la présence des réducteurs notamment les polyphénols dans les extraits de plante provoque la réduction de fer ferrique  $Fe^{+3}$  en fer ferreux  $Fe^{+2}$ .

Par conséquent, la puissance de réduction est un des mécanismes antioxydants (Karagozler *et al.*, 2008).

Le pouvoir réducteur des deux extraits des lichens étudiés est testé à des concentrations allant de 0,125 mg/ml à 4mg/ml.

Les valeurs des absorbances obtenues dans le tableau (06) ont permis de tracer des courbes figure (15) pour les deux espèces étudiées ainsi que pour l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif.

**Tableau (06) :** Variations des absorbances des deux lichens du *Parmelia perlata* et *Parmelia caperata*.

Concentration	Moye ± Ecartype		
	<i>Parmelia perlata</i>	<i>Parmelia caperata</i>	Acide ascorbique
0.25mg/ml	0,172±0,0848	0,137±0,164	0,44±0,0459
0.5mg/ml	0,3455±0,006	0,3105±0,026	0,52±0,0120
1mg/ml	0,519±0,048	0,504±0,0155	0.802±0.0028
2mg/ml	0,973±0,024	0,7315±0,137	1.201±0,140
4mg/ml	1,201±0,031	0,959±0	1,56±0,141

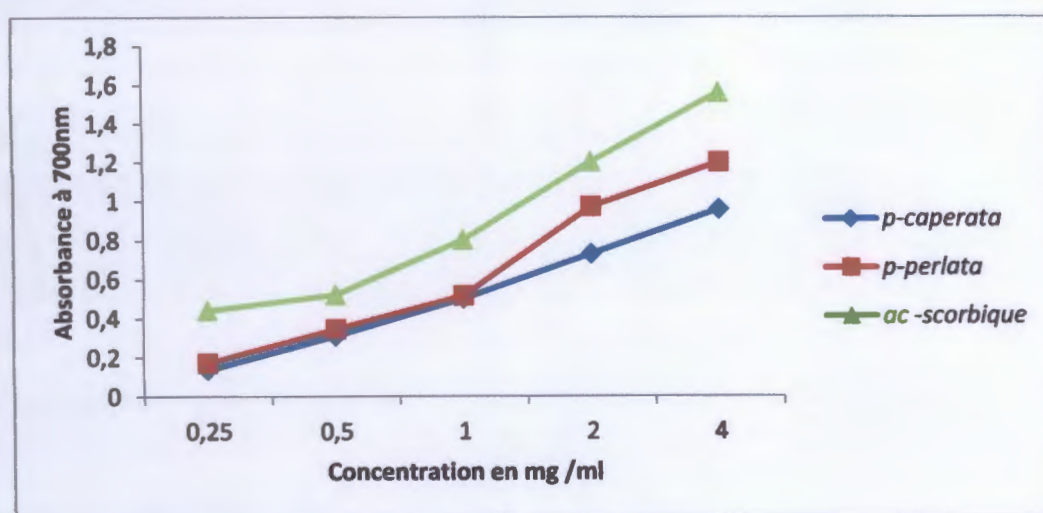


Figure 13 : Pouvoir réducteur des extraits lichéniques

A la lumière de ces résultats on constate que la capacité de réduction de fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos extraits (Ozturk *et al*, 2007), cependant l'augmentation de l'absorbance est indicatrice d'un pouvoir réducteur élevé.

Les absorbances enregistrées varient de  $(0,172 \pm 0,0848)$  à  $(1,201 \pm 0,031)$  pour *Parmelia perlata*, et de  $(0,137 \pm 0,164)$  à  $(0,959 \pm 0)$  pour *Parmelia caperata* et de  $(0,44 \pm 0,0459)$  à  $(1,56 \pm 0,141)$  pour l'acide ascorbique.

Ces graphes montrent que l'extrait méthanolique de *Parmelia perlata* a présenté l'activité la plus importante pour réduire le fer par rapport à celle de *Parmelia caperata*, reflétée par les absorbances obtenues à différentes concentrations, dont nous avons enregistré l'absorbance maximale  $(1,201 \pm 0,031)$  à la concentration 4mg/ml pour *Parmelia perlata*, cependant l'acide ascorbique est le plus actif avec une absorbance maximale  $(1,56 \pm 0,141)$  à la même concentration.

Une variation significative a été enregistrée entre les espèces étudiées pour toutes les concentrations mais enregistrée une variance hautement significative dans la concentration 4mg/ml elle est de  $(p = 0,00816)$ .

L'analyse statistique montre une corrélation significative entre les concentrations de l'extrait méthanolique des deux lichens étudiés, *Parmelia caperata*, *Parmelia perlata* et du standard et les absorbances enregistrées avec respectivement  $r = 0.996$ ,  $r = 0.98$ ,  $r = 0.987$ .

#### **IV.3.2. Activité antiradicalaire contre le DPPH\***

Le radical DPPH est généralement l'un des substrats les plus utilisés pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (Kholkhal *et al.*, 2013).

Le tableau ci-dessous rapporte les pourcentages d'inhibitions obtenus en fonctions de différentes concentrations de nos extraits méthanoliques testés, et de l'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence (Tableau07).

Tableau ( 07 ) : Pourcentages d'inhibitions des deux extraits contre le radical DPPH\*

Concentration	Moye ±Ec		
	<i>Parmelia perlata</i>	<i>Parmelia caperata</i>	Acide ascorbique
0.125mg/ml	44,03±0,02262	33,88±0,0007	48.08±0.123
0.25mg/ml	48,522±0,01060	39,894±0,0176	57.69±0.007
0.5mg/ml	55,61±0,0042	53,723±0,0007	65.31±0.004
1mg/ml	66.903±0.01202	74.58±0.0007	86.73±0.002
2mg/ml	68,08±0,0318	88,357±0,0014	96.39±0.003
4mg/ml	72,75±0,0007	91,5481±0,0021	96.513±0.0212

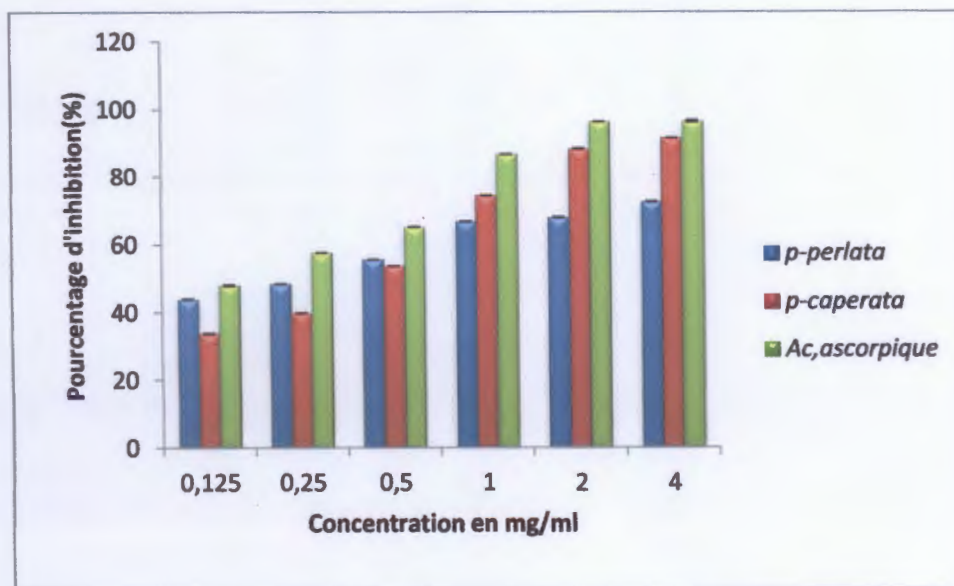


Figure 14 : Pourcentages d'inhibitions contre le radical DPPH\*

Ces histogrammes indiquent que les deux extraits méthanoliques, ainsi que le standard utilisé (acide ascorbique) présentent une capacité à piéger le radicale DPPH\*, et diffèrent d'une concentration à une autre.

*Parmelia caperata* a enregistré les taux d'inhibitions les plus élevés, avec un taux maximal (91,5481±0,0021) par rapport à *Parmelia perlata* (72,75±0,0007) pour les concentrations supérieures à 0,5mg/ml, mais nettement inférieures à ceux enregistrés pour l'acide ascorbique, pour toutes les concentrations, où nous avons noté le pouvoir d'inhibition maximal (96.513±0.0212) à la concentration 4mg/ml.

