

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل

جامعة محمد الصديق بن يحيى
الطبيعية والحياة
المكتبة
رقم الجرد : 2417

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 الطبيعية والحياة

قسم علوم المحيط والعلوم الفلاحية

Mémoire de fin d'études

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

Option : Phytopharmacie et gestion des agrosystèmes

Thème

**Contribution à l'étude des métabolites secondaires et évaluation
de l'activité antibactérienne et antioxydante des extraits de deux
lichens du genre *Lobaria* : *L. pulmonaria* (L.) Hoffem et *L. virens*
(With.) Laundon**

Jury de soutenance :

Président : M^r KRIKA A.

Examinatrice : M^{me} LEMZERI H.

Encadreur : M^{elle} SALEM S.

Présenté par:

DJENNAS Mounira.

HAMIOUD Lamia.

Session: (Juin2016)

Laboratoire : Ecotoxicologie (8)

Numéro d'ordre :

Remerciement

Nous remercions avant tout "le bon Dieu " tout puissant qui nous a accordé la volonté et la force d'accomplir ce modeste travail.

Nous remercions en particulier notre encadreur M^{elle} Salem S de nous avoir aidé par ces conseils, ces remarques pertinentes et par sa collaboration effective pour l'élaboration et la réalisation de ce travail.

Nos vifs remerciements vont à M^r Krika A, prof à l'université de SADIK BEN YAHIA – Jijel, qui nous avons honoré en acceptant de présider le jury.

Nous tenons également à remercier M^{me} Lemzeri H, prof à l'université de SADIK BEN YAHIA – Jijel d'avoir bien voulu examiner notre travail.

Nous remercions tout particulièrement, directeur de Parc National de Taza - Jijel- pour son aide précieuse, sa disponibilité et ses conseil et M^r Ghribi A.

Enfin, nous remercions tous le personnel du laboratoire de biologie pour leur encouragement, gentillesse, conseils précieux et leur disponibilité.

A tout ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste Travail.

Lamia et Mounira

Dédicaces

Je dédie ce travail aux

À mes très chers parents pour leur encouragement qui n'ont jamais cessés de me consentir durant les années d'études,

À mes très chers parents

À mes chers frères BADISS, RABAH, HOUSSAM ET SAID

À mes chers sœurs FIROUZ, MARJEM et HALA

À mes oncles et mes tantes paternels et maternels

À toute ma famille

À mes chers amies surtout MOUNIRA, RAMA, RIMA, RADJA, HASSINA, HASSINA ET

FATIMA

À tous mes collègues de ma promotion 2016

À tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de cette mémoire

Lamia

Dédicaces

Je dédie ce travail aux

Être qui me sont les plus chers au monde, à ce qui m'ont encouragé et qui m'encouragent

toujours pour continuer mon chemin universitaire :

A mes très chers parents MESSAOUD et AZIZA

A mes chers frères ABDERRAHMEN, HEMZA et MAROUANE

A ma cher sœur NAWEL

A mes chers cousines AMEL, FATMA ZOÛRA, YASMINE, RANIA et SARAH

A toute ma famille surtout mes tantes HOÛRIA, SALIHA et HASSINA

A mes chers amies NAZIHA, NASSIMA, LAMIA, ZAHIA, SARAH, HASSINA et HASSINA

A mes collègues de 2ème année phytopharmacie et gestion des agrosystèmes

A tous ceux qui ont participé pour que je puisse terminer ce travail.

Mounira

- : pas d'inhibition

% : pourcentage

%I : pourcentage d'inhibition

[] : Concentration

[μg (EAG) / mg EB] : microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme

[μg (EQ) / mg EB] : microgramme équivalents de quercitrine par milligramme

\pm : plus ou moins

μg : microgramme

μl : microlitre

Abs : Absorbance

AC as : Acide ascorbique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AlCl_3 : trichlorure d'aluminium

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

$^{\circ}\text{C}$: Degré Celsius

Cm : centimètre

CMI : concentration minimale inhibitrice

DPPH \cdot : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl

EB : Extraits brut

E_c : Ecart -type

E_q : Equivalent

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

Fe³⁺ : fer ferrique

Fe²⁺ : fer ferreux

FeCl₃ : trichlorure ferrique

GPx : Glutathion peroxydase

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂SO₄ : acide sulfuriflue

H₃PMo₁₂O₄₀ : phosphotungestique

HCl : acide chlorhydrique

HO₂• : radical perhydroxyle

IC 50 : Concentration inhibitrice a 50%

K₃Fe(CN)₆ : ferricyanure de potassium

L. v : *lobaria virens*

L. p : *lobaria pulmonaria*

mg GEA /g extrait : microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait

Mo₈O₂₃ : molybdène

NS : Pas de différences significatives

O₂•⁻ : Radical superoxyde

O₂•⁻ : Radical superoxyde

OH : Hydroxyle

PNT : Parc National de Taza

RL : Un radical libre

RLO : Radical libre oxygéné

RO• : Radical alkoxyle

RO₂• : Radical peroxyde

SOD : Superoxyde dismutase

T° : température

TCA : Acide trichloracétique

UV: Ultraviolet

W₈O₂₃ : tungstène

Figure n°01 : Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens.....	P03.
Figure n°02 : Principaux types des thalles lichéniques.....	P04.
Figure n°03 : Différents structure du thalle	P05.
Figure n°04 : Quelques organes des portés par le thalle.....	P06.
Figure n°05 : Thalle de <i>Lobaria pulmonaria</i> (L.) Hoffm.....	P09.
Figure n°06 : Thalle de <i>Lobaria virens</i> (With.).....	P10.
Photo n°07 : <i>Lobaria pulmonaria</i> (L.).....	P10.
Photo n°08 : <i>Lobaria virens</i> (With.).....	P11.
Figure n°09 : Voies de biosynthèse des métabolites secondaires de lichen.....	P14.
Figure n°10 : Carte de localisation du Parc National de Taza.....	P20.
Figure n°11 : Lieu de récolte (forêt de Guerrouche).....	P21.
Figure n°12 : Protocole de l'extrait brut.....	P22.
Figure n°13 : Teneurs en phénols totaux des deux extraits lichéniques.....	P32.
Figure n°14 : Teneur en flavonoïdes des deux extraits lichéniques	P33.
Figure n°15 : Teneur en tanins condensés de l'extrait brut des deux lichens étudiées.....	P34.
Figure n°16 : Pourcentages d'inhibition de l'activité antiradicalaire des extraits méthanoliques et de l'acide ascorbique.....	P35.
Figure n°17 : Valeurs d'IC50 de nos extraits méthénoliques.....	P36.
Figure n°18 : Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques des deux lichens.....	P38.

Tableau I : Rendement d'extraction méthanoliques.....	P30.
Tableau II : Résultats des tests phytochimiques.....	P31.
Tableau III : Teneurs en phénols totaux, des extrais méthanolique de <i>L. pulmonaria</i> et <i>L. virens</i>.....	P32.
Tableau IV : Teneurs en flavonoïdes, des extrais méthanolique de <i>L. pulmonaria</i> et <i>L. virens</i>.	P33.
Tableau V : Teneurs en tannins condensés, des extrais méthanolique de <i>L. pulmonaria</i> et <i>L. virens</i>.....	P34.
Tableau VI : Pourcentage d'inhibition de l'activité anti radicalaire desdeux extraits.....	P35.
Tableau VII : Variations des absorbances des deux extraits étudiés et du standard.....	P37.
Tableau VIII : Effet de méthanol et l'antibiotique.....	P39.
Tableau IX : Diamètre des zones d'inhibition en mm obtenu par les extraits méthanoliques de <i>Lobaria pulmonaria</i> et <i>Lobaria virens</i>.....	P39.

Sommaire

*Remerciement**Dédicace**Abréviation**Liste des figures**Liste des tableaux***Introduction**..... P01.**Synthèse bibliographique****Chapitre I : Généralité sur les lichens.**

I.1 Définition	P02.
I.2. Identité des partenaires lichéniques.....	P02.
I.2.1. Partenaire fongique (mycobionte)	P02.
I.2.2. Partenaire chlorophyllien (phycobionte).....	P02.
I.3. Rôle des deux partenaires.....	P02.
I.4. Morphologie et structure du thalle.....	P03.
I.4.1. Morphologie du thalle.....	P03.
I.4.2. Structure du thalle lichénique	P04.
I.4.2.1. Structure homéomère.....	P05.
I.4.2.2. Structure hétéromère	P05.
I.5. Reproduction des lichens.....	P05.
I.5.1. Reproduction asexuée ou reproduction végétative.....	P05.
I.5.2. Reproduction sexuée (champignon seul).....	P06.
I.6. Répartition des lichens.....	P07.
I.7. Propriétés des lichens.....	P07.
I.8. Usages des lichens.....	P08.
I.9. Etude descriptive des espèces étudié.....	P09.
I.10. Position systématique des deux lichens étudiés.....	P10.

**Chapitre II : Les métabolites secondaires
des lichens et leurs bio-activités**

II.1. Métabolisme.....	P12.
II.1.1. Métabolites secondaires lichéniques.....	P12.
II.1.2. Voies de biosynthèse des métabolites secondaires des lichens.....	P13.
II.1.3. Rôle des substances lichéniques.....	P16.
II.2. Bioactivité des métabolites secondaires lichéniques.....	P16.
II.2.1. Activité antioxydante.....	P16.
II.2.1.1. Un antioxydant.....	P16.
II.2.1.2.. Systèmes de défense.....	P16.
II.2.1.3. Espèces réactives de l'oxygène et les radicaux libres.....	P17.
II.2.1.4. Voie métabolique de l'oxygène et des ERO (espèces réactives de l'oxygène).....	P18.
II.2.1.5. Stress oxydatif.....	P18.
II.2.2. Activité antibactérienne.....	P18.
II.2.2.1. Antibiotiques.....	P19.
II.2.2.2. Mécanismes probables de l'action antimicrobienne des lichens.....	P19.
II.2.2.3. Résistance des bactéries aux antibiotiques.....	P19.

Partie expérimentale**Chapitre III : Matériels et méthodes.**

III.1. Présentation du site d'échantillonnage.....	P20.
--	------

III.2.Méthodologies	P20.
III.2.1.Récolte et choix des espèces	P20.
III.2.2. Préparation du matériel végétal (lichens).....	P21.
III.2.3. Etude phytochimique	P23.
III.2.3.1. Analyse qualitative	P23.
III.2.3.2. Analyse quantitative	P24.
III.2.4. Evaluation de la bioactivité	P26.
III.2.4.1. Evaluation de l'activité antioxydante	P26.
III.2.4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne	P28.

Chapitre IV : Résultats et interprétation

IV.1. Rendement d' extraction	P30.
IV.2. Etude phytochimique	P30.
IV.2.1. Analyse qualitative (scrining phytochimique).....	P30.
IV.2.2. Analyse quantitative	P31.
IV.2.2.1. Détermination de la teneur des phénols totaux	P37.
IV.2.2.2. Détermination des flavonoïdes	P32.
IV.2.2.3. Détermination des tanins condensés	P33.
IV.3. Evaluation de la bioactivité	P34.
IV.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante	P34.
IV.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne	P38.

Chapitre V : Discussion des résultats

Conclusion	P42.
Références bibliographique	P43.
Annexe	

Introduction

Les lichens ne sont connus avec certitude que depuis le tertiaire, mais on peut admettre qu'ils remontent à des temps aussi anciens (Boullard, 1997), ils ne constituent pas un embranchement naturel des végétaux, mais sont des organismes primitifs résultant de la symbiose d'un partenaire fongique et d'un organisme photosynthétique, soit une algue ou une cyanobactérie. Plus de 20.000 espèces connues de lichens ont été identifiés et habitent divers écosystèmes. Ils sont présents sur tous les substrats, les écorces, les tiges, les feuilles et dans le sol, mais poussent souvent dans des habitats qui sont moins favorables pour les plantes supérieures. (Kosanić et al, 2014).

Les lichens produisent de nombreux métabolites secondaires caractéristiques qui sont uniques dans la nature appelés aussi « acides lichéniques ». La plupart de ces substances sont de nature phénolique, tels que les anthraquinones, les dépsides, les dépsidones et l'acide usnique (Diniz et al, 2015) et qui représentent parfois jusqu'à 40% aux moins du poids sec du lichen. Bien que moins utilisés que les plantes en médecine traditionnelle, ils sont devenus plus récemment des sources potentielles de substances biologiquement actives vu leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antiviraux, et cytotoxiques (Verma et al, 2015).

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

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

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une étude phytochimique de deux lichens *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm et *Lobaria virens* (With.) Laundon, récoltée du Parc National de Taza, les objectifs de notre travail sont :

- ✓ L'analyse qualitative et quantitative du contenu en polyphénols, flavonoïdes et tanins condensés de l'extrait méthanolique de ces espèces.
- ✓ Evaluation de la bioactivité de cet extrait, pour une éventuelle valorisation du potentiel antioxydant et antibactérien de ces lichens.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I
Généralités sur les lichens

I.1. Définition

Le terme de « lichen » est d'origine grec et se trouve pour la première fois dans les écrits de Théophraste (IV^e siècle avant notre ère) qui désignent des plantes croissant sur les troncs des arbres, auxquelles on attribuait à l'époque des vertus médicinales (Ozenda et Clausade, 1970).

Les lichens sont formés par l'association symbiotique de deux organismes : l'un hétérotrophe, un champignon est le mycobionte, l'autre photoautotrophe est le photobionte qui peut être une Algue (et l'on emploie alors souvent le terme de *phycobionte*) ou une cyanobactérie (parfois nommée cyanobionte), ou les deux (Robert et Catesson, 2000).

Le développement des deux espèces est étroitement coordonné, si bien qu'il en résulte un thalle unique, dont la forme et l'organisation sont stables et constantes (Genevès, 1992).

I.2. Identité des partenaires lichéniques

I.2.1. Partenaire fongique (mycobionte)

Les champignons appartiennent le plus souvent à la classe des Ascomycètes ou à celle des Basidiomycètes (Lüttge et al, 1996). Dans la 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).