L'analyse statistique montre une corrélation significative entre le taux d'inhibitions et la concentration de l'extrait méthanolique des deux lichens étudiés, *Parmelia caperata*, *Parmelia perlata* et du standard avec respectivement  $R^2= 0.99$ ,  $R^2= 0.98$ ,  $R^2= 0.99$ .

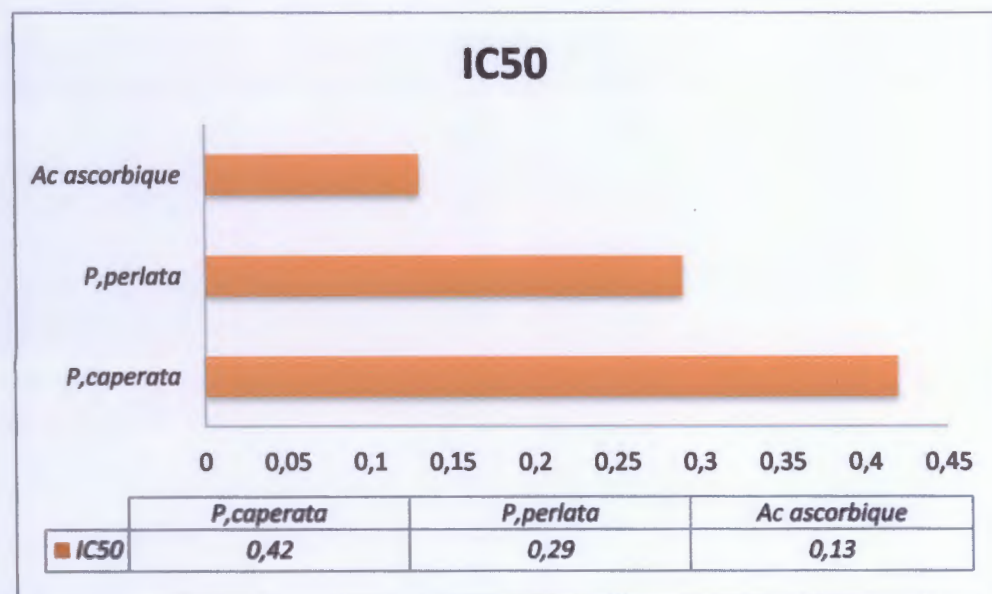
Une variation significative a été enregistrée entre les espèces étudiées pour tous les concentrations où nous avons enregistré une signification la plus marquée dans la concentration 4mg/ml ( $p=0.021$ ).

Selon les résultats obtenus on constate que le pourcentage d'inhibition est proportionnel à la concentration de l'extrait car l'augmentation de pourcentage d'inhibitions est indicatrice d'une bonne activité antiradicalaire (Ozturk *et al.*, 2007).

#### IV.3.3. Calcul des IC50

Afin de comparer le pouvoir anti-radicalaire nous avons calculé l'IC50 qui exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%, qui est déterminé graphiquement entre les pourcentages d'inhibition et les différentes concentrations (annexe 04), elle est exprimée en mg/ml.

Plus la valeur d'IC50 est petite, plus l'activité antioxydante d'un composé est grande (Khoudali *et al* ,2014)



**Figure 15 : valeurs de l'IC50 de nos échantillons**

Les résultats mentionnés dans la figure (17) montrent que l'IC50 la plus faible est notée pour *Parmelia perlata* (0,29 mg/ml), soit la moitié de celle enregistré pour *Parmelia caperata* (0,42 mg/ml), et supérieure à celle de l'acide ascorbique, le standard testé qui a enregistré la plus faible concentration inhibitrice (0,13mg/ml).

Ces résultats confirment que l'extrait méthanolique de *Parmelia perlata* nécessite la plus faible concentration pour piéger 50% du radical DPPH, tandis que la concentration de l'acide ascorbique inhibitrice est seulement 0,13mg/ml.

#### IV.4.L'activité antibactérienne

Pour estimer l'activité antibactérienne de nos extraits, nous avons choisis (4 souches bactériennes), de différentes structures cellulaires. Les résultats obtenus sont figurés dans les tableaux ci-dessous :

**Tableau 08** : effet de méthanol sur l'activité antibactérienne (contrôle négatif).

Souches bactériennes	Méthanol
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	/
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC15313	/
<i>Salmonella. spp</i> ATCC 25842	/
<i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC 25639	/

/ : Pas d'inhibition

On remarque, que le solvant (méthanol) n'a aucun effet inhibiteur sur les souches bactériennes testées.

**Tableau 09** : Effet de l'extrait méthanolique sur *Bacillus cereus*

	Diamètre d'inhibition moy ± EC		
	<i>Parmelia caperata</i>	<i>Parmelia perlata</i>	Ciprofloxacine
0.25mg/ml	8.875±2.748	10±0	
0.5 mg/ml	10.5±0.5345	10.125±0.285	11.25 ±0.5
1 mg/ml	9.6±3.5431	10.375±4.718	
2 mg/ml	13.875±0.164	8±2.138	
4 mg/ml	14.875±3.642	8±2.138	

Ces résultats révèlent que les extraits méthanoliques des lichens étudiés exercent un effet antibactérien considérable sur *Bacillus cereus* avec des zones d'inhibition variable où nous avons



enregistré le diamètre d'inhibition le plus grand chez *Parmelia caperata* ( $14.875 \pm 3.642$ ) mm, à la concentration 4mg/ml est supérieure à celui noté pour *Parmelia perlata* ( $8 \pm 2.138$ ) mm, cependant la *Ciprofloxacin* exerce un effet inhibiteur similaire à celui des deux extraits testés à la concentration 0.5 mg/ml.

Le résultat obtenu représente une différence non significative entre les espèces ( $p > 0.05$ ) (Annexe 6).

**Tableau 10** : Effet des deux extraits méthanolique sur *Listeria monocytogenes*

	Diamètre d'inhibition moy $\pm$ EC		
	<i>Parmelia caperata</i>	<i>Parmelia perlata</i>	<i>Ciprofloxacin</i>
0.25mg/ml	8.75 $\pm$ 2.434	7.5 $\pm$ 2.070	
0.5mg/ml	11 $\pm$ 0.9258	9 $\pm$ 3.380	25.75 $\pm$ 6.751
1mg/ml	11.5 $\pm$ 1.690	11.625 $\pm$ 6.566	
2mg/ml	12.375 $\pm$ 2.669	11.75 $\pm$ 6.250	
4mg/ml	16.5 $\pm$ 4.629	11.875 $\pm$ 3.907	

Les résultats mentionnés dans le tableau (10) montrent l'effet inhibiteur remarquable de nos extraits méthanoliques sur la croissance de *Listeria monocytogenes*, dont le diamètre maximal (16.5 $\pm$ 4.629) est noté pour *Parmelia caperata* à la concentration 4 mg/ml, qui est plus élevé à celui observé chez *Parmelia perlata* avec (11.875 $\pm$ 3.907) mm à la même concentration.

Nous remarquons aussi que l'effet inhibiteur exercé par la *Ciprofloxacin*, l'antibiotique de référence contre *Listeria monocytogenes* est plus important (25.75 $\pm$ 6.751) mm, à la concentration 0,5mg /ml, il est environ deux fois plus grand que celui estimé pour *Parmelia caperata* et *Parmelia perlata* avec respectivement (11 $\pm$ 0.9258) mm et (9 $\pm$ 3.380) mm à la même concentration.

Le résultat obtenu représente une différence non significative entre les espèces ( $p > 0.05$ ) (Annexe 6).

**Tableau 11** : Effet de l'extrait méthanolique des deux espèces sur *Salmonella. Spp*

	Diamètre d'inhibition moy $\pm$ EC		
	<i>Parmelia caperata</i>	<i>Parmelia perlata</i>	Ciprofloxacine
0.25mg/ml	8.5 $\pm$ 2	7.625 $\pm$ 1.767	
0.5 mg/ml	11.125 $\pm$ 1.35	9 $\pm$ 3.207	11 $\pm$ 1.15
1 mg/ml	11.875 $\pm$ 2.232	9.25 $\pm$ 1.069	
2 mg/ml	12 $\pm$ 1.92	11.125 $\pm$ 0.834	
4 mg/ml	13.75 $\pm$ 2.375	14.125 $\pm$ 4.907	

Nous estimons d'après le tableau (11) l'effet inhibiteur de nos deux extraits lichénique sur la croissance de *Salmonella. Spp* à différentes concentrations.

On remarque que l'effet de l'extrait méthanoliques du lichen *Parmelia perlata* et *Parmelia caperata* sur la bactérie *Salmonella. Spp* augmente progressivement avec les concentrations jusqu'à la concentration 4mg/ml ou on a enregistré la valeur de (14.125 $\pm$ 4.907) mm pour *Parmelia perlata* et (13.75 $\pm$ 2.375) mm pour *Parmelia caperata*.

A la concentration 0,5 mg/ml *Parmelia caperata* enregistre le diamètre d'inhibition le plus grand (11.125 $\pm$ 1.35) mm, par rapport à ceux estimés pour *Parmelia perlata* et Ciprofloxacine avec respectivement (9 $\pm$ 3.207) mm et ( 11 $\pm$ 1.15) mm.

Le résultat obtenu représente une différence non significative entre les espèces ( $p > 0.05$ )(Annexe 6)

**Tableau 12 :** Effet de l'extrait méthanolique sur *Entérocooccus faecalis*

	Diamètre d'inhibition moy $\pm$ EC		
	<i>Parmelia caperata</i>	<i>Parmelia perlata</i>	<i>Ciprofloxacine</i>
0.25mg/ml	12.875 $\pm$ 1.885	13.625 $\pm$ 2.199	
0.5 mg/ml	13.375 $\pm$ 2.199	14.125 $\pm$ 2.167	28.5 $\pm$ 6.454
1 mg/ml	13.5 $\pm$ 4	14.375 $\pm$ 1.597	
2 mg/ml	13.75 $\pm$ 5.365	14.5 $\pm$ 1.195	
4 mg/ml	15.875 $\pm$ 3.313	16.625 $\pm$ 3.777	

Ces résultats illustrés dans le tableau ci-dessous indiquent que les extraits méthanoliques testés ont un effet inhibiteur sur la croissance de *Entérocooccus faecalis* avec des diamètres varient de (12.875 $\pm$ 1.885) à (15.875 $\pm$ 3.313) pour *Parmelia caperata* et (13.625 $\pm$ 2.199) à (16.625 $\pm$ 3.777) pour *Parmelia perlata*, cependant *Ciprofloxacine* exerce l'effet le plus important sur la même espèce avec un diamètre de (28.5 $\pm$ 6.454) mm à la concentration 0,5mg/ml qui est environ deux fois plus grand que celui noté pour *Parmelia caperata* et *Parmelia perlata* avec respectivement (13.375 $\pm$ 2.199) mm et (14.125 $\pm$ 2.167) mm.

Le résultat obtenu représente une différence non significative entre les espèces ( $p > 0.05$ ) (Annexe 6)

*Chapitre V.*

*Discussion*

## Discussion

Les résultats obtenus révèlent les présences de divers composés phénoliques, notamment les phénols totaux, les flavonoïdes, et les tanins dans les extraits testés, il a été observé que l'extrait méthanolique de *Parmelia perlata* a présenté significativement ( $P < 0,05$ ) la teneur la plus élevée en phénols totaux et en flavonoïdes.

Selon Béhéra et al., (2005), 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.

Nos résultats indiquent que les extraits des lichens testés sont capables de piéger les radicaux libres du DPPH, et de réduire les oxydants tel que le fer.

L'extrait méthanolique du lichen *Parmelia perlata*, exerce le pouvoir le plus élevé contre le radical libre DPPH, ces résultats confirment que l'extrait méthanolique de *Parmelia perlata* a une bonne activité par rapport à celle exercée par l'extrait de *Parmelia caperata*, car il nécessite la plus faible concentration  $IC_{50} = 0,29$  mg/ml pour piéger 50% de ce radical, cela est probablement lié à sa forte teneur en polyphénols.

La puissance de réduction d'un extrait est un des mécanismes antioxydants. Cependant, la présence des réducteurs notamment les polyphénols dans les extraits de plante provoque la réduction de fer ferrique  $Fe^{+3}$  en fer ferreux  $Fe^{+2}$  (Karagozler et al., 2008), par leurs groupements hydroxyles les composés phénoliques peuvent servir comme donneurs d'électron pour piéger divers oxydants.

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

Le genre de *Parmelia*, a fait l'objet de plusieurs études (Manojlovic., 2012 ; Rankovic., et al 2007., Sharma., 2012) ont montré que les extraits lichéniques de *Parmelia caperata*, *P. saxatilis* et *P. sulcata*, *P. perlata* sont riches en composés phénoliques, responsables de nombreuses activités biologiques notamment l'activité antioxydante.

Selon les résultats obtenus on constate que l'extrait méthanolique de *Parmelia perlata* est le plus actif, cela peut être lié à sa forte teneur en polyphénols.

Les études de Behera et al (2009), Kosani'c et al. (2013) et de Plaza et al., (2014), vont dans le même sens, ils ont trouvé que le pouvoir antioxydant des extraits lichéniques testés est engendré

par leur forte teneur en phénols ce qui signifie que les phénols sont de bon antioxydants, pour la plupart des lichens, des phénols, y compris depsides, depsidones et dibenzofuranes, sont des antioxydants importants en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres, (Kosanic et al., 2012).

Dans notre étude, les extraits testés sont dotés aussi d'une activité antibactérienne et cela se traduit par les diamètres des zones d'inhibition atteignant les 16 mm, cela est proportionnelle avec la concentration de l'extrait.

Selon (Hussain et al., 2016), l'extrait méthanolique de *Parmelia perlata* est d'une forte activité contre les bactéries à gram positif et gram négatif avec des diamètre allant de 18 à 22 mm, ce qui est similaire au résultats obtenus.

Une autre étude réalisée par (Vidyalakshmi., 2012), sur la même espèce qui a démontré que *Parmelia perlata* a un grand potentiel antibactérien contre *Staphylococcus aureus*, qui provoque des infections de la peau chez les êtres humains.

Selon Amandine (2015), la présence de l'acide usnique de *Parmelia caperata* est principalement responsable de son activité antimicrobienne.

Les résultats ont montrés aussi que les diamètres des zones d'inhibition varient d'une concentration à l'autre, et d'un microorganisme à l'autre généralement les diamètres des zones d'inhibition obtenues avec les bactéries gram positifs sont un peu plus importants que ceux obtenus avec les bactéries gram négatifs, cet efficacité est probablement dû à la présence de différentes molécules bioactive dans les extraits étudiés avec propriétés antibactériennes.

L'activité antimicrobienne varie en fonction de l'espèce et du solvant utilisé dans l'extraction (Yilmaz et al., 2005).

La composition et structure cellulaire des microorganismes ont surtout une influence sur l'activité antibactérienne des extrait lichéniques, sachant que la paroi cellulaire des bactéries à gram-positif est constituée de peptidoglucanes et d'acide téichoïques, tandis que la paroi cellulaire des bactéries à gram négatif est faite de peptidoglucanes, lipopolysaccharides et lipoprotéines (Heijenoort, 2001; Kosanic et al., 2012a).

*Conclusion*

## Conclusion

A la lumière des résultats obtenus les tests phytochimiques appliqués sur les deux espèces lichéniques *Parmelia perlata* et *Parmelia caperata*, révèlent la présence de quelques familles de composés chimiques tels que les phénols totaux, les flavonoïdes, les saponines, les tannins.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des phénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle des teneurs en phénols totaux variable, l'extrait sec de *Parmelia perlata* a présenté la teneur la plus élevée, ( $51,36 \pm 2,774$ )  $\mu\text{g EAG/mg EB}$ , alors que pour *Parmelia caperata*, elle est de ( $33,58 \pm 4,477$ )  $\mu\text{g EAG/mgEB}$ . De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode de trichlorure d'aluminium qui nous mène à conclure que l'espèce *Parmelia perlata* a une teneur plus élevée ( $8,170 \pm 0,1413$ )  $\mu\text{g EAG/mgEB}$ , par rapport à l'espèce de *Parmelia caperata* ( $3,649 \pm 0,119$ ). La méthode de la vanilline montre que la teneur la plus élevée des tanins est observé chez *Parmelia perlata* ( $1,138 \pm 0,102$ )  $\mu\text{g EAG/mgEB}$ , puis *Parmelia caperata* elle est de ( $1,121 \pm 0,264$ )  $\mu\text{g EAG/mgEB}$ .