I.2.2. Partenaire chlorophyllien (phycobionte)

Phycobionte ou algue, le terme est commode mais ne recouvre pas totalement la réalité (Durrieu, 1993). En effet, l'algue est généralement une *Algue verte* coccale et parfois trichale ou une *Algue bleue* (cyanobactérie) (Lüttge et al, 1996).

I.3. Rôle des deux partenaires

Les lichens ne possèdent pas des racines, ils puisent leur nourriture dans l'eau qui les humidifie (Scheidegger et al, 2002).

L'association d'une algue et d'un champignon ; une symbiose est considérée généralement comme étant une association trophique de deux organismes dans laquelle les deux partenaires trouvent un bénéfice réciproque (Figure n°01) (Jahns, 1996).

Le photobionte assure néanmoins l'essentielle de la survie nutritionnelle des lichens (Silar et Malagnac, 2013). Il réalise la photosynthèse par des pigments assimilateurs et apporte sucres et vitamines (vitamine B) au mycobionte.

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

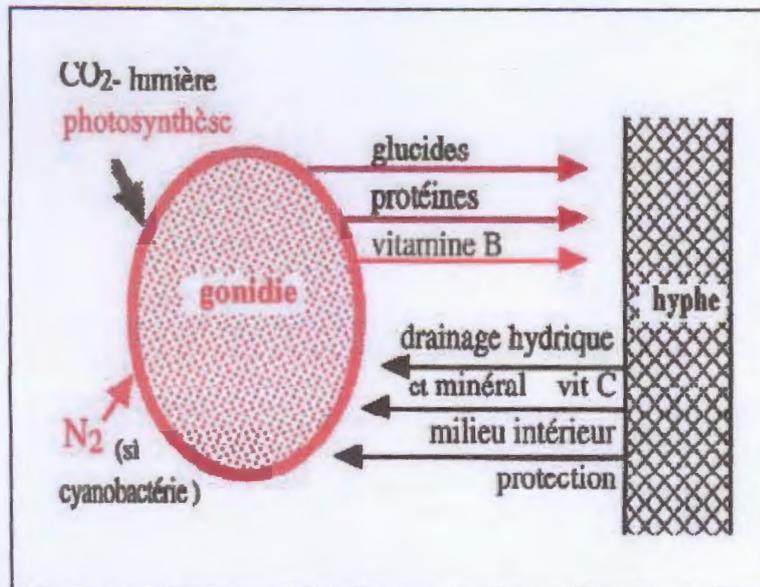


Figure n°01 : Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens (Roland et al, 2008).

I.4. Morphologie et structure du thalle

I.4.1. Morphologie du thalle

Les lichens sont inclus dans les Thallophytes, vaste ensemble de végétaux dépourvus de tiges, de feuilles, de racines et qui ne sont donc pas vasculaires (Van Haluwyn et Lerond, 1993).

Le corps d'un lichen, appelé thalle, est essentiellement constitué d'hyphes fongiques. Chez certains lichens, les cellules du photobionte sont dispersées dans le thalle. Cependant, les cellules photosynthétiques forment habituellement une couche dans la zone supérieure du thalle (Nabors, 2008).

Dans la construction de thalle, l'algue est représentée par des cellules ou gonidies et le champignon est représenté par des hyphes (Amirouch et al, 2009).

Selon la structure de leur thalle on distingue (07) groupes des lichens (Figure n°02) (Clauzade et Roux, 1987 ; Bourdial, 2000 et Laberche, 2010) :

- **Thalles crustacés**

Forment une croûte incrustée dans leur substrat, lichens du genre *Lecanora*, *Caloplaca*.

- **Thalles foliacés**

Ils forment des lames le plus souvent lobées, facilement séparables du substrat, plus ou moins appliquées sur celui-ci ou bien plus ou moins redressées, avec la face inférieure le plus souvent garnie de fausses radicelles (rhizines) ; lichen du genre *Lobaria*, *Pamélia*, *Xantaria*.

- **Thalles squamuleux**

Les thalles squamuleux typiques 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 ; lichen du genre *Squamarina*, *Normandina*.

- **Thalles gélatineux**

Sont noirâtres, rigides et opaques quand ils sont secs. Ils gonflent en masses gélatineuses sombres mais translucides sous l'influence de l'humidité, lichen du genre *Collema*, *Leptogium*.

- **Thalles fruticuleux**

Assez ramifier, n'adhérant à leur support qu'en un point ; lichen du genre *Ramalina*, *Evermia*.

- **Thalles composites**

Possèdent un thalle primaire foliacé et un thalle secondaire dressé, lichen du genre *Cladonia*, *Stereocaulon*.

- **Thalles lépreux**

Thalles lépreux, formés de petits granules (0,1 - 0,2 mm) avec surface non lisse (différente de celle des granulations des thalles granuleux qui est lisse), lichen du genre *Lepraria*.



Figure n°02 : Principaux types des thalles lichéniques.

(a) Thalle crustacé (Ertz et Duvivier, 2006) ; (b) Thalle foliacés ; (c) Thalle squamuleux ; (d) Thalle gélatineux (Bricaud, 2010) ; (e) Thalle fruticuleux ; (f) Thalles composites (Vries et Vries, 2008) ; (g) Thalle lépreux (Bricaud, 2010).

I.4.2. Structure du thalle lichénique

La structure du thalle des lichens est, dans l'ensemble, moins variable que la morphologie (Ozenda et Clauzade, 1970).

Selon Genevès, (1990) et Amirouch et *al*, (2009) deux grands types structuraux peuvent être distingués (Figure n°03).

I.4.2.1. Structure homéomère

Une structure Homogène dans toute l'épaisseur du thalle. Les gonidies ou cellules de l'algue isolées ou format des couronnes sont mélangées aux hyphes du champignon dans toute l'épaisseur du thalle. Dans le cas du *Collema* l'algue est une cyanobactérie (*Nostoc*). Néanmoins, on peut y observer une limite corticale supérieure et une limite inférieure.

I.4.2.2. Structure hétéromère

Dans les thalles des lichens hétéromères, le mycélium fongique entoure la couche algale. Le thalle est limité par le cortex supérieur et le cortex inférieur. Les gonidies et les hyphes sont réparties en couche superposées ou concentriques.

- Couche gonidiale
- Médulle (hyphes)

Le cortex inférieur peut présenter des filaments destinés à la fixation. Ce sont des rhizoïdes ou rhizines.

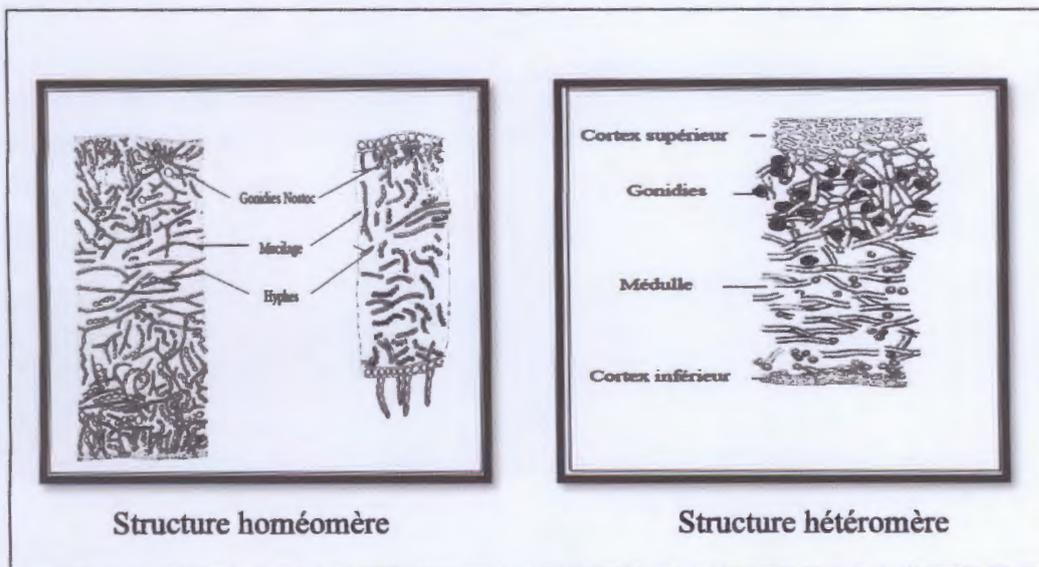


Figure n°03 : Différents structure du thalle (Ozenda et Clauzede, 1970).

I.5. Reproduction des lichens

Les lichens se reproduisent selon deux voies : sexuée et végétative (asexuée) (Figure n°04).

I.5.1. Reproduction asexuée ou reproduction végétative

La reproduction végétative du lichen peut se faire soit par simple fragmentation du thalle, à la suite notamment de contraintes mécaniques (arrachement par le vent, piétinement par des animaux,

etc.) (Serusiaux et al, 2004), soit par le jeu d'organes spéciaux, les sorédies ou les isidies (Ozenda, 2000 ; Durrieu, 1993 ; Boullard, 1988) :

- **Isidies** : Ce sont des excroissances coniques du thalle qui se cassent facilement et peuvent redonner naissance à un thalle.
- **Soralies** : Apparaissent comme des plages pulvérulentes qui crèvent le cortex supérieur. Leur étendue est très variable suivant les espèces : depuis de petites taches punctiformes jusqu'à recouvrir la surface totale du thalle (*Lecanora expallens*). Elles doivent leur aspect pulvérulent à la production de sorédies.
- **Soredies** : Forme de propagations végétative chez de très nombreux lichens. Apparât à la surface du thalle, au niveau d'une soralie, un petit glomérule, non cortiqué mais mixte.

I.5.2. Reproduction sexuée (champignon seul)

La multiplication des lichens par voie sexuée pose un problème particulier ; seul le mycobionte en est capable ; il formera les fructifications typiques du champignon libre (Jahns, 1996). Dans ce cas il existe multiples organes qui participent à ce mode de reproduction qui sont : les apothécies, les périthèces et les lirelles (Nash, 2008 ; Bungartz et al, 2002) :

- **Apothécies** : Le disque a formé le corps fruitier d'un lichen qui produit les spores fongiques. Les apothécies sont habituellement tout à fait remarquables, bouton-comme des structures sur la surface de thalle.
- **Périthèces** : Noires ou de couleur sombre le plus souvent, sont en forme de poires plus ou moins globuleuses, plus ou moins enfoncées dans le thalle ou dans le substrat.
- **Lirelles** : Sont des apothécies allongées plus au moins enfoncées dans le thalle appelées aussi ascocarpes libérant des spores qui donnent des hyphes.

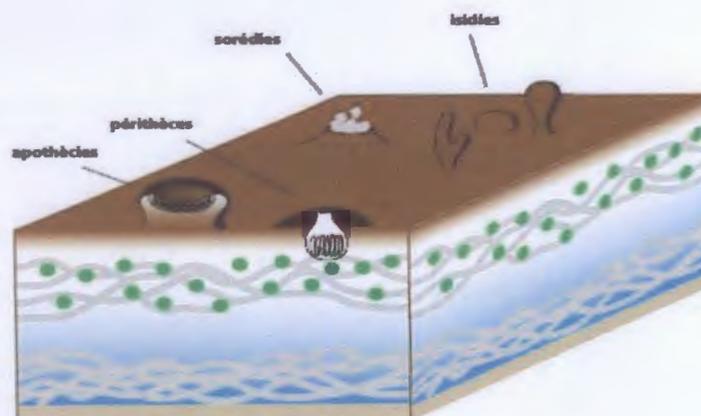


Figure n°04 : Quelques organes portés par le thalle (organes de reproduction) (Vust et al, 2015).

Le thalle des lichens portant ainsi d'autres organes qui ont un rôle de déterminant dans l'identification des lichens tels que (Boullard, 1988 ; Jahns, 1996 ; Humbert, 2012) :

- **Cils** : Organes fins et allongés en forme de fil visibles à l'œil nu, constitués de plusieurs couches de cellules, de couleur différente du thalle, blanc ou noir, généralement à la périphérie ou sur la surface du thalle .
- **Rhizines** : Élément fixateur du thalle des lichens sur leur substrat .une rhizine est constituée par l'association en mèche de plusieurs hyphes fongique.
- **Pseudocyphelles** : Sont des pores respiratoires, simples trous dans le cortex.

I.6. Répartition des lichens

Les lichens seraient parmi les premiers organismes à avoir colonisé la terre ferme (Vust et *al*, 2015). Il est aisé de les observer dans les espaces proches de l'homme : murs, toitures, piquets, fils électriques... etc. Dans la nature, ils colonisent très fréquemment les troncs et les branches des arbres, les rochers et les sols de tous types de milieux (landes, pelouses ouvertes, terrains sableux ou caillouteux...) (Bellenfant et *al*, 2010).

Les lichens croissent dans les biotopes les plus divers. Ils manquent seulement dans la mer à des profondeurs supérieures à 10 mètres, au centre des grandes villes, où la pollution atmosphérique est importante, et sur les tissus animaux vivants (Clauzade et Roux, 1987). Selon la nature de leurs substrats on distingue :

- Les lichens colonisant les troncs et les branches des arbres vivants sont dits **corticoles**;
- Les espèces croissant sur les rochers forment le groupe des lichens **saxicoles** ;
- Les quelques espèces poussant au sol sont dites **terricoles** ; les lichens croissant sur les mousses sont dits **muscicoles** et sont ici intégrés dans les terricoles au sens large.
- Enfin, les espèces croissant sur le bois mort sont appelées **lignicoles** (Vust et *al*, 2015).

I.7. Propriétés des lichens

L'association lichénique apporte des propriétés structurales et biologiques qu'on ne trouve pas chez l'un ou l'autre des partenaires. Selon (Robert et Catesson, 2000 ; Ozenda, 2000 ; Boudreault et *al*, 2013) on peut distinguer les propriétés structurales et biologiques suivantes :

- **La reviviscence**: C'est une caractéristique essentielle des lichens qui permet d'expliquer leur mode de vie si particulier.
- **Résistance aux températures extrêmes** : Une respiration mesurable a été observée chez certains espèce à -10°C ; l'assimilation, elle, peut être encore active à -40°C .