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes différentes à savoir la test du pouvoir réducteur et le test anti DPPH<sup>•</sup>.

La première technique a montré que l'extrait méthanolique de *Parmelia perlata* a présenté l'activité la plus importante pour la réduction de fer par rapport à celle de *Parmelia caperata*, une capacité à réduire le fer qui est inférieure à celles de l'acide ascorbique.

Pour la deuxième méthode les résultats montrent que l'extraits de *Parmelia perlata* exerce une bonne activité ( $\text{IC}_{50}=0.29\text{mg/ml}$ ) par rapport à celle de *parmelia caperata* ( $\text{IC}_{50}=0.42\text{mg/ml}$ ) elle nécessite 0.29 mg/ml pour piéger 50% du radical DPPH.

Les résultats obtenus au cours des tests phytochimie des extraits méthanoliques montrent aussi que *Parmelia perlata* et *Parmelia caperata* présentent des propriétés antioxydantes à différents niveaux, donc cette activité est proportionnelle au contenu phénolique notamment les phénols totaux et flavonoïdes.

Les extraits testés ont montrés une bonne activité contres tous les microorganismes testés ce potentiel varie en fonction de l'espèce, avec des zones d'inhibition variables d'une concentration à l'autre.

D'une manière générale nous constatons que les lichens renferment des composés phénoliques biologiquement actifs.

### Perspectives :

- Il est très intéressant d'identifier ces molécules, et de les séparer avec les techniques d'analyses appropriées pour une meilleure valorisation de ces substances.
- Développer des médicaments antiradicalaires à base de lichen, doués d'une activité antioxydante.



- Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondi et complémentaires de l'activité antioxydante et antibactérienne des composés polyphénoliques en général des flavonoïdes et des tannins en particulier.
- Développer l'utilisation de ces substances dans le domaine des industries pharmaceutique et cosmétique.

*Références*

*Bibliographiques*

**A**

- Abdoulaye A., Sohounhloué D.C.K., Ikhiri k ., (2014).** Etude phytochimique, activités antiradicalaire, antibactérienne et antifongique d'extraits de *Sebastiania chamaelea(L.) Müll.Arg.* 037 ; 10 – 17.
- Amirouche N., Hadj-arab H., Bouguedoura N., (2009).** Botanique : algues, champignons, lichens. *Houma édition*, Alger, 86p.
- Ariane A-P., Bélisle A-C., Berrissoul C., Boisjoli G., Bouchard F., Gallo E., Gauthier M., Hervé J., Jourdain M., Larouche F., Leclerc K., Miclette M., Ouchfoun L., Ponceblanc F., Roy J-S., Vachon D., Viau M., Vuong P.,(2007).** Le Point Biologique, Vol. 1 ; 1-39.
- Augustin Scalbert., André Mazur., (2003).** Dietary polyphénols and the prevention of atherosclerosis, Vol. 1, N° 2: 3-7.

**B**

- Behera B-C., Verma N., Sonone A., Makhija U., (2005).** Antioxidant and antibacterial activities of lichen *usneaghattensis in vitro*. *Biotech. Lett.* 27:991–995.
- Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A., Makhija, U., (2009).** Optimization of culture conditions for lichen *usneaghattensis* G. awasthi to increase biomass and antioxidant metabolite production. *Food Technol. Biotechnol.* 47, 7–12
- Békro Y- A., Békro M. J. A., Boua B-B., Tra Bi F. H. et Ehile E. E.,(2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana*(Baill.) Herend. *Et Zarucchi (Caesalpinaceae). Sciences et Nature* 4 : pp. 217-225.
- Bellenfant S., Vallade J., Beguinot J., Sirugue D., Lemmel C., et le Groupe lichens de Bourgogne (GLIB), (2010).** Les lichens une symbiose exemplaire. *Rev Sci. Bourgogne-Nature*, 45 p.
- Boistel A., (1986).** Nouvelle flore des lichens. *Belin*, paris, 145p.
- Boullard B., (1997).** dictionnaire plantes & champignons. *Estem*, paris, 466p.
- Boustie J ., Tomasi S Grube M.,(2010).** Bioactive lichen metabolites: *alpine habitats as an untapped*. *Rev* (2011) 10:287–307
- Bruneton J., (1993).** Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales. 2<sup>ème</sup> Ed *Lavoisier TEC* et *DOC*, France. 895p.
- Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> Ed. *Lavoisier*, France. 1120P.

## T

**Caniglia G., Tassoni T., carboni C.,(1998).**Thallus variations of *Parmellia caperata* exposed in suburbs and industrial area (venice, north-east italy), dipartimento di biologia via trieste, 75 : 95-102.

**Cavé A.,(1993).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales : 2ème Ed. Tec. Et Doc. *Ed. Lavoisier*, Paris, 274-285.

**Cheyrier V., Pascal S-M., (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. *Lavoisier*, paris,398p.

**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, *Bulletin de la Société Botanique du Centre – Ouest Nouvelle série*, 214p.

## D

**Dalip K- U., Pradeep K., DivakarV-S., Rajesh B., (2015).** Recent Advances in Lichenology Modern Methods and Approches in Biomonitoring and Bioprospection, Volume 1.*Springer*, India 273p.

**Delattre J., Durand G., JardillierJ-C., (2003).** Biochimie Pathologique : Aspects moléculaires et cellulaires. *Flammarion*, paris, 549p.

**Díaz L., De -Montijo S., Medina A., Meléndez P., Laurence V and Marti-Mestres G., (2011).** Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaeriumfloribundum* against acne-inducing bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. *Rev Peru Biol* 18: 153–158.

**Dorman H-J., Bachmayer O., Kosar., M., Hiltunen R., (2004) .** Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiacea species grown in Turkey. *J. Agr. Food Chem.* 52: 762–770.

**Durrieu G., (1993).** Écologie des champignons *Masson* .paris197p.

## E

**Esteban I., (2012).** Líquenes usados en medicina tradicional. *Bol Soc Micol Madrid* 36: 163-174.

## F

**Fabian A-C., peter D-C., Matthew J-D., Mathien P., Dolores M., Lily C et Paul S-D., (2005).** Breeding system in the lichen forming fungal genus *cladonia* . In *.Bramisilav R., Marijana M., etTajana P., (2011).* Antioxidant antimicrobial and anticancer of the lichen *cladoniafurcata*, *lecanoraantra* and *lecanoramuralis*.

**Favier A., (2003).** Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique*; 108-117.

**François J., Gaudry M., Prat R., (2009)** .biologie végétale : croissance et développement. *Dunod*, paris, 237p

### G

**Genevès L., (1990).**biologie végétale thallophytes et microorganismes. *Dunod*, paris, 159p.

**Guignard J-L., (1983).**Abrégé de botanique 5<sup>ème</sup> édition. *Masson*, paris, 18p

**Guignard J-L., (2000).** Biochimie végétal 2<sup>ème</sup> édition .*Dunod*, paris, 188p.

**Guinebert E., Durand P., Prost M., Grinand R., Bernigault R., (2005).**Mesure de la résistance aux radicaux libres. Sixièmes Journées de la Recherche Avicole; 555.

### H

**Hans M-J., (1996)** .Guide des fougères, mousses et lichens d'Europe plus de 650 espèces photographiées, delachaux et nietlé sa, paris, 53p.

**Heijenoort J., (2001).** Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterialpeptidoglycan. *Glycobiology*, 11:25-36.

**Hopkins W-G., (2003).** physiologie végétale 1<sup>ère</sup> édition .*De Boeck*, paris, 514p.

**Hubert J., (2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja – Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, *Ecole doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bio ingénieries*, 174 p.

### I

**Jahns, H, M., (1989).**Guide des fougères, mousses, et lichens d'Europe : Plus de 650 espèces photographiées,*Delachaux et Niestlé*, paris, 257 p.

**Jayanthi S., Priya P., Monica D., Benila Smily J-M., (2012).** Lichens: Origin, types, secondary metabolites and applications, Vol. 1(1), 45-49.