- **Originalité des voies métaboliques** : La biochimie et le métabolisme des lichens semblent différer sensiblement de ceux des autres végétaux, au moins dans certains aspects, dont deux seront évoqués ici : la synthèse carbonée, et l'élaboration de substances spécifiques dites « acides lichéniques ».

- Les lichens sont des organismes poïkilohydriques, c'est-à-dire qu'ils n'ont pas de mécanisme pour réguler leur perte et leur gain en eau.

I.8. Usages des lichens

• Usages alimentaires

Dans l'écosystème, les lichens sont une source de nourriture pour de nombreuses espèces (Junior, 2010). Ils ont été employés comme nourriture pour l'homme ou le bétail, mais seulement dans les régions très pauvres ou bien en période de disette ou guerre (Ozenda, 2000).

• Usages médicaux

Les lichens, comme d'autres mycètes, sont des sources riches des produits chimiques uniques. Les lichens peuvent avoir des composés antibiotiques de qui pourraient être employés dans la médecine. Les systèmes médicaux traditionnels de partout dans le monde ont employé des lichens comme *Usnea* pour des infections bactériennes. Comme d'autres mycètes, les lichens doivent protéger leurs tissus contre la croissance bactérienne (Boucher et Millbank, 2010). Le principale intérêt des lichens en médecine semble être actuellement la possibilité d'en extraire des antibiotiques (Ozenda, 2000).

• Usages industriels

Il s'agit surtout de matières colorantes. Ce sont ordinairement des substances du groupe des depsides (Ozenda, 2000). Les substances lichéniques sont responsables de la coloration des lichens et ont des multiples applications en teinturerie et parfumerie (Bellenfant et al, 2010).

Les huiles essentielles de certaines espèces de lichens sont utilisées pour la fabrication de parfums et de savons (Boustie, 2013).

• Usage en bio-indication

Les lichens constituent d'excellents bio-indicateurs de contamination de l'atmosphère (Ramade, 1993). Ils sont très sensibles aux modifications de leur environnement et aux pollutions environnementales (Nabors, 2008).

Les lichens sont un bon exemple d'organismes ayant un grand pouvoir d'accumulation de polluants transportés par l'eau de pluie (Lévêque et Mounoulou, 2001).

I.9. Etude descriptive des espèces étudiées

a. Présentation de lichen *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffem

Le lichen pulmonaire est une espèce épiphyte, photophile qui trouve son optimum en climat montagnard humide ou perhumide (Daviau et Jegat, 2011), très sensible aux moindres modifications de leur milieu (Bricaud, 2010), son thalle est foliacé, grand-lobé, excédé souvent 20 à 30 centimètres de diamètre (Nascimbene et al, 2010), fixé par quelques points seulement, de forme irrégulier (Figure n°05). Les apothécies sont marginales, en forme de disque de 1 à 4 mm de diamètre, de couleur brun rouge (Daviau et Jegat, 2011).

Selon la littérature, quatre mois sont nécessaires pour un ancrage du lichen sur le tronc et 2 ans ½ pour obtenir un thalle de 1mm², 4 ans pour les premières soralies (multiplication végétative du lichen) et 20 ans pour les premières apothécies (reproduction sexuée du champignon). Jusqu'à la mort de l'arbre (Daviau et Jegat, 2011). Il préfère des forêts avec un âge moyen des arbres plus de 100 ans (Jüriado et Liira, 2009).

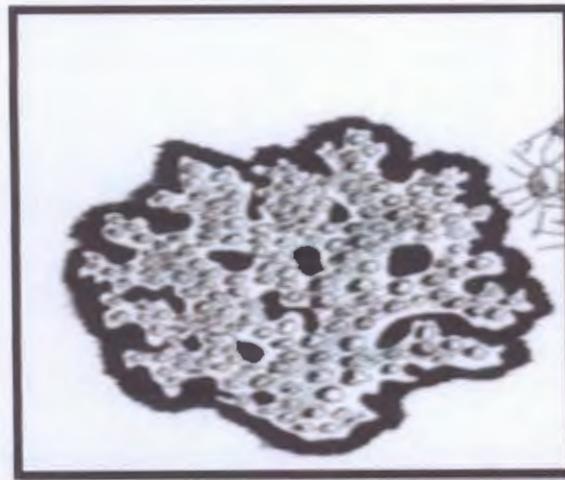


Figure n°05 : Thalle de *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffem (Boullard, 2001).

b. Présentation de lichen *Lobaria virens* (With.) Laundon

C'est une espèce qui pousse également radialement à partir des marges de lobes établis étroitement attachés à l'écorce, mais il se trouve généralement sur les troncs inférieurs en plus d'ombre (Wolseley et James, 2000), leur thalle est foliacé, excédé souvent 3 à 10 mm de largeur et 30 cm de longueur, de couleur vert clair et un peu brillant lorsqu'il est mouillé, après séchage devient vert pâle-gris ou gris-brun, elle a une surface lisse ou ridé (Figure n°06). Cette espèce ne contient pas les isidies et les sorédiés mais elle a des apothécies fréquentes de 1 à 8 mm de Ø, leur disque orangé à brun-rouge, le bord thallin épais et rigide (Tiévant, 2001 ; Lin, 2013).

Lobaria virens se trouve dans les sites avec une humidité atmosphérique élevée (Wolseley et James, 2000).



Figure n°06 : Thalle de *Lobaria virens* (With.) Laundon (Tiévant, 2001)

- **Utilisation**

Ils ont été appliqués largement dans la médecine folklorique pour le traitement des diverses maladies, telles que l'eczéma, des maladies respiratoires, des maladies pulmonaires et de l'arthrite, utilisant aussi comme nourriture et de produits de beauté (Süleyman et al, 2003 ; Atalay, 2011).

Ils ont été principalement employés dans des maux de poumon (par exemple, tuberculose, asthme, toux, sang de cracher), mais également pour des affections hépatiques, comme stimulant d'appétit, pour la diarrhée, pour l'écoulement menstruel lourd, et à cesser de saigner. Il a été habituellement bouilli avec de l'eau ou lait et bu ou transformé en un onguent pour utilisation externe (Ranković, 2015).

I.10. Position systématique des deux lichens étudiés

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

- ✓ **Classification de *L. pulmonaria* (L.) Hoffm**

Classe : Ascolichens

Sous classe : Discolichens

Ordre : Cyclocarpales

Sous ordre : Cyanophilinées

Famille : Stictacées

Genre : *Lobaria*

Espèce : *Lobaria pulmonaria*



Photo n°07 : *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.

✓ **Classification de *L. virens* (With.) Laundon**

Classe : Ascolichens

Sous classe : Discolichens

Ordre : Cyclocarpale

Sous ordre : Cyanophilinées

Famille : Stictacées

Genre : *Lobaria*

Espèce : *Lobaria virens*



Photo n°08 : *Lobaria virens* (With.) Laundon.

Chapitre II

Les métabolites secondaires des lichens et leurs bio-activités

II.1. Métabolisme

Par définition le métabolisme est l'ensemble des réactions chimiques qui se déroulent dans un organisme est appelé métabolisme (Hopkins, 2003).

Phénomène physiologique qui contrôle le flux de l'énergie et le cycle de la matière chez un organisme (Ramade, 2002). Ils se rangent en deux groupes antagonistes : l'anabolisme, ensemble des processus d'assimilation, et le catabolisme, ensemble des processus de dégradation des métabolites et d'excrétion des déchets (Ramade, 2008).

Le métabolisme (*du grec : metabolê, changement*) est un processus très dynamique. Les molécules sont en continuel renouvellement ; la composition d'une cellule à un instant donné est un équilibre entre synthèse et dégradation. L'essentiel des synthèses est orienté vers la production de molécules qui sont importantes pour la structure et le fonctionnement de la cellule (Hopkins, 2003).

II.1.1. Métabolites secondaires lichéniques

Les lichens produisent des centaines de produits secondaires extracellulaires uniques dont beaucoup appartiennent à des classes de composés rarement trouvés dans d'autres organismes (Culberson et Armaleo, 1992).

Actuellement le nombre de substances lichéniques identifiées dépasse les 1050 (Boustic, 2013 ; Molnár et Farkas, 2010), dont les plus connus sont l'acide usnique, composés phénoliques, anthraquinones, dibenzofuranes, depsides, depsidones, depsones, triterpènes, lactones gamma et de l'acide pulvinique (Gayathri et Swamy, 2012 ; Sati et Joshi, 2011), mais le plus intrigant est l'acide usnique, roduit par plusieurs espèces de lichens (Silar et Malagnac, 2013) ; *Parmila, Usmea, Sticta*.

Les métabolites synthétisés par les lichens ont été divisés en deux groupes: primaire et secondaire (Lawrey, 1986 ; Gayathri et Swamy, 2012) :

Les métabolites primaires sont des produits intracellulaires qui sont directement impliqués dans les activités métaboliques des lichens tels que la croissance, le développement et la reproduction. Ils comprennent des protéines, des acides aminés, des polyols, des caroténoïdes, des vitamines et des polysaccharides, qui sont liées aux parois cellulaires et des protoplastes. Ils sont souvent solubles dans l'eau et peuvent être extraits avec de l'eau bouillante. Certains de ces métabolites primaires sont produites par des champignons et certains par les algues, ou les deux (Shukla et al, 2014 ; Ranković et Kosanić, 2015).

La majorité des composés organiques présents dans les lichens sont des métabolites secondaires (Ranković et Kosanić, 2015), ils sont connus comme les acides de lichen ou de substances de lichen (Shukla et al, 2014). Toutes les substances secondaires dans les lichens sont d'origine fongique (Ranković et Kosanić, 2015 ; Shukla et al, 2014). Ces substances chimiques de divers lichens s'accumulent sur les surfaces externes des hyphes, qui sont faiblement solubles dans l'eau et peuvent

généralement être isolées à partir des lichens par des solvants organiques (Ranković et Kosanić, 2015 ; Sujetovienė, 2015).

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

Les métabolites secondaires de lichen sont dérivés de trois voies chimiques : voie d'acétate-polymalonate, voie d'acide shikimique et voie d'acide mévalonique (Figure n°09) (Ranković et Kosanić, 2015 ; Le Pogam et *al*, 2015).

- **Voie de Acétate-polymalonate** : comprend les composés les plus courants de lichen tel que :
 - Les acides aliphatiques secondaires, les esters et les dérivés relatifs
 - Les composés phénoliques mononucléaires
 - Depsides, tridepsides et esters benzyliques
 - Depsidones et esters diphényliques
 - Depsones
 - Dibenzofuranes, les acides usnique et leurs dérivés
 - Anthraquinones et xanthones biogénétiquement liés
 - Chromones
 - Naphtoquinones
 - Xanthones
- **Voie de l'acide mévalonique** comprend :
 - Di -, sester- et triterpènes
 - Stéroïdes
- **Voie de l'acide shikimique** comprend :
 - Terphenylquinones
 - Dérivés d'acides pulvinique

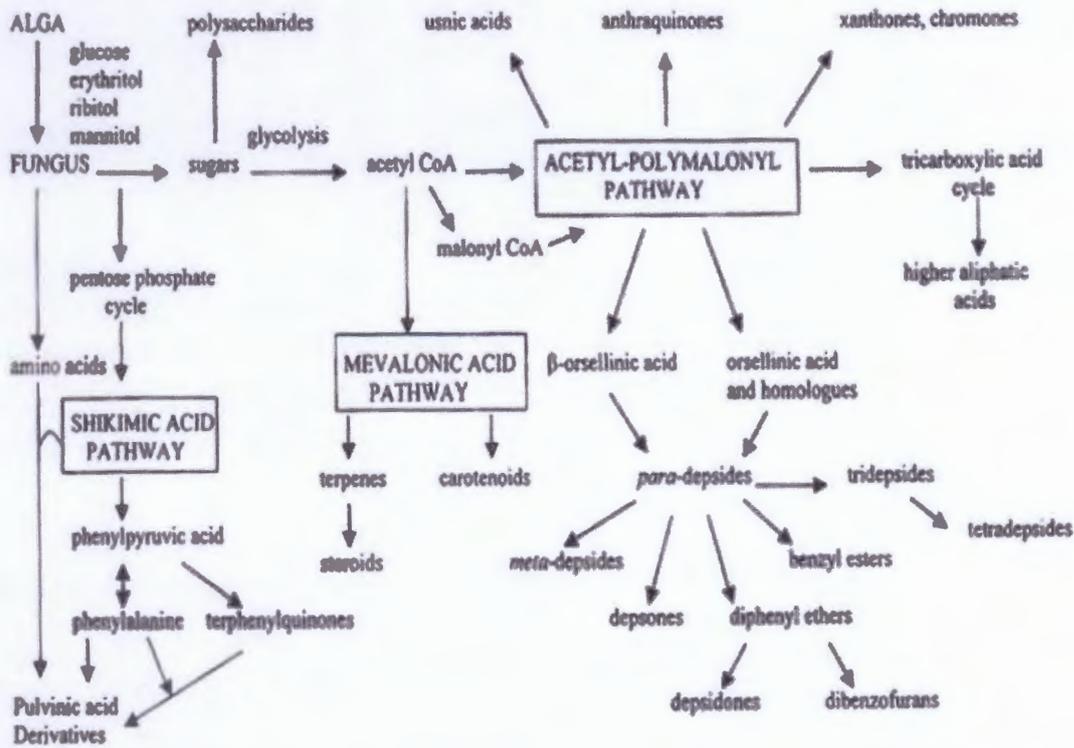


Figure n°09 : Voies de biosynthèse des métabolites secondaires de lichen (Ranković et Kosanić, 2015 ; Le Pogam et al, 2015).

Les composés de métabolisme secondaires sont classés en 3 grandes classes :

- Les composés aromatiques ou polyphénols (acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanidines, tannins), et les quinones ;
- Les terpénoïdes et leurs dérivés (Merghem, 2009) ;
- Les substances azotées (Marouf et Reynaud, 2007).

a. Composés phénoliques (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, hétéroside (Bruneton, 2009). Au nombre d'environ 4500, sont des molécules aromatiques, formées en particulier par la voie de l'acide shikimique (Meyer et al, 2004).

Les polyphénols constituent un groupe de substances variées et ubiquistes, En font partie les flavonoïdes, les tanins, les dérivés phénylpropanoïdes (Marouf, 2000).

• Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont également des phénylpropanoïdes (Morot-Gaudry et Prat, 2009). Sont des pigments quasiment universels des végétaux, presque toujours hydrosolubles. Ils assurent ainsi la

protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultraviolet (Bruneton, 1993). Ils sont capables de moduler l'activité de certaines enzymes et de modifier le comportement de plusieurs systèmes cellulaires, suggérant qu'ils pourraient exercer une multitude d'activités biologique (Ghedira, 2005).

- **Tanins**

Composés phénoliques hydrosolubles ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols (Bruneton, 2009 ; Robert et Catesson, 2000 ; Merghem, 2009), on peut considérer que les tanins sont des formes phénoliques condensées capables de se lier aux protéines en solution et de les précipiter (Macheix et al, 2006).

L'intérêt principal des tannins pour les plantes se trouve avant tout dans leur action protectrice (Nultsch, 1998). Ils sont des macromolécules qui se divisent selon leur structure en deux groupes principaux : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

- **Lignines**

Les lignines sont des molécules complexes qui sont accumulées dans les parois végétales (rigidité des tiges) avec des polysaccharides comme la cellulose et les hémicelluloses (Morot-Gaudry et Prat, 2012).

- b. Terpènes (terpénoïdes)**

Les terpénoïdes sont des polymères constitués d'unités en C₅ (Lüttge et al, 2002), ils existent chez toutes les plantes est représentant de loin la plus vaste catégorie de métabolites secondaires (Raven et al, 2007). Les terpènes sont les principaux constituants des inclusions huileuses rencontrées dans les tissus sécréteurs des plantes (Morot-Gaudry et Prat, 2012).

- **Saponines**

Le mot saponine est dérivé du mot latin *sapo*. Les saponines ont reçu leur nom du fait qu'elles produisent une mousse semblable à celle du savon (Hart et al, 2008), Ils sont des glycosides à poids moléculaire élevé (Wink et Van Wyk, 2008), regroupant un ensemble complexe et chimiquement très diversifié de molécules triterpéniques ou stéroïdes. Elles se composent d'une fraction aglycone hydrophobe (un noyau stéroïdique ou triterpénique) liée à une chaîne mono ou polysaccharidique hydrophile (Wallace, 2004).

- c. Substances azotées :**

Les composés azotés se caractérisent par le fait qu'elles contiennent de l'azote et que dans la plupart des cas celui-ci entre dans leur structure moléculaire sous la forme d'un acide aminé ou de son dérivé décarboxylase (Richter, 1993).

II.1.3. Rôle des substances lichéniques

Les métabolites secondaires ou acides lichénique sont connus pour protéger les lichens contre l'augmentation des contraintes environnementales telles que l'exposition à la lumière (Shukla et al, 2014), 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).

Les métabolites secondaires jouent un rôle de la protection contre les dégâts des animaux ; car certains lichens sont fortement toxiques comme *Letharia vulpina* (Ozenda et Clauzade, 1970)

II.2. Bioactivité des métabolites secondaire lichinique

Les lichens produisent une grande variété de métabolites secondaires et la plupart d'entre eux est unique dans la nature (Kosanić et Ranković, 2015). De nombreuses substances ont été isolées avec succès et identifiées à partir du thalle naturel, dont les activités biologiques ont été déterminées : l'activité antivirale, antitumorale, antibactérienne, antifongique, l'antiherbivore, l'antioxydante et l'effet analgésique (Molnár et Farkas, 2010 ; Kosanić et Ranković, 2015 ; Manojlovic et al, 2010).

La majorité des lichens contiennent des antibiotiques utilisés contre les attaques parasitaires, un certain nombre sont bactériostatiques ou fongistatique (c'est-à-dire qu'ils empêchent la croissance des bactéries ou des champignons) (Robert et Catesson, 2000).

II.2.1. Activité antioxydante

Les caractéristiques antioxydantes des matériaux d'origine végétale peuvent être attribuées à leur teneur en polyphénols (Lugasi et al, 2003). Certains composés phénoliques de lichen ont une grande capacité à piéger les radicaux libres toxiques produite par la lumière UV (Le Pogam et al, 2015 ; Nash, 2008).

II.2.1.1. Un antioxydant

Les antioxydants sont des composés réducteurs (Malki et al, 2012) qui ont le potentiel de capturer les radicaux libres résultants de stress (Ganesan et al, 2015).

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

II.2.1.2.. Systèmes de défense

Dans des conditions normales, l'équilibre entre la génération et la diminution du RLO est commandé par système de défense antioxydant (Kosanić et Ranković, 2015). Ces systèmes peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques.

a- Systèmes antioxydants enzymatiques

Un système de défense primaire composé d'enzymes et de substances antioxydantes.

- Superoxyde dismutase (SOD) : assurent l'élimination de l'anion superoxyde O_2^- par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Haleng et al, 2007) ;
- Catalase : transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau;
- Glutathion peroxydase (GPx) détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques.
- Les molécules piègeurs : le glutathion (GSH), l'acide urique, les protéines à groupement thiols, ubiquinone, . . . etc (Mika et al, 2004 ; Carip, 2008).

Un système de défense secondaire composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipases, des ADN endonuclease et ligase, des macroxyprotéinases (Mika et al, 2004).

b- Systèmes antioxydants non enzymatiques (naturels)

Les antioxydants non enzymatiques exogènes bien connus tels que (Beaudux et Durand, 2008) : le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques des extrait des plantes (Popovici et al, 2009), qui sont d'excellents piègeurs des RL et de très bons chélateurs des métaux de transition comme le fer et le cuivre (Haleng et al, 2007). Leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires (Talbi et al, 2015).

En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydants sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et superoxydes (O_2^\bullet) (Popovici et al, 2009).

II.2.1.3. Espèces réactives de l'oxygène et les radicaux libres

a- **Un radical libre (RL)** : est une espèce chimique (atome ou molécule, neutre ou chargée) possédant un électron célibataire (ou électron non apparié) sur sa couche périphérique (Moussard, 2007). Selon la définition proposée par halliwell et gutteridge, (1985), d'« espèces capables d'existence indépendante, contenant un ou plusieurs électrons non appariés », dits électrons célibataires (Bonnefont-Rousselot et al, 2003).

b- **Un radical libre oxygéné (RLO)** : Un radical libre oxygéné (RLO) possède un électron célibataire sur la couche périphérique d'un atome d'oxygène. Les principaux radicaux libres oxygénés sont (Moussard, 2007) :

- Le radical superoxyde (O_2^\bullet) ;
- Le radical perhydroxyle (HO_2^\bullet) ;
- Le radical hydroxyle ($^\bullet OH$) ;
- Le radical peroxyde (RO_2^\bullet) ;

- Le radical alkoxy ($\text{RO}\cdot$) ;

II.2.1.4. Voie métabolique de l'oxygène et des ERO (espèces réactives de l'oxygène)

L'oxygène peut subir des étapes successives de réduction conduisant à la formation d'ERO. En présence de métaux, de molécules organiques ou d'enzymes (oxydases ou complexes de la chaîne respiratoire), il est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$. Ce radical est le substrat d'enzymes essentielles, le superoxyde dismutases (SOD) qui le transforme en eau oxygénée H_2O_2 . L'eau oxygénée peut avoir plusieurs destinées (Barouki, 2006). En présence de métaux de transition (Fe^{++} , Cu^+), le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est converti par la réaction de Fenton en radical hydroxyl $\cdot\text{OH}$ (et ion hydroxyle OH^-) (Moussard, 2007). Ce dernier est extrêmement réactif et va oxyder très rapidement les molécules voisines formant parfois d'autres radicaux libres (Barouki, 2006).

II.2.1.5. Stress oxydatif

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant (Pincemail et al, 1999). Dans certaines situations, la production des RLO augmente fortement, entraînant un stress oxydant que l'on définit comme (Moussard, 2007) : un déséquilibre entre la production des radicaux libres et la capacité de défense antioxydante (Feriani et al, 2012).

Le stress oxydatif est une perturbation de l'équilibre entre les oxydants et les antioxydants. Il a été défini par Helmut Sies de la manière suivante: ". Le stress oxydatif est un changement dans le pro-oxydant / équilibre antioxydant en faveur de la première, qui pourrait conduire à des dommages biologiques" Le résultat est des produits de dégâts moléculaires, qui sont des marqueurs de stress oxydatif (Packer, 2000).

- **Conséquences du stress oxydant**

Le stress oxydant est impliqué dans de très nombreuses maladies (Favier, 2003) tel-que : l'athérosclérose, diabète sucré, maladie inflammatoires, maladie d'Alzheimer...etc (Delattre et al, 2003).

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Barouki, 2006).

II.2.2. Activité antibactérienne

Les métabolites secondaires du lichen sont des substances actives contre les micro-organismes pathogènes. Les substances les plus connues de lichen avec une activité antimicrobienne sont : les composés phénoliques, les triterpènes, les stéroïdes, les anthraquinones, les depsides, les depsidones, les dapsones et l'acide usnique ; la plupart d'entre eux sont des mécanismes connus pour leur action antibiotique (Ranková et Kosanić, 2015 ; Yamamoto et al, 2015).

II.2.2.1. Antibiotiques

Pour les industries pharmaceutiques, la recherche de nouveaux antibiotiques est une préoccupation majeure en termes de santé publique. Un antibiotique est une substance chimique ayant une activité bactéricide (entraîne la mort) ou bactériostatique (empêche la croissance) sur des micro-organismes pathogènes, et permettant de traiter des infections.

Cependant, le développement de souches microbiennes résistantes aux antibiotiques conduit les industriels à développer de nouveaux composés (Davies et Davies, 2010).

II.2.2.2. Mécanismes probables de l'action antimicrobienne des lichens

Les propriétés antimicrobiennes des extraits de lichen et de leurs métabolites secondaires sont connus depuis longtemps (Piovano et al, 2002 ; Paudel et al, 2008 ; Micheletti et al, 2009) et encore d'évaluer les mécanismes de leurs effets.

- ✓ L'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne ;
- ✓ L'inhibition de la synthèse de la membrane cytoplasmique ;
- ✓ L'inhibition de la synthèse des protéines ;
- ✓ L'inhibition de la synthèse de l'acide nucléique (ADN et ARN).

II.2.2.3. Résistance des bactéries aux antibiotiques

L'utilisation, souvent abusive, des antibiotiques favorise l'évolution des bactéries vers la résistance entraînant fréquemment des échecs thérapeutiques. La résistance bactérienne peut être intrinsèque ou acquise. La résistance intrinsèque est spécifique d'espèce ou de genre et définit le spectre d'activité de l'antibiotique. La résistance acquise est présentée seulement dans certaines souches de l'espèce ou du genre. Elle est le résultat de mutations dans un gène localisé dans le chromosome de la bactérie ou dans un plasmide ou celui de l'acquisition d'informations génétiques, principalement par conjugaison ou transformation (Courvalin, 2007).

En outre, la recherche de nouveaux antibiotiques est difficile, et les échecs fréquents. Car trouver une molécule active sur certaines espèces bactériennes n'est pas suffisant. Encore faut-il s'assurer qu'elle pénètre dans la bactérie, qu'elle sélectionne peu de résistances, qu'elle est peu toxique, etc. Autant d'éléments qui font que les découvertes sont rares (Maraninchi, 2012).

Partie II
Partie expérimental



Chapitre III
Matériels et méthodes

III.1. Présentation du site d'échantillonnage

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 n°10).

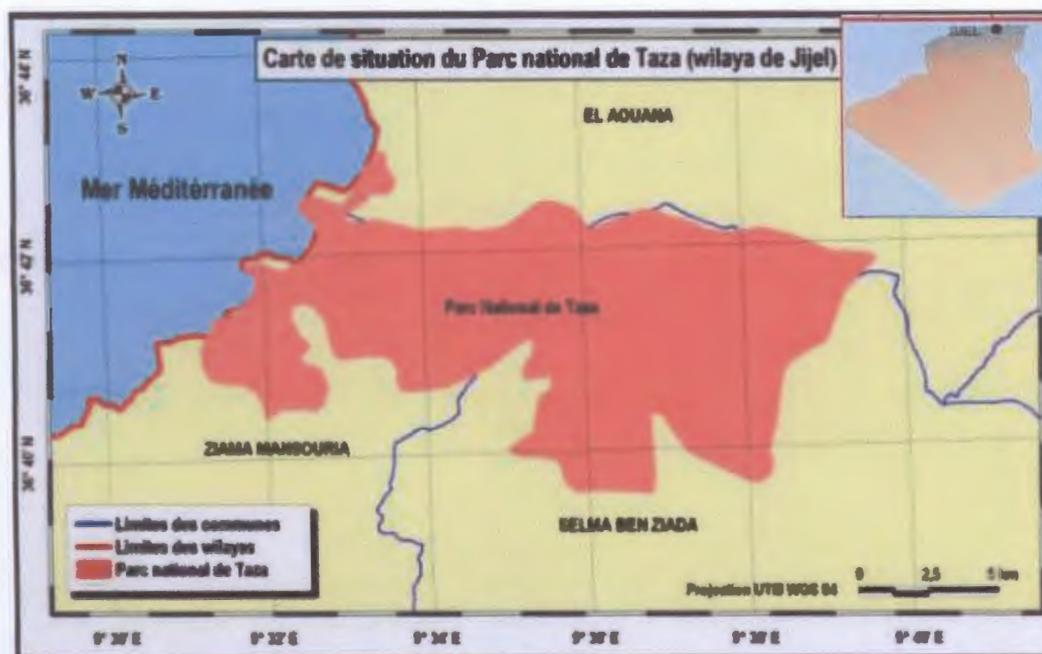


Figure n°10 : Carte de localisation du Parc National de Taza (PNT, 2016).