**Jeon H-S., Hans-k., Ryu A-J., Kim A-J, Koh Y-J and., Hur S-J., (2009).**Étude de l'activitéantioxydante et de l'action anti corrosion de l'extraitméthanolique des feuilles du palmiernain (*Chamaeropshumilis* L.) du Maroc : Study of antioxidantactivity and anticorrosion action of the methanolextract of dwarf palm leaves (*Chamaeropshumilis* L.) fromMorocco .*sci* 5(3) :887-898.

**Judd W-S., Campbell CH-S., Kellogg E-A., Stevens P., (2002).** Botanique systématique : une perspective phylogénétique. *De Boeck*, paris, 467p.

**Julkunen-Tiitto R., (1985).** Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics *J. Agric. Food Chem.*, 33 (2): 213–217.

## K

**Karagozler., Erdagb., Emerkyc., Uyganda., (2008).** Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechastata* 15,111(2) 400-7.

**Kholkhal F., Lazouni H A., Bendahou M., Boublenza I., Chabane S-D et Chaouch T., (2013).** Étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante de *Thymus Ciliatus sp. Coloratus*. 9(1) :151-158.

**Khoudali S., Benmessaoudleft D., Essaqui A., Zertoubi M., Azzi M., Benaissa M., (2014).**

**Kosanic M., Manojlovic N., Jankovic S., Stanojkovic T., Rankovic B., (2013).** Everniaprunastri and Pseudoeverniafurfuraceae lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents .53 ; 112-118.

## L

**Laberche JC., (2010).** Biologie végétale 3<sup>ème</sup> édition, *Dunod*, paris, 44p.

**Ladoh Yemeda C.F., Dibong S.D., Nyegue M.A, Djembissi Talla R.P., Lenta Ndjakou B.,**

**Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C., Ramade F., (2008).** utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier*, paris.

**Lamien-Meda A., Lamien C., Compaoré M., Meda R., Kiendre-beogo M., Zeba B., Millogo J., Nacoulma O., (2008).** Polyphenol content and antioxidant activity of four-teen wild edible fruits from Burkina Faso. *Molecules* 13: 581-594.

**Lüttge U., Kluge M., Bauer G., (1996).** Botanique 2<sup>ème</sup> édition, *Tec et Doc, Lavoisier*, paris, 571p.

## M

**Macheix J. J ; Fleuriet A ; Jay-Allemand C., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Bio Ed.* Lausanne 54-65p.

**Mamadou R-S., Moussa I., Sessou P, Yehouenou B., Agbangnan P.D.C., Illagouma A-T.,**

**Manojlovi C- N., Vasiljevi c, P., Gritsanapan, W., (2010).** Phytochemical and antioxidant studies of *Laureraben guelensis* growing in Thailand. *Biological Research* 43, 169–176.

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

**Marouf A., (2000).** Dictionnaire de botanique : les pharnérogames. *Dunod*, paris, 256p.

**Mausaddique H., Shahid M-R., Umer F., Hazoor B., Abdul M., Abdul A., (2014).** *In vitro* antimicrobial potential of lichen (*Parmellia perlata*) against different pathogenic microbes, Vol.4, No.4 : 666-760.

**Merghem R., (2009).** Éléments de biochimie végétale : a l'usage des étudiants en : pharmacie, sciences alimentaire, sciences de la nature et de la vie 1<sup>ère</sup> édition. *Bahaeddine éditions*, Algérie, 171p.

**Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R., (2004).** Botanique : biologie et physiologie végétales. *Maloine*, paris, France 461p.

**Molyneux P., (2004).** These of stable free radical diphenyl picrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2); 211-219.

**Mpondo E., Yinyang J., Wansi J.D., (2014).** Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmantheracapitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*, 7637p.



**Nabors M., (2008)** .biologie végétale : structures, fonctionnement, écologie et biotechnologies .*Pearson*, France, 614p.

**Nash TH ., (2008).** Lichen Biology Second edition, *Cambridge university Press*, 485p

**Nash T-C ., Raven B-D., Greis C., Bungantz F., (2001).** Lichen Flora of the gréatersonoran desert region, Vol 1.tempe .AZ .

**Nultsch W., (1998).** Botanique générale. *De Boeck*, paris, 602p.



**Osseni M.L. A., Agbangnan D. C. P., Bossou A., Paul Yedomonhan H., Avlessi F., Sohounhloue K.C D.,(2009).** Activités antiradicalaires et étude des composés volatils de trois plantes de la médecine traditionnelle du Bénin: *Anchomanesdifformis*, *Parkiabiglobosa* et *Polyalthialongifolia*

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

**Ozenda P., (2000)** .Les végétaux : organisation et diversité biologique 2<sup>ème</sup> édition. *Dunod*, paris, 192p.

**Ozenda P., Clausade G., (1970).** Les lichens étude biologique et flore illustrée, *Masson*, paris, 801p.

**Ozenda P., Clauzade G., (1970).** Les lichens : Etude biologique et flore illustrée, *Masson*, Paris, 800p.

**Ozturk M., Aydogmus-Ozturk F., Duru, M-E., Topcu, G., (2007).** Antioxidant activity of stem and root extracts of rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant, *Food Chemistry*, 106: 1264-1270.

**P**

**Parc National de Taza., (2006).** Plan de gestion (2000-2005), partie A : approche descriptive et analytique, 37 p.

**Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne GO., (1999).** L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin, Vol 4.N<sup>o</sup>5.7p.

**Plaza C., Díaz de Torres L., Lückingf R., Vizcaya M., Medina G., (2014).** Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan Andes, *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2 (5): 138-147.

**R**

**Ramade F.,(1993).**dictionnaire encyclopedique de l'écologie et de science de l'environnement 2<sup>ème</sup> edition. *Dunod*, paris, 822p.

**Ramade, F.,(2008).** Dictionnaire encyclopédique des sciences de la nature et de la biodiversité, *Dunod*, 760 p.

**Rancovic B., Misic M., Sukdolak S., (2008).** Antibacterial activity of some lichen extracts, *World J Microbiol Biotechnol* 24: 1239-1242.

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

**Raven B.H., Evert R.F., Eichhorn S.E., (2007)** .Biologie végétale 2<sup>ème</sup> edition. *De Boeck*, Paris, 733p.

**Richter G., (1993)** .Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie. Presses polytechniques et universitaires romandes, France, 526P.

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

**Rolland Y., (2004).**Antioxydants naturels végétaux .vol11, N<sup>o</sup>6, 420p.

**S**

**Salem S., (2013).** Contribution à l'étude de la biodiversité des lichens dans le Parc National de Taza, mémoire de magister, Université Mohamed Seddiki Ben yahia, Jijel, 100 p.



**Sasikumar JM., Mathew GM., Teepica PDD., (2010)** .Comparative studies on antioxidant activity of methanol extract and flavonoid fraction of *Nyctanthesarbor-tristis*leaves. *Electron J Environ Agric Food Chem* 9: 227-233.

**Sharma AK, Sharma MC, Dobhal MP, (2012)**. Phytochemical investigation of therapeutic important lichen:*Parmelia perlata*. *J Nat Prod Plant Resour*2: 101-106.

**Sélosse M.A., (2000)**.La symbiose, structures et fonction, rôle écologique et évolutif .paris .Vuibert. **Shr**

**estha G., Clair L. L. St., (2013)**. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochem Rev* 12:229–244.

**Shukla V., Upreti D- K., Bajpai R., (2014)**.Lichens to biomonitor the environnement. *springer*, India, 185 p .

### J

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

### V

**VeranjaK.,Bombuwela K., Kathirgamanathan S., Thadhani V-M., (2005)**.Lichens : A chemically important biota . 33(3):169-186.