- **Biodiversité de PNT**

L'inventaire de la flore et de la faune du PNT regroupe une biodiversité remarquable estimée à 1825 espèces réparties sur les différents écosystèmes terrestres et marins.

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 (PNT, 2016).

III.2. Méthodologies

III.2.1. Récolte et choix des espèces

Une sortie sur le site a été réalisé en moi de Mars 2016, dans la Forêt de Gerrouche (Figure n°11), les prélèvements ont été effectués au niveau de deux stations, sur une altitude de 900 m dont

nous avons récolté plusieurs lichens, deux espèces du genre *Lobaria*, 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.



Source : Google earth.

Figure n°11 : Lieu de récolte (forêt de Guerrouche).

III.2.2. Préparation du matériel végétal (lichens)

a. Nettoyage, séchage et broyage

Les lichens récoltés ont été soigneusement nettoyés, débarrassés de tout artefacts (poussières, support, mousses....etc), puis séchés à l'air libre à température ambiante, pendant au moins sept 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.

b. Préparation des extraits des thalles lichéniques

Pour estimer le contenu polyphénolique des espèces étudiées on a utilisé le méthanol comme solvant d'extraction afin d'obtenir un bon rendement d'extraction.

c. Macération

Le principe consiste à faire imprégner 10 g de poudre de lichens de chaque espèce séparément est mis à macérer dans un volume de 100 ml du solvant (eau et méthanol), sous agitation magnétique pendant 48 h (Yu et Dahlgren ,2005).

L'extraction par le méthanol a été effectuée selon le protocole décrit dans la Figure (n°12) : Pour chaque lichens, l'extraction a été répétée trois ou quatre fois avec renouvellement du solvant

jusqu'à épuisement (afin d'extraire un maximum de métabolites) à température ambiante. Les extraits obtenus sont ensuite réunis séparément, puis filtrés (en utilisant du papier filtre).

Les deux extraits méthanoliques sont concentrés sous vide au rotavapeur rotatif à une température de 58 °C pour évaporer le solvant. Les résidus secs obtenus sont repris séparément par le méthanol pour chaque extrait puis conservés ensuite à une température de -18°C jusqu'à ce qu'ils soient utilisés dans les essais.

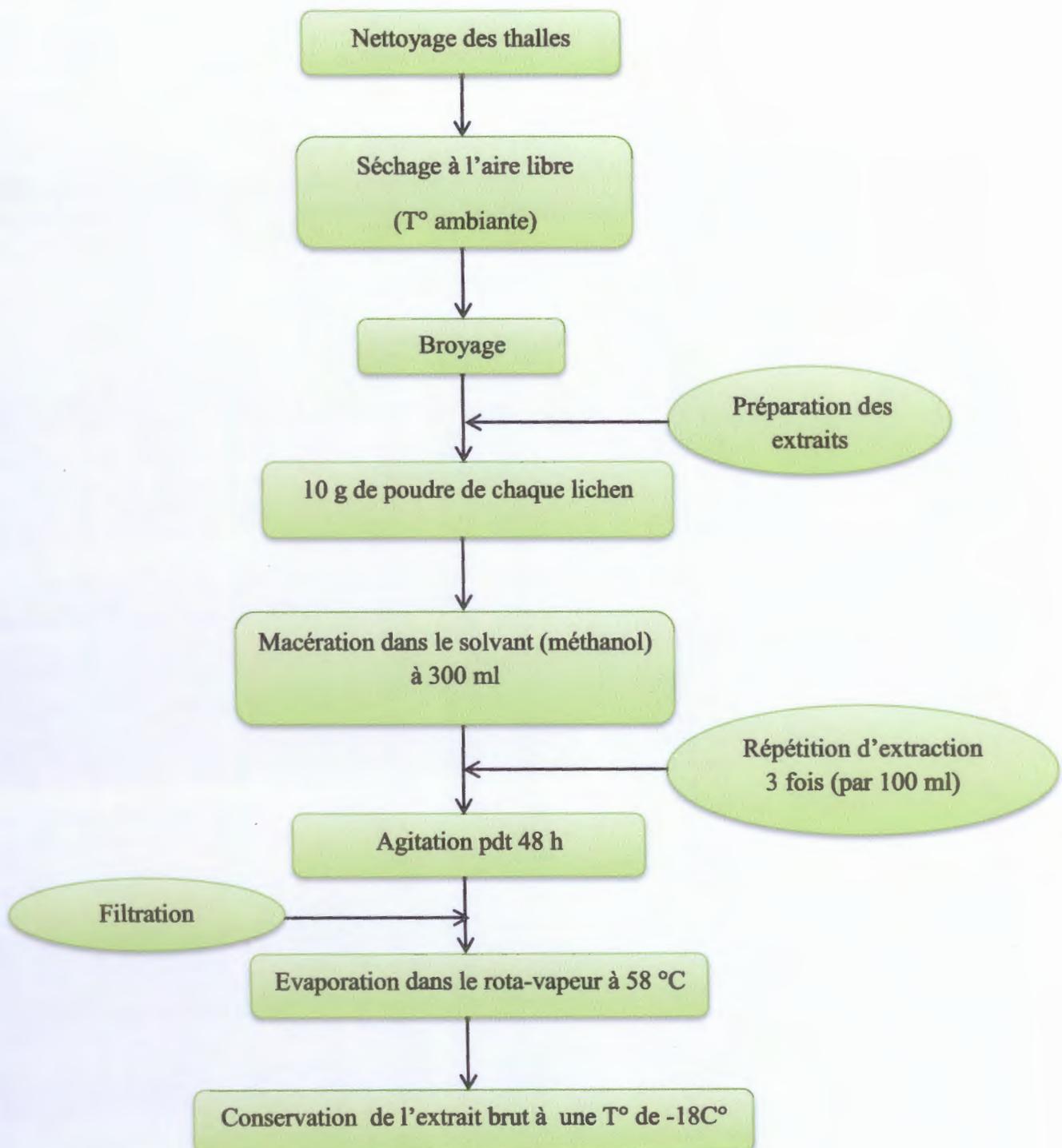


Figure n°12 : Protocole de l'extrait brut (Yu et Dahlgren, 2005).

d. Détermination du rendement d'extraction

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

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

Où :

R : Rendement d'extraction en (%) ;

Pr : Poids des résidus en (g) ;

Pi : Poids initial de la prise d'essai en (g).

III.2.3. Etude phytochimique

III.2.3.1. 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) et 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 tanins**

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 FeCl₃ diluée (1 %). L'apparition d'une coloration bleu-noire caractérise la présence des tannins galliques, verte ou bleu-verte celle des tannins cathéchiques.

- **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 des saponines.

- **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).

III.2.3.2. Analyse quantitative

- a. **Détermination de la teneur des phénols totaux**

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

- **Principe de la méthode**

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

- **Mode opératoire**

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

Après incubation du mélange pendant environ deux heures à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde de 760 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc constitué de tous les réactifs 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 (Annexe 01, Figure 1), la teneur en phénols totaux est donc exprimée comme un microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme de l'extrait brut [μ g (Eq AG) / mg EB].

$$Y = 0,019 x - 0,039$$

$$R^2 = 0,990$$

b. 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 totaux 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.

• 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 Q) / mg extrait brut en utilisant l'équation ci-dessous obtenue à partir de la courbe d'étalonnage de la quercétine [μg (Eq Q) / mg EB] (Annexe 01, Figure 2) :

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

$$R^2 = 0,995$$

c. 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 mélanger 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 (Annexe 01, Figure 3).

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

$$Y = 0,077 x + 0,0002$$

$$R^2 = 0,998$$

III.2.4. Evaluation de la bioactivité

III.2.4.1. 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 \cdot (1,1- Diphenyl-2-picrylhydrazyl) et le pouvoir réducteur de fer.

a. Activité antiradicalaire contre le DPPH \cdot

• Principe de la méthode

L'activité antiradicalaire de nos extraits est mesurée *in vitro* par le pouvoir du piégeage du DPPH \cdot (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 « ΦOH »), le DPPH \cdot 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 \cdot :



• Dosage

Selon la méthode décrite par (Dorman et *al*, 2004) :

2 ml de la solution méthanolique de DPPH \cdot (0,05 mg/ml) ont été ajoutés à 1ml de la solution d'extrait méthanolique testée à différentes concentrations (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 1 ml de méthanol avec 2ml de la solution de DPPH \cdot .

- **Expression des résultats**
- ✓ **Pourcentage d'inhibition**

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

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

Où :

I% : pourcentage d'inhibition ;

Abs contrôle négatif : absorbance du DPPH[•] (solution de DPPH[•] + méthanol) ;

Abs test : absorbance de l'échantillon ou standard (contrôle positif).

- **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). Plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante d'un composé est grand.

L'IC50 a été calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés à partir des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait testées et du standard utilisé).

b. 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 (Fe³⁺) dans le complexe K₃Fe(CN)₆ en fer ferreux (Fe²⁺) 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 µl de l'extrait méthanolique à différentes concentrations [8mg/ml, 4mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,125mg/ml] est mélangé avec 400 µl du tampon phosphate (0,2 M à pH 6,6) et 400 µl de ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) [10g/l, (1%)]. Après incubation du mélange à 50°C pendant 30 minutes, et après refroidissement un volume de 400 µl 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 µl de surnageant de chaque solution sont mélangés avec 400 µl de l'eau distillée et 100 µl de chlorure de fer [Fe Cl₃ 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.

III.2.4.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

Pour estimer l'activité antibactérienne de nos extraits nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé appelé aussi antibiogramme, une méthode qui a pour but la détermination de la concentration minimale inhibitrice de la croissance bactérienne (CMI).

- **Bactéries testées**

Le test a été effectué sur quatre souches bactériennes de deux groupes différents : Gram-positifs représentés par *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), et Gram-négative présentés par *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

- a. **Méthode**

Selon (Behera et al, 2005) :

Après repiquage sur bouillon nutritif des inoculums bactériens ont été transférées dans des tubes à essai contenant de l'eau physiologique afin d'avoir des suspensions microbiennes ayant une turbidité, exprimée par la mesure de la densité optique (0,08 - 0,1) à 600 nm, et qui correspond à 10⁸ UFC/ml, voisine à celle de McFarland de 0.5. Par la suite la surface entière de la gélose (Gélose Mueller Hinton) a étéensemencée à l'aide d'un écouvillon stérile par cette suspension microbienne.

A partir d'une gamme de concentrations d'extrait lichénique [4mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25mg/ml], des disques stériles de papier filtre de 6 mm de diamètre ont été imprégnés de 15 µl de chaque concentration, les disques sont disposés à la surface de la géloseensemencée, ensuite les boîtes sont incubées pendant 18 à 24 heures à 37 °C dans une étuve.

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

Le méthanol a été utilisé comme contrôle négatif dans cette expérience. Un antibiotique (Ciprofloxacine) est parallèlement utilisé comme contrôle positif.

b. Expression des résultats

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

➤ Analyses statistiques

Tous les tests ont été répétés trois fois, les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels EXCEL 2010 et XLSTAT-RIB 2015.

Afin de déterminer la signification statistique de l'activité antioxydant, et antibactérienne le test t de Student a été utilisé. Les différences ont considérées significative à $p \leq 0,05$.

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type.

N S : Pas de différences significatives ($p > 0,05$).

* : différences significatives ($p \leq 0,05$).

** : différences hautement significatives ($p \leq 0,01$).

*** : différences très hautement significatives ($p \leq 0,001$).

Chapitre IV

Résultats et interprétation

IV.1. Rendement d'extraction

Les extraits méthanoliques obtenus après évaporation à sec sous vide ont été pesés. Le rendement de ces extraits a été obtenu en calculant le rapport entre la quantité de l'extrait brut obtenu et la quantité initiale de la matière végétale sèche de 10g. Le rendement des extraits méthanoliques des deux lichens est illustré dans le tableau ci-dessous (Tableau I) :

Tableau I : Rendement des extraits méthanoliques.

Echantillons	Extrait	Poids du résidu sec (g)	Rendement (%)	Aspect	Couleur
<i>L.pulmonaria</i>	méthanolique	1.37	13.7	visqueux	Marron
<i>L.virens</i>	méthanolique	1.19	11.9	visqueux	Vert

On remarque que le rendement d'extraction de l'extrait méthanolique de *Lobaria pulmonaria* est supérieur à celui de *Lobaria virens*.

IV.2. Etude phytochimique

IV.2.1. Analyse qualitative (screening phytochimique)

L'analyse qualitative des extraits méthanoliques obtenus nous a permis de mettre en évidence la présence de différents groupes métaboliques (Annexe 02).

Les tests de caractérisation phytochimique, réalisés sur nos extraits, sont donnés dans le tableau ci-dessous (Tableau II).

Tableau II : Résultats des tests phytochimiques.

Tests		Espèces	
		<i>L. pulmonaria</i>	<i>L. virens</i>
Détection des flavonoïdes	Test de tournures de magnésium	Couleur rouge orangé ⁺⁺⁺	Couleur rose ⁺⁺
Détection des tanins	Test de FeCl ₃	Couleur noire ⁺⁺ avec précipitation	Couleur verte ⁺⁺⁺ avec précipitation
Détection des saponines	Test de mousse	Formation d'une mousse ⁺⁺⁺	Formation d'une mousse ⁺⁺⁺
Détection des terpénoïdes	Test de Laskowski	Couleur violacée fugace virant ⁺⁺⁺	Couleur vert ⁺⁺⁺
		Test fortement positif ⁺⁺⁺	Test moyennement positif ⁺⁺

Les résultats obtenus à partir de l'analyse qualitative des extraits méthanoliques révèlent à la richesse de nos extraits en différents composés phénoliques notamment les flavonoïdes, les tanins, les saponines et les terpénoïdes.

IV.2.2. Analyse quantitative

Dans le but d'évaluer les teneurs en molécules actives des extraits méthanoliques étudiés, un dosage des phénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés a été effectué.