### Y

**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)**.biopharmaceutical potential of lichens .50(6) ;778-798.



# *Annexes*



**Annex 1 : Analyse qualitative (scrinning phytochimique)****❖ Test de détection des flavonoïdes**

**Figure 1:** Test de tournures de magnésium  
*P. caperata*



**Figure 2:** Test de tournures de magnésium *P. perlata*

**❖ Test de détection des tanins**

**Figure 3:** Test de FeCL3, *P. caperata*



**Figure 4:** Test de FeCL3, *P. perlata*

❖ Test de détection des saponines



Figure 5 : Test de mousse *P.perlata*



figure 6: Test de mousse *P.caperata*

❖ Test de détection des terpénoïdes



Figure 7: Test de Laskowski *P.caperata*



Figure 8: Test de Laskowski *P.perlata*

## Annex 2 : Courbes d'étalonnages

$\mu\text{g/ml}$	Abs
0	0
8	0.094
16	0.26
24	0.399
32	0.612
40	0.764

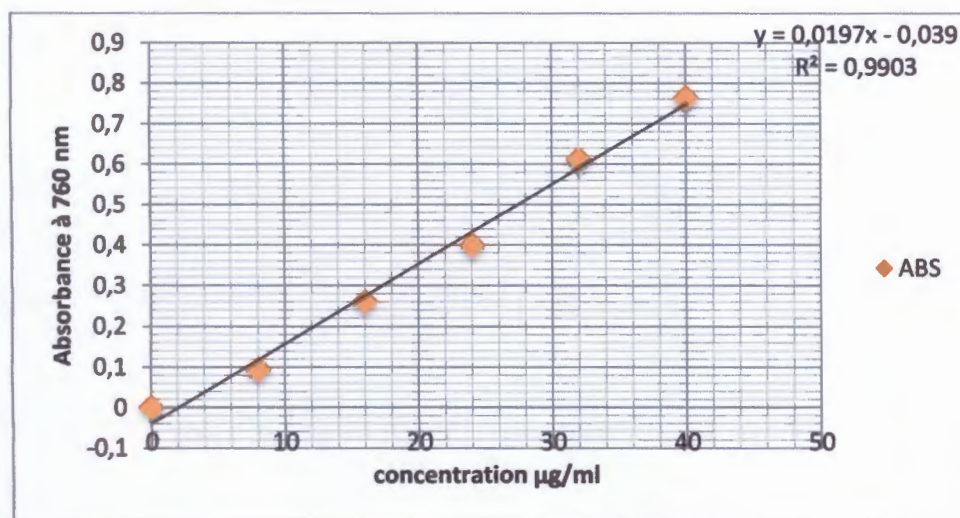


Figure 9 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux

$\mu\text{g/ml}$	Abs
0	0
4	0.655
8	1.422
12	2.307

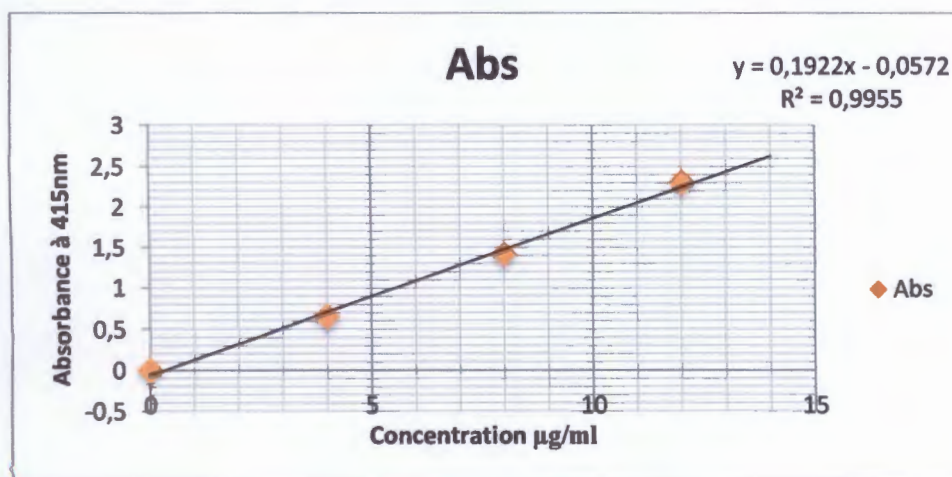


Figure 10: Courbe d'étalonnage de quercétine pour le dosage des flavonoïdes

µg/ml	Abs
0	0
0.25	0.018
0.5	0.04
1	0.077

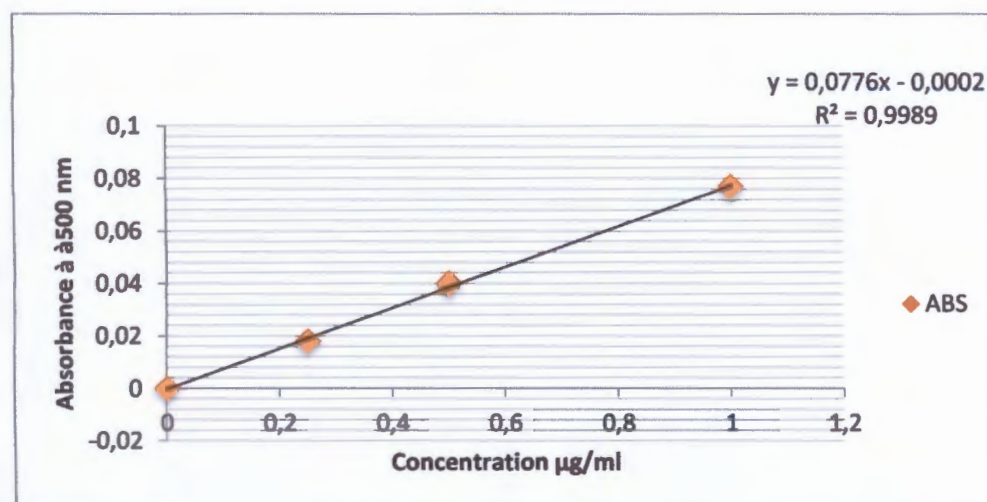


Figure 11 : Courbe d'étalonnage de l'acide tannique pour le dosage des tannins condensés

### Annex 03 :

#### I. Le Pouvoir Réducteur

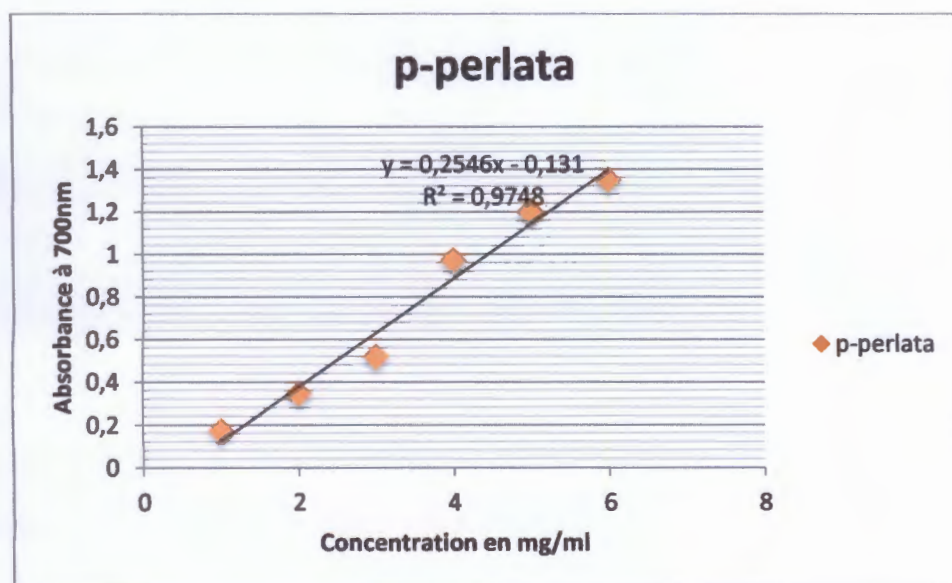


Figure 12 : la régression linière de l'extrait méthanolique de *P.perlata*

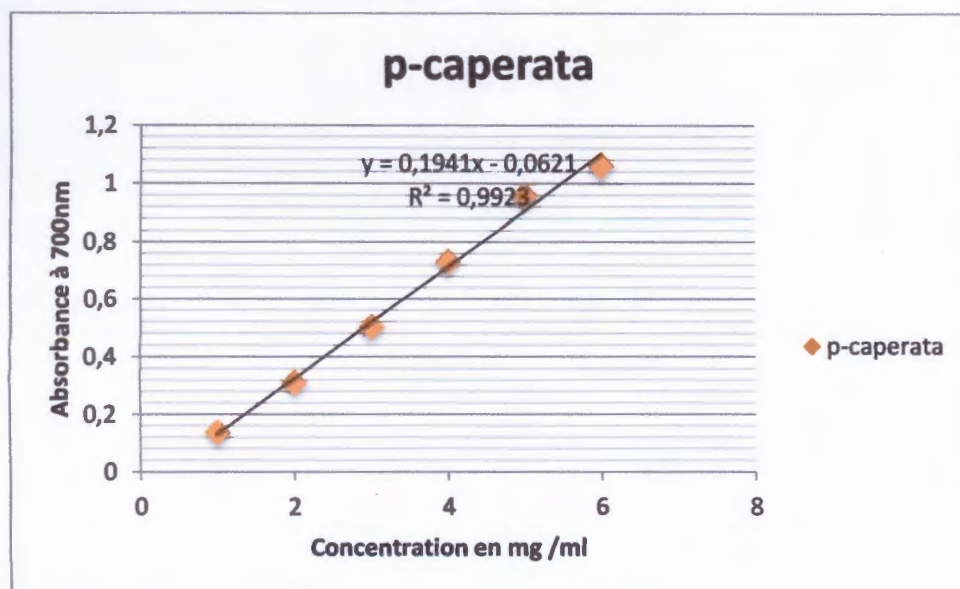


Figure 13 : la régression linière de l'extrait méthanolique de *P. caperata*.