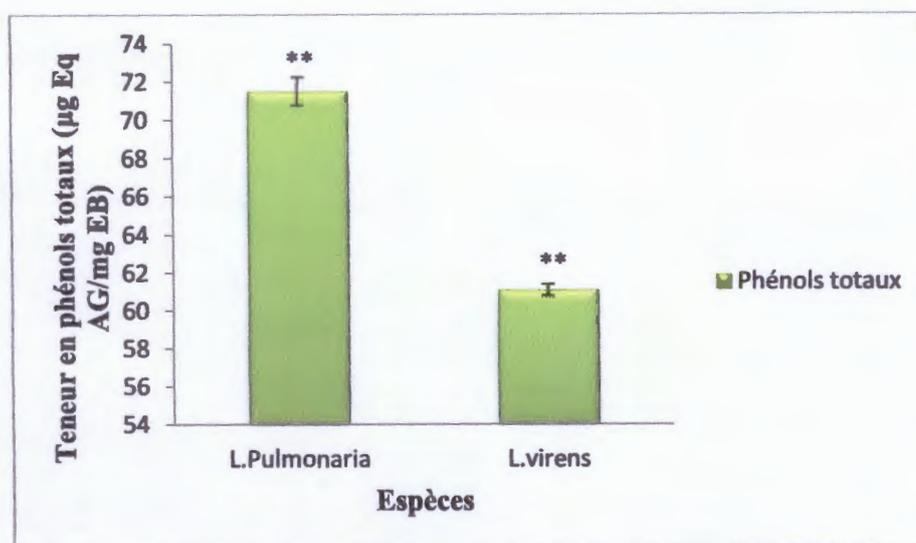
IV.2.2.1. Détermination de la teneur des phénols totaux

La teneur en phénol totaux de nos extraits méthanoliques a été effectuée en utilisant la méthode spectrophotométrique au réactif de Folin-ciocalteu, l'acide gallique est utilisé comme standard, nous a permis ainsi de réaliser une courbe d'étalonnage avec $R^2 = 0,99$.

Les teneurs sont exprimés en μg équivalent d'acide gallique par milligramme de l'extrait brut [μg Eq AG/mg], représentés dans le tableau ci-dessous (Tableau III) et illustrés graphiquement dans la figure n°13 :

Tableau III : Teneurs en phénols totaux, des extraits méthanolique de *L. pulmonaria* et *L. virens*.

Espèces	Moy ± Ec
	Phénols totaux µg Eq AG/mg EB
<i>L. pulmonaria</i>	71.505 ± 0.739
<i>L. virens</i>	61.082 ± 0.310

**Figure n°13** : Teneurs en phénols totaux des deux extraits lichéniques.

A partir de ces résultats on constate la richesse des extraits méthanoliques en phénols totaux, cependant la teneur la plus élevée est observée chez le lichen *Lobaria pulmonaria* elle est de l'ordre de [71.50 ± 0.739 µg Eq AG/mg EB] par rapport à celle noté pour *Lobaria virens* [61.08 ± 0.310 µg Eq AG/mg EB], cela montre une différence hautement significative entre les deux espèces étudiées ($P = 0.020$) (Annexe 3).

IV.2.2.2. Détermination des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de tri-chlorure d'aluminium ($AlCl_3$). La quercétine prise comme standard nous a permis de tracer une courbe d'étalonnage avec $R^2 = 0,99$.

La teneur en flavonoïde de nos extraits est rapportée en µg équivalent de la quercétine (Eq Q) par milligramme d'extrait brut de lichen.

Les résultats figurent dans le tableau (IV) et illustrées graphiquement dans la figure n°14.

Tableau IV : Teneurs en flavonoïdes, des extraits méthanolique de *L. pulmonaria* et *L. virens*.

Espèces	Moy ± Ec
	Flavonoïdes µg Eq Q/mg EB
<i>L. pulmonaria</i>	5.981 ± 0.069
<i>L. virens</i>	4.448 ± 0.080

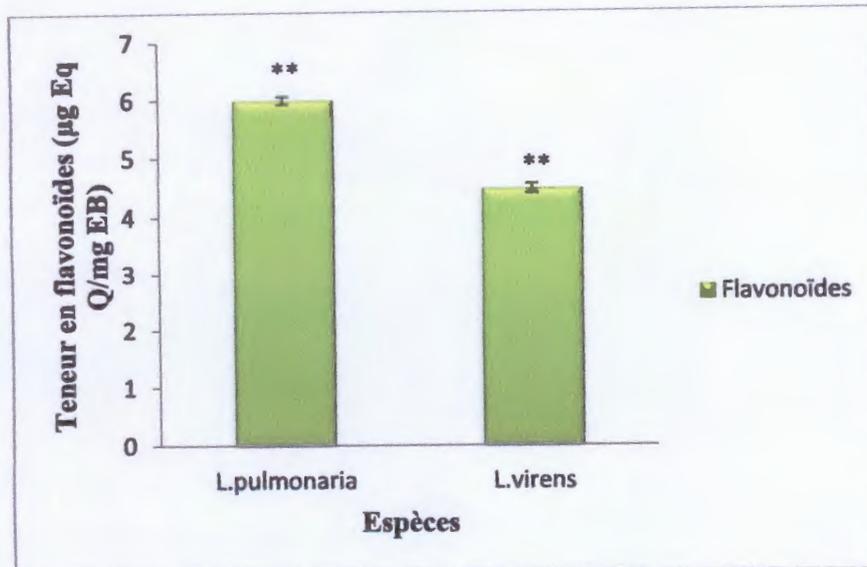


Figure n°14 : Teneur en flavonoïdes des deux extraits lichéniques .

Comme le montre la figure ci-dessus la teneur de l'extrait méthanolique du lichens *Lobaria pulmonaria* en flavonoides [$5.98 \pm 0.069 \mu\text{g Eq Q/mg EB}$], est plus élevée que celle notée par *Lobaria virens* [$4.44 \pm 0.080 \mu\text{g Eq Q/mg EB}$], ces résultats révèlent une différence hautement significative ($P = 0.02$) entre les deux espèces étudiées (Annexe 3).

IV.2.2.3. Détermination des tanins condensés

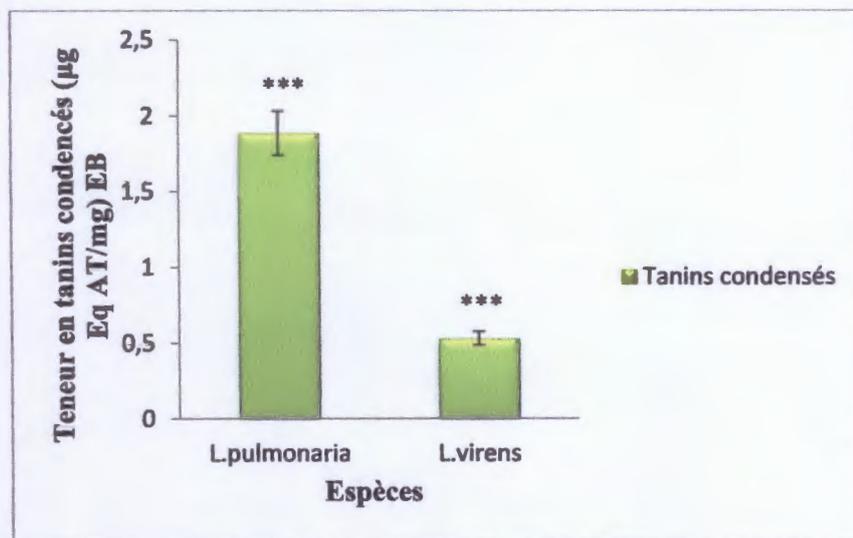
Le contenu des tanins condensés de nos extraits a été déterminé par la méthode de vanilline, en utilisant l'acide tannique comme standard, estimé à partir de la courbe d'étalonnage avec $R^2 = 0,99$.

La teneur en tanins condensés est exprimés en µg équivalent d'acide tannique par milligramme d'extrait brut de lichen [$\mu\text{g Eq AT/mg EB}$].

Les résultats sont représentés dans le tableau (V) et illustrées graphiquement dans la figure n°15.

Tableau V : Teneurs en tanins condensés, des extraits méthanolique de *L. pulmonaria* et *L. virens*.

Espèces	Moy ± Ec
	Tannins condensés µg Eq AT/mg EB
<i>L. pulmonaria</i>	1.886 ± 0.146
<i>L. virens</i>	0.529 ± 0.045

**Figure n°15 : Teneur en tanins condensés de l'extrait brut des deux lichens étudiées.**

D'après ces résultats on remarque que la teneur en tanins condensés de l'extrait méthanolique de *Lobaria pulmonaria* [$1.88 \pm 0.146 \mu\text{g Eq AT/mg EB}$] est plus élevée à celle enregistrée pour *Lobaria virens* [$0.52 \pm 0.045 \mu\text{g Eq AT/mg EB}$]. La teneur en tanins condensés révèle une différence très hautement significative entre les deux espèces ($P = 0.002$) (Annexe 3).

IV.3. Evaluation de la bioactivité

IV.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante

a. Activité antiradicalaire contre le DPPH'

Le test de DPPH' est choisie pour évaluer l'activité antioxydant de l'extrait méthanolique de nos lichens en raison de sa simplicité, sa rapidité ainsi que son efficacité.

Le tableau ci-dessous représente les pourcentages d'inhibition obtenus en fonctions de différentes concentrations de nos extraits méthanoliques étudiés. L'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence (Tableau V). Les résultats obtenus sont illustré sous forme des histogrammes dans la figure n°16.

Tableau VI : Pourcentage d'inhibition de l'activité anti radicalaire des deux extraits.

Concentrations	% d'inhibition		
	<i>L. pulmonaria</i>	<i>L. virens</i>	Acide ascorbique
0.125 mg/ml	45.20 ± 0.002	39.74 ± 0.009	48.08 ± 0.123
0.25 mg/ml	54.93 ± 0.003	43.81 ± 0.025	57.69 ± 0.007
0.5 mg/ml	61.86 ± 0.002	54.08 ± 0.017	65.31 ± 0.004
1 mg/ml	75.06 ± 0.006	68.24 ± 0.078	86.73 ± 0.002

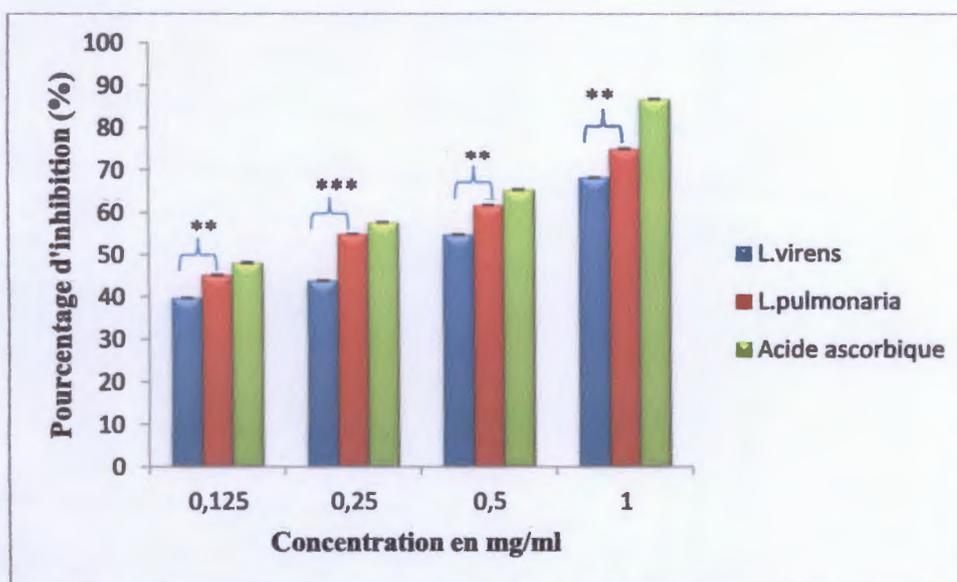


Figure n°16 : Pourcentages d'inhibition de l'activité antiradicalaire des extraits méthanoliques et de l'acide ascorbique.

La figure ci-dessus montr que les deux extraits méthanoliques présentent une capacité à piéger le radical DPPH'. Le pourcentage d'inhibitions est différent d'une concentration à une autre.

A partir des resultas enregistré nous constatons que les taux d'inhibitions de *Lobaria pulmonaria* et *Lobaria virens* sont inférieures à ceux enregistrés par l'acide ascorbique, pour toutes les concentrations, où nous avons noté le pouvoir d'inhibition maximal (% = 86.73) pour l'acide ascorbique, (% = 75.06) pour *Lobaria pulmonaria* et (% = 68.24) pour *Lobaria virens* à la concentration 1mg/ml.

On remarque que les % d'inhibition de *Lobaria pulmonaria* sont les plus élevée (Figure n° 16).

L'analyse statistique montre une corrélation significative entre le taux d'inhibitions et la concentration de l'extrait méthanolique des deux lichens étudiés, *Lobaria pulmonaria* et *Lobaria virens* a cel du standard avec respectivement $R^2 = 0.95$, $R^2 = 0.98$, $R^2 = 0.98$. Une variation hautement significative à été enregistrée entre les deux espèce étudiée a toute concentration avec ($P= 0.01$).

Selon les résultats obtenus on constate que le pourcentage d'inhibition est proportionnel à l'augmentation de la concentration de l'extrait car l'augmentation de pourcentage d'inhibitions est indicatrice d'une bonne activité anti-radicalaire (Subramanion, et al 2011). On constate que *Lobaria pulmonaria* présente l'activité anti-radicalaire la plus élevée.

➤ Calcul d'IC50

Afin de comparer du pouvoir anti-radicalaire nous avons calculé l'IC50 qui s'exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50%, qui est déterminé graphiquement par la régression linéaire établie entre les pourcentages d'inhibition et les différentes concentrations (Annexe 03), elle est exprimée en mg/ml ; cependant plus la valeur de IC₅₀ est petite, plus le pouvoir antioxydant de l'extrait testé est grand (Pokorny et al, 2001).