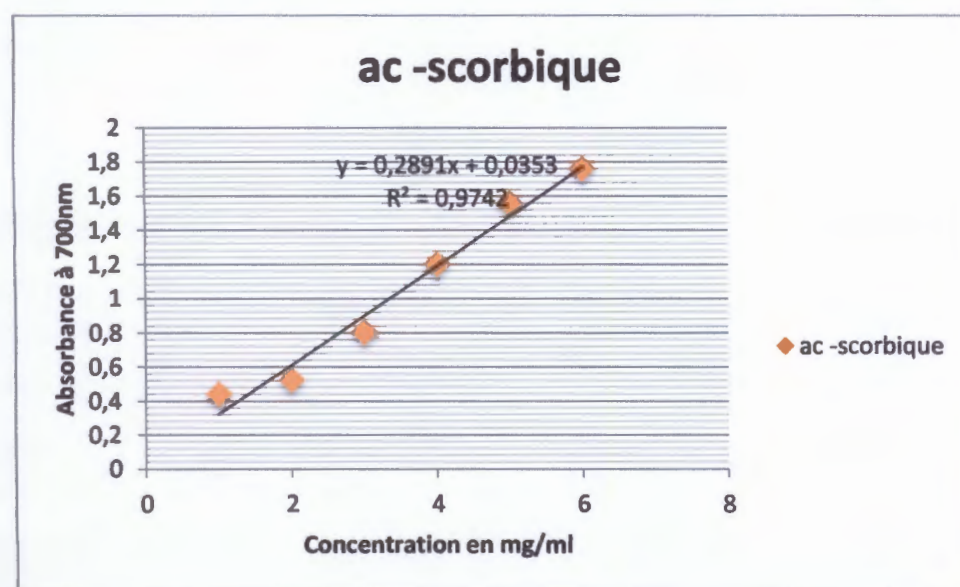


Figure 14 : la régression linière de l'acide ascorbique

## Annex 04 :

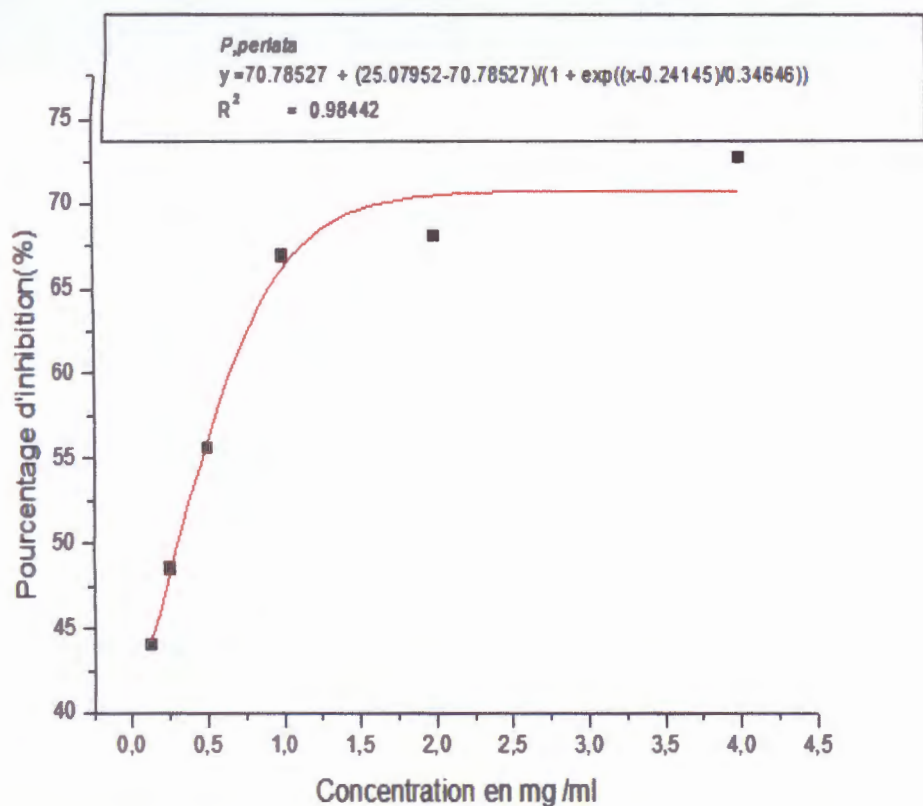


Figure 15 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique de *Parmelia perlata*.

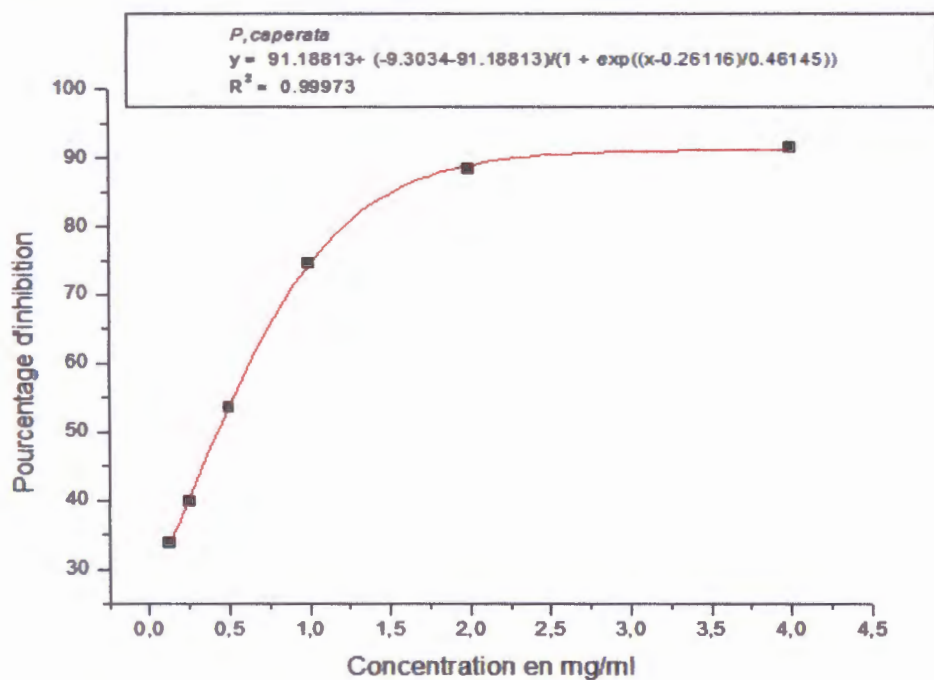


Figure 16: Pourcentage d'inhibition du DPPH<sup>o</sup> en fonction des concentrations utilisées de l'extrait méthanolique de *Parmelia caperata*



**Pour es tanins condensés**

Data	Mean	Variance	N
------	------	----------	---

---

A	0,04333	4,22333E-4	3
---	---------	------------	---

B	0,044	6,3E-5	3
---	-------	--------	---

---

t = 0,05241

p = 0,96071

**Pouvoir réducteur****La Variance entre les deux espèces pour la concentration 4mg/ml (Pouvoir réducteur)**

Data	Mean	Variance	N
------	------	----------	---

---

A	1,201	9,68E-4	2
---	-------	---------	---

B	0,959	0	2
---	-------	---	---

---

t = -11

p = 0,00816

**Activité antiradicalaire contre le DPPH\*****La Variance entre les deux espèces pour la concentration 4mg/ml**

Data	Mean	Variance	N
------	------	----------	---

---

A	0,27	2E-6	2
---	------	------	---

B	0,0715	5E-7	2
---	--------	------	---

---

t = -177,5438

p = 3,17226E-5=0.021

**Annex 06 :L'activité antibactérienne****Pour *Bacillus cereus***

Data	Mean	Variance	N
A	11,545 7,	13044	5
B	9,3	1,42656	5

t = -1,71609

p = 0,12448

**Pour *Listeria monocytogenes***

Data	Mean	Variance	N
A	12,025 8,	05	5
B	10,35 3,	96406	5

t = -1,08057

p = 0,31138.