Les valeurs des IC50 trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans la figure n°17.

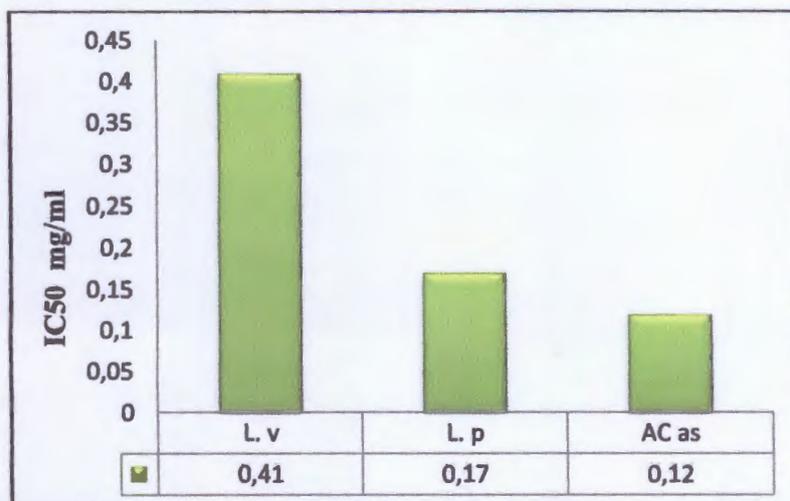


Figure n°17 : Valeurs d'IC50 de nos extraits méthénoliques.

Ces résultats confirment que l'extrait méthanolique de *Lobaria pulmonaria* nécessite la plus faible concentration pour piéger 50% du radical DPPH[•] (IC₅₀ = 0.17) mg/ml, tandis que la concentration de l'acide ascorbique inhibitrice est seulement 0,12 mg/ml.

b. Pouvoir réducteur (réduction de fer « FRAP »)

Pour évaluer la capacité réductrice de fer de nos extraits nous avons utilisé la méthode de FRAP, une analyse simple, rapide et reproductible, La réaction pour réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}) peut être mesurée par l'intensité de la solution bleue vert qui en résulte, cependant 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 8 mg/ml. Les valeurs des absorbances obtenues dans le tableau (VI) sont illustrées dans la figure (n°18) pour les deux espèces étudiées ainsi que pour l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif.

La figure (n°18) montre que le pouvoir réducteur de l'extrait de *Lobaria pulmonaria* est plus important que celui de *Lobaria virens*, et que le pouvoir réducteur de l'acide ascorbique est plus important que celui de *Lobaria pulmonaria* et *Lobaria virens* entre la concentration (0.25 mg/ml et 2 mg/ml). A partir de la concentration 2mg/ml le pouvoir réducteur de *Lobaria pulmonaria* est plus important que celui de l'acide ascorbique et *Lobaria virens*.

Tableau VII : Variations des absorbances des deux extraits étudiés et du standard.

Concentrations	Moy (ABS 700 nm) ± Ec		
	<i>L. pulmonaria</i>	<i>L. virens</i>	Acide ascorbique
0.25 mg/ml	0.26 ± 0.009	0.07 ± 0.033	0.44 ± 0.045
0.5 mg/ml	0.38 ± 0.036	0.24 ± 0.014	0.52 ± 0.012
1 mg/ml	0.78 ± 0.007	0.32 ± 0.033	1.27 ± 0.312
2 mg/ml	1.63 ± 0.100	0.63 ± 0.045	1.44 ± 0.007
4 mg/ml	2.28 ± 0.021	1.01 ± 0.035	1.56 ± 0.141
8 mg/ml	2.49 ± 0.095	1.49 ± 0.084	1.76 ± 0.622

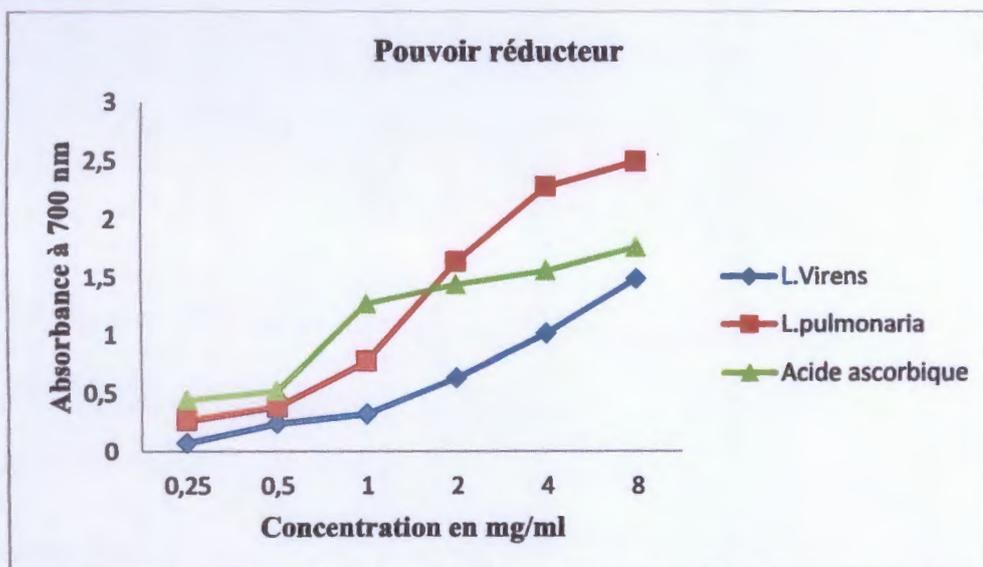


Figure n°18 : Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques des deux lichens.

Ces résultats montrent que l'extrait méthanolique de *Lobaria pulmonaria* a présenté une activité la plus grande pour réduire le fer par rapport à celles exercées par *Lobaria virens* et l'ascorbique, reflétée par les absorbances obtenues à différentes concentrations, dont nous avons enregistré l'absorbance maximale (Abs = 2.49 nm à la concentration 8 mg/ml).

En comparon avec l'acide ascorbique, l'extrait métanolique de *Lobaria pulmonaria* est le plus actif a partir de la concentration 2mg/ml.

L'analyse statistique montre une corrélation significative entre l'absorbance et la concentration de chac'un des extraits testés des deux lichens, *Lobaria pulmonaria*, *Lobaria virens* et du standard avec respectivement $R^2 = 0.80$, $R^2 = 0.95$, $R^2 = 0.68$. Une variation hautement significative à été enregistrée entre les deux espèce étudiée a toute concentration avec ($P= 0.001$).

Les résultats indiquent que la capacité de réduction de fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos extraits, cependant l'augmentation de l'absorbance est indicatrice d'un pouvoir réducteur élevé (Kosanić et Ranković, 2011).

IV.3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

Le potentiel antimicrobien de nos extraits lichéniques a été évalué en utilisant quatre souches bactériennes de différentes structures cellulaires *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* à Gram-positif tandis que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* sont à Gram-négatif. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (Tableau VIII).

Tableau VIII : Effet de méthanol et l'antibiotique.

Souches bactériennes	Méthanol (Control négatif)	Antibiotique 0,5 mg/ml
<i>S. aureus</i>	–	14,5±0,707
<i>B. cereus</i>	–	13,5±0,707
<i>P. aeruginosa</i>	–	11,5±2,12
<i>E. coli</i>	–	12,25±1,06

- : Pas d'inhibition

Le tableau ci-dessus montre que le méthanol n'a aucun effet inhibiteur sur les souches bactériennes testées. Par contre l'antibiotique possède une zone d'inhibition important.

Tableau IX : Diamètre des zones d'inhibition en mm obtenu par les extraits méthanoliques de *Lobaria pulmonaria* et *Lobaria virens*.

Concentration g/ml	<i>Lobaria pulmonaria</i>					<i>Lobaria virens</i>				
	0,25 g/ml	0,5 g/ml	1 g/ml	2 g/ml	4 g/ml	0,25 g/ml	0,5 g/ml	1 g/ml	2 g/ml	4 g/ml
<i>S. aureus</i>	–	–	7±0	8,5±0,707	9,5±0,707	–	–	7±0	8 ±0	8,5±0,707
<i>B. cereus</i>	–	–	–	8±0,707	9,5±0,707	–	–	–	7,5±0	8,5±0,707
<i>P. aeruginosa</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>E. coli</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Les extraits testés n'ont présenté aucun effet inhibiteur contre les souches testés pour les concentrations 0.25 mg/ml et 0.5 mg/ml. A partir de la concentration 1mg/ml on a enregistré des zones d'inhibitions avec un diamètre maximal (9,5 mm à la concentration 4mg/ml) enregistré pour l'extrait méthanolique du lichen pulmonaire (*Lobaria pulmonaria*) contre seulement deux souches *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus* par rapport à celles obtenus par l'antibiotique qui a montré un effet inhibiteur contre toutes les souches testés avec un diamètre maximal (14,5mm) (Annexe 4).

Chapitre V

Discussions des résultats

Les extraits naturels des lichens contiennent une variété de composés phénoliques auxquels sont attribuées diverses activités biologiques (Esteban, 2012).

A partir des résultats obtenus nous constatons la richesse des extraits testés en composés phénoliques, notamment les phénols totaux et les flavonoïdes, il a été démontré que l'extrait méthanolique de *Lobaria pulmonaria* a présenté significativement ($P = 0.020$) la teneur la plus élevée en phénols totaux et en flavonoïdes.

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

Il est important de noter que la méthode utilisée dans l'extraction notamment le choix du solvant ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent grandement le contenu total en phénols et en flavonoïdes, et par conséquent les bio-activités médiées par ces métabolites (Béhéra et al, 2005), les facteurs extrinsèques (facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, ont également une forte influence sur le contenu en composés phénoliques des plantes.

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, *Lobaria pulmonaria* a exercé le pouvoir le plus élevé contre le radical libre DPPH[•], ces résultats confirment que l'extrait méthanolique de *Lobaria pulmonaria* à une bonne activité par rapport à celle exercée par l'extrait de, *Lobaria virens* car il nécessite la plus faible concentration $IC_{50} = 0.17$ mg/ml pour piéger 50% de ce radical, cela est probablement lié à sa forte teneur en polyphénols.

✕ La capacité de réduction d'un composé est un indicateur significatif de son activité antioxydante (Sharma et al, 2012) la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) est mesurée par la force de la couleur vert-bleu de la solution qui absorbe à 700 nm, 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, nos extraits ont montrés un pouvoir réducteur qui varie en fonction de concentration.

Cela est probablement dû à la présence des groupements hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneurs d'électron qui peuvent réagir avec les radicaux libres pour les transformer en des produits plus stables (Sasikumar et al, 2010). ✕

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

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

L'étude réalisée par Karakus et al, (2009), montre que l'extrait méthanolique de *Lobaria pulmonaria* est d'une meilleure activité antioxydante, une autre étude réalisée par Odabasoglu et al, (2004) déterminent est la corrélation positive entre la puissance réductrice de l'extrait méthanolique de *Lobaria pulmonaria* et sa forte teneur en polyphénols ce qui signifie que les phénols sont de bon antioxydants.

Cela est en accord avec la littérature, où nous pouvons trouver un certain nombre de rapport pour l'activité antioxydante des extraits à forte teneur en composés phénoliques (Behera et al, 2009). Dans 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).

Les extraits méthanolique de *Lobaria pulmonaria* et *L.virens* ont une activité inhibitrice modérée contre les microorganismes testés. L'activité antimicrobienne varie en fonction de l'espèce et du solvant utilisé dans l'extraction (Rancović, 2015).

Les bactéries de l'espèce *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* avait la plus grande résistance, les bactéries les plus sensibles sont *Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*.

Une étude récente réalisée par Shrestha, (2015), a montré que l'extrait de *Lobaria pulmonaria* testé n'avait aucun effet sur la souche bactérienne d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

D'une manière générale, les bactéries à Gram négatif étaient plus résistantes que les bactéries Gram positif, cette différence de sensibilité peut être attribué à des différences morphologiques entre ces micro-organismes, surtout à des différences de perméabilité de la paroi cellulaire, sachant que la structure cellulaire des bactérie à Gram-positif est constituée de peptidoglycanes et d'acide téichoïques tandis que celle des bactéries à Gram-négatif est faite de peptidoglycanes, lipopolysaccharides et lipoprotéines (Kosanić et al, 2012).

A partir de ces résultats nous peuvent constater que les lichens sont une source des polyphénols, naturellement bioactifs.

Conclusion

Le présent travail s'inscrit dans le cadre d'une étude phytochimique visant à la valorisation des métabolites secondaires bioactive issus des lichens.

Les résultats ont montré que l'extrait méthanolique des deux espèces étudiées *Lobaria pulmonaria* et *Lobaria virens* sont riches en phénols totaux cela bien confirmé par des analyse qualitative et quantitative, en effectuant le dosage chlorométrique de Folin-ciocalteu qui nous a révélé que la forte concentration de ces molécules est notée pour l'espèce *Lobaria pulmonaria* [71,50 µg Eq AG/mg EB] par contre elle est moins pour *Lobaria virens* [61,08 µg Eq AG/mg EB].

L'étude de l'activité antioxydante des extraits testés en comparaison avec de témoin l'acide ascorbique, confirme leur puissance antioxydante.

La capacité antioxydante de *Lobaria pulmonaria* pour le test de piégeage du radical libre DPPH est plus importante que celle exercée par *Lobaria virens* est cela bien confirmé par la détermination de l'IC50, la concentration qui inhibe 50% du radical libre DPPH.

Le calcul de l'IC50 mètre en évidence le fort potentiel antioxydant de l'extrait lichénique de *Lobaria pulmonaria* (0,17 mg/ml) par rapport à celui de *Lobaria virens* (0,41 mg/ml).

Il faut noter que ces deux extraits ont montrés un bon pouvoir réducteur de fer est cela traduit par les valeurs des absorbance obtenues dont les plus élevés sont enregistrées chez *Lobaria pulmonaria* (2.49 mg/ml).