**Pour *Salmonella. Spp***

Data	Mean	Variance	N
A	11,45 3,	64531	5
B	10,225 6,	30781	5

t = -0,86824

p = 0,41055

**Pour *Entérocooccus faecalis***

Data	Mean	Variance	N
------	------	----------	---

A	13,875	1,35156	5
B	14,65	1,33125	5

---

t = 1,05801

p = 0,32095

#### Annex 07 : L'activité antibactérienne

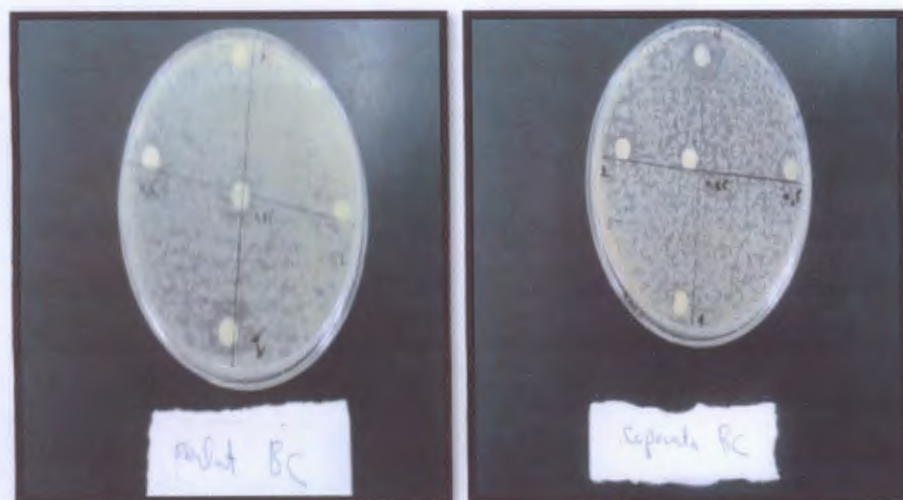


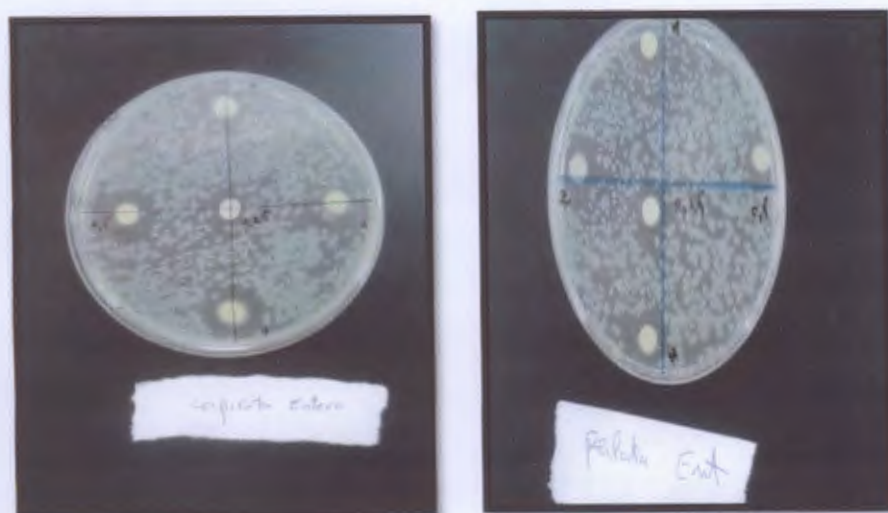
Figure 18 : Inhibition des extraits de *P. caperata* et *P. perlata* contre *Bacillus cereus*



Figure 19: Inhibition des extraits de *P. caperata* et *P. perlata* contre *Listeria monocytogenes*.



**Figure 20:** Inhibition des extraits de *P. caperata* et *P. perlata* contre *Salmonella*. S



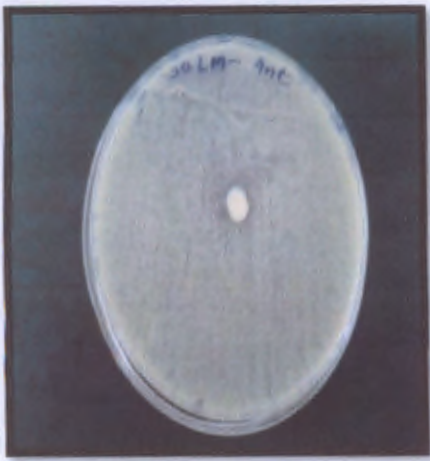
**Figure 21:** Inhibition des extraits de *P. caperata* et *P. perlata* contre *Entérocooccus faecalis*.



**Figure 22:** L'effet de l'antibiotique sur  
*Bacillus cereus*



**Figure 23:** L'effet de l'antibiotique  
sur *Entérocooccus faecalis*



**Figure 24 :** L'effet de l'antibiotique sur *Salmonella*



**Figure 25:** L'effet de l'antibiotique sur *Listeria monocytogenes*

Présenté par : BOUMEDJIREK Yasmina  
DEGHBAR Fatima Zohra

Encadreur : M<sup>me</sup>SALEM.S

Data de soutenance:02/07/2016

### Thème

Contribution à l'étude phytochimique de lichen *parmelia perlata* et *parmelia caperata* de Parc National de Taza

Nature du diplôme : Master 2 en biologie : phytopharmacie et gestion des agrosystèmes

### Résumé

Notre travail est porté sur l'étude phytochimique des extraits méthanoliques de deux espèces de lichen *Parmelia caperata* et *Parmelia perlata*, l'analyse quantitative permet de mettre en évidence la richesse des extraits testés en composés phénoliques, phénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés.

L'évaluation de l'activité antioxydante montre que les extraits méthanoliques testés possèdent une capacité de réduction de fer et de piégeage du radical libre DPPH intéressante avec une  $IC_{50}=0,29$  mg/ml pour *Parmelia Perlata*, le potentiel antibactérien des extraits lichéniques a été évalué par la méthode de diffusion en milieu gélosé, qui ce ont montré un bon pouvoir inhibiteur contre les souches testés.

**Mots clés :** lichens, phytochimie, polyphénols, activité antioxydante, activité antibactérienne.

### Abstract

Our work is focused on the phytochemical study of the metanolic extracts of two lichen species *Parmelia caperata* and *Parmelia perlata*, the quantitative analysis allows to highlight the richness of the extracts tested in phenolic compounds, total phenols, flavonoids and tannins.

The evaluation of the antioxidant activity showed that the methanol extract tested exhibit an iron reducing capacity and free radical scavenging of DPPH with interesting with a  $IC_{50} = 0.29$  mg / ml for *Parmelia perlata*. The antibacterial activity of the lichen extracts was evaluated by agar diffusion method, which showed a good inhibitory power against the tested strains.

**Keywords :** lichens, Photochemistry, polyphenols, antioxidant activity, antibacterial activity

### المخلص

عملنا المنجز يهتم بالدراسة الفيتو كيميائية للمستخلص الميثانولي لنوعين من الاشنات حيث بين التحليل الكمي باحتواء هذه المستخلصات على المركبات الفينولية، الفلافونيدية و التاننا بوفرة، اما تقدير النشاط المضاد للأكسدة اظهر ان المستخلص الميثانولي المدروس بشكل قدرة على ارجاع الحديد، واسر الجدر الحر "DPPH".

تم تقدير النشاط المضاد للبكتيريا للاشنات بواسطة طريقة الانتشار في وسط جيلوزي و الذي اظهر قدرة معتبرة للنشاط المضاد للبكتيريا بالنسبة للسلاطات البكتيرية المدروسة.

الكلمات المفتاحية : الاشنات، الفيتو كيميائية، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.