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion sur disque, les résultats ont montrés une faible activité antimicrobienne des extraits testés traduit par les faibles diamètres des zones d'inhibition observés par rapport à ceux exercés par l'antibiotique (Ciprofloxacine) sur les souches testées à Gram-positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus cereus*), tandis que les souches (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) à Gram-négatif manifestaient une résistance remarquable.

A partir de ces résultats on peut savoir l'importance des lichens comme source des substances bioactives qui jouent un rôle important dans la nature.

✓ *Perspective de recherche*

En perspectives de recherche il est très important de séparer, d'identifier et même d'isoler ces substances bioactive, qui peuvent répondre aux différents problèmes de la santé humaine.

Orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante et antibactérienne des métabolites secondaires synthétisés par les lichens.

Références bibliographiques

A

- Amirouche N., Bouguedoura N., Hadj-Arab H., (2009).** Botanique : Algues champignon lichens. *Houma*. Alger. 86 p.
- Atalay F., Halicim B., Mav A., Ahmet C, Akir., Odabas F., Glu O, Kazaz C, Aslan A., Irfan K., (2011).** Antioxydant phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. lichen species. *TÜBITAK*. Turk. 35 : 647 – 661.

B

- Barouki R., (2006).** Stress oxydant et vieillissement. *Medecine/Sciences*. N°3 Vol 22 : 266 – 272.
- Beaudux J.L., Durand G., (2008).** Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives. 2^{ème} Edition. *Lavoisier*. Paris. 607 p.
- Behera B.C., Verma N., Sonone A., Makhija U., (2009).** Optimization of Culture Conditions for Lichen *Usnea Ghattensis* G. Awasthi to Increase Biomass and Antioxydant Metabolite Production. *Food Technol. Biotechnol.* 47, 7–12.
- Behera B.C., Verma N., Sonone A., Makhija U., (2005).** Antioxydant and antibacterial activities of aichen. *Usnea Ghattensis In Vitro. Biotech. Lett.* 27: 991–995.
- Békro Y.A., Békro M.J.A., Boua B.B., Tra Bi F.H., Ehile E.E., (2007).** Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia Benthiana* (Baill) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae). *Sciences et Nature*. 4 : 217-225.
- Bellenfant S., Beguinot J., Vallade J., Sirugue D., Lemmel C., Le Groupe Lichens De Bourgogne (GLIB), (2010).** Les lichens une symbiose exemplaire. *Rev. Sci. Bourgogne-Nature*. 45 p.
- Bonnefont- Rousselot D., Théron P., Delattre J., (2003).** Radicaux libres et antioxydants. In : Biochimie pathologique aspects moléculaires et cellulaires. **Delattre J., Durand G., Jardillier J-C.** Flammarion printed in France. Paris. 317 p.
- Boucher D., Millbank L., (2010).** Lichens. Neighborhood naturalist, *Winter*. Crvallis. 269 p.
- Boullard B., (2001).** Dictionnaire : Plantes médicinales du monde. *ESTEM*. Paris. 332 p.
- Boullard B., (1997).** Dictionnaire : Plantes & Champignon. 1^{er} Edition. *ESTEM*. Paris. 466 p.
- Boullard B., (1988).** Dictionnaire : Plantes & Champignon. 2^{ème} Edition. *ESTEM*. Paris. 341 p.
- Bourdial I., (2000).** La flore et la faune. *Masson*. Paris. 145 p.
- Boustie J., (2013).** Les lichens et les cosmétiques. *UFR*. Rennes. 30 p.
- Bricaud O., (2010).** Les lichens des forêts de la région méditerranéenne française et leur relation avec la continuité écologique des boisements. *Wwf*. France. 118 p.
- Bruneton J., (1993).** Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 2^{ème} Edition. *Lavoisier*. France. 895 p.

Bruneton J., (2009). Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 4^{em} Edition. *Tec & Doc Lavoisier*. Paris. 1288 p.

Bungartz F., Rosentreter R., Nash III T.H., (2002). Field guide to common Epiphytic Macrolichens in Arizona : Key to the Common Genera and Species. *ASU*. USA. 48 p.

C

Carip C., (2008). Microbiologie hygiène : Basses microbiologiques de la diététique. *TEC & DOC Lavoisier*. Paris. 343 p.

Cavé A., (1993). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales : 2^{ème} Edition. *Tec. Et Doc Lavoisier*. Paris. 285 p.

Choi Y., Noh D., Cho S., (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of korea. *LWT*. 39: 756-761.

Clauzade G., Roux C., (1987). Généralités sur les lichens et leur détermination. Tome 18, *Dignac*. France. 214 p.

Courvalin P., (2008). La Résistance Des Bactéries Aux Antibiotiques: Combinaisons De Mécanismes Bichimiques Et Génétiques. Tome 161 - N°1. *Bull. Acad. Vét. France*. 7-12.

Culberson C.F., Armaleo D., (1992). Induction of a complete secondary-product pathway in a cultured lichen fungus. *EXPERIMENTAL MYCOLOGY*. 16, 52-63.

D

Davies J., Davies D., (2010). Microbiology and molecular biology reviews. 4 (3), 417-433.

Daviau H., Jegat R., (2011). Inventaire et suivi du lichen pulmonaire (*Lobaria pulmonaria*). *PEFC*. 48 p.

Delattre J., Durand G., Jardillier J.-C., (2003). Biochimie pathologique : Aspects moléculaires et cellulaires. *Flammarion*. Paris. 549 p.

Díaz L., De-Montijo S., Medina A., Meléndez P., Laurence V., Marti-Mestres G., (2011). Activity of ethanolic extracts leaves of *Machaerium Floribundum* Against Acne-Inducing Bacteria, and their cytoprotective and antioxidant effects on fibroblast. *Rev Peru Biol* 18: 153–158.

Diniz T.C., Silva J.C., Lima-Saraiva S.R.J., Almeida Ribeiro F.P.R., Marques Pacheco A.G., Mendes R.L., (2015). The Role of Flavonoids on Oxidative Stress in Epilepsy. *Francisco Javier Romero*. 1: 324-542.

Dorman H.J., Bachmayer O., Kosar M., Hiltunen R., (2004). Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Lamiaceae Species Grown in Turkey. *J. Agr. Food Chem*. 52: 762–770.

Durrieu G., (1993). Ecologie Des Champignons. *Masson*. Paris. 197 p.

E

Ertz D., Duvivier J.F., (2006). Les Lichens du Bassin Hydrographique de l'Hermeton (Belgique) : Flore et Mesures de Conservation. *Bull. Soc. Nat. Luxemb.* 107: 39-62.

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

F

Favier A., (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des Mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique.* Vol 5 : 108-115.

Feriani A., Alimi H., Mbarki S., Dhibi S., El Feki A., Allagui M.S., (2012). Exploration des effets toxiques de la deltaméthrine sur la fonction rénale et évaluation de l'effet Protecteur de la Vitamine C. In : Association Tunisienne de Physiologie et de Biosurveillance de l'Environnement. *ATP-BE.* Tunisie. 408 p.

G

X Ganesan A., Thangapandian M., Ponnusamy P., Sundararaj J.P., Nayaka S., (2015). Antioxidant and Antibacterial activity of parmelioid lichens from shevaroy hills of eastern ghats. *International journal of pharm tech research* No.9. Vol, 8. 13-23.

Gayathri D., Swamy C.T., (2012). Lichens : A novel and potential source as antimicrobials for human use. *Journal Of Phytology.* 4(1): 38-43.

Genevés L., (1992). Reproduction et Développement des Végétaux. *Dunod.* Paris. 159 p.

Genevés L., (1990). Biologie Végétale Thallophytes et Microorganismes. *Dunod.* Paris. 159 p.

Ghedira K., (2005). Les flavonoïdes: Structure, Propriétés Biologiques, Rôle Prophylactique et Emplois en Thérapeutique. *Springer.* 3(4) : 162-169.

Grujicic M., Snipes J., Ramaswami S., Yavari R., Cheeseman B., (2014). Multi-Scale Computation-Based Design of Nano-Segregated Polyurea for Maximum Shockwave-Mitigation Performance. *AIMS. Mater Sci* 1 : 15 : 27.

H

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J.O., Charlier C., Chapelle J.P., (2007). Le stress oxydant. *Rev Med Liege* 62 : 10 : 628-638.

Harborne JB., (1973). Phytochemical Methods. *London : Chapman And Hall, Ltd.* 49-188.

Hart K.J., Yáñez-Ruiz R., Duvals M., Mcewann R., Newbold J., (2008). Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology.* Vol. (147) : 8-35.

Hopkins W.G., (2003). Physiologie Végétale. 2^{ème} Edition. *De Boeck.* Paris. 514 p.

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

Lugasi A., Hovari J., Sagik., Biro L., (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *J. Acta. Biologica. Szegediensis.* 47 (1-4) : 119-125.

Lüttge U., Kluge M., Bauer G., (2002). Botanique. 3^{ème} Edition. Technique et Documentation. *Lavoisier.* Paris. 600 p.

Lüttge U., Kluge M., Bauer G., (1996). Botanique. 2^{ème} Edition. *Lavoisier.* Paris. 571 p.

M

Macheix J-J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P., (2006) : Composés phénoliques dans la plante – Structure, biosynthèse, réparation et rôle. In : Les polyphénols en agroalimentaire, **Sarni-Manchado P., Cheynier V.** *Lavoisier (TEC & DOC).* Paris. 393 p.

Malki F., Touati A., Hamza K., (2012). Effet des substituants sur l'activité antioxydante des Anilides. In : Association Tunisienne de Physiologie et de Biosurveillance de l'Environnement. *ATP-BE.* Tunisie. 408 p.

Manojlovic N.T., Vasiljevic Perica J., Gritsanapan W., Supabphol R., Manojlovic I., (2010). Phytochemical and antioxidant studies of *laurera benguelensis* growing in Thailand. *Biol Res* 43: 169-176.

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

Marouf A., (2000). Dictionnaire de botanique. *Dunod.* Paris. 256 p.

Meyer S., Reeb C., Bosdeveix R., (2004). Botanique : Biologie et physiologie végétales. *Maloine.* Paris. 512 p.

Micheletti A.C., Beatriz A., De Lima D.P., (2009). Constituents químicos de *Parmotrema Lichexanthonicum Eliasaro & Adler*—Isolamento, Modificações Estruturais Avaliação as Atividades Antibiótica Citotóxica. *Quim Nova.* 32:12–20.

Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Liithje S., (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-Induced generation and detoxification of active *Oxygen Species.* *Photochemisrry Reviews,* 3: 173-193.

Molnár K., Farkas E., (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites : a Review. *Zeitschrift Für Naturforschung.* 65C, 157-173.

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

Morot-Gaudry J.F., Prat R., (2012). Biologie Végétale : Nutrition et métabolisme. 2^{ème} Edition. *Dunod.* Paris. 224 p.

Morot-Gaudry J.F., Prat R., (2009). Biologie Végétale : Croissance et développement. 2^{ème} Edition. *Dunod.* Paris. 256 p.

Moussard C.H., (2007). Biochimie structurale et métabolique. 3^{ème} Edition. *De Boeck & Larcier S.A.* Paris. 352 p.

N

Nabors M., (2008). Biologie Végétale : Structures, Fonctionnement, Ecologie et Biotechnologies. *Pearson Education.* France. 614 p.

Nascimbene J., Brunialti G., Ravera S., Frati L., Caniglia G., (2010). Testing *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. as an indicator of lichen conservation importance of Italian forests. *Ecological Indicators.* 10 : 353–360.

Nash T., (2008). Lichen Biology. Second Édition. *Cambridge University Press.* New York. 486 p.

Nostro M.P., Germanó V., D'angelo A., Marino Cannatelli M.A., (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medical plant antimicrobial activity. *Lett. Applied Microbiol.* 30: 379–384.

Nultsch W., (1998). Botanique Générale 10^{ème} Edétion. *De Boeck.* Paris. 602 p.

O

Odabasoglu F., Aslan A., Cakir A., (2004). Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen species. *Phytother Res* 18:938–941.

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

Ozenda P., (2000). Les végétaux organisations et diversité biologique. 2^{ème} Edetion. *Dunod.* Paris. 192 p.

P

Packer R., (2000). Oxidative stress and antioxidants: The ntioxidant Network, a-lipoic acid, and diabetes. In : Antioxidants in diabetes management. **Packer L., Rosen P., Tritschler H.J., King G.L., Azzi A., INC Marcel Dekker.** 110 p.

Parc National de Taza., (2016). Plan de Gestion (2014-2019), Partie A : Approche Descriptive et Analytique. 37 p.

Paudel B., Bhattarai H.D., Lee J.S., Hong S.G., Schin H.W., Yim J.H., (2008). Antioxidant activity of polar lichens from King George Island (Antarctica). *Polar Biol* 31 : 605–608.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O., (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : Une réalité pour le médecin. Vol 4 -N°5.

Piovano M, Garbarino J.A, Giannini F.A., Correche E.R., Feresin G., Tapia A., Zacchino., Enriz R.D., (2002). Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Bol Soc Chil Qu 'M* 47 : 235–240.

Plaza C., Lorena E., Díaz De T., Robert K., Lückingf., (2014). Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from venezuelan andes *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2 (5), 138-147.

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

R

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

Ramade F., (2002). Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. 2^{ème} Edition. *Dunod*. Paris. 1100 p.

Ramade F., (1993). Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. *Ediscience International*. France. 822 p.

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

Ranković B., Kosanić M., (2015). Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. In: *Lichen secondary metabolites : Bioactive properties and pharmaceutical potential*.

Rankovic B. *Springer International Publishing Switzerland*. London. 202 p.

Raven B.H., Evert R.F., Eichhorn S.E., (2007). Biologie Végétale. 2^{ème} Edition. *De Boeck*. Paris. 733 p.

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

Richter G., (1993). Métabolisme des végétaux : Physiologie et biochimie. *Presses Polytechniques et Universitaires Romandes*. 526 p.

Robert D., Catesson A M., (2000). Biologie Végétale. Volume 2, Organisation Végétative. *Doin*. Paris. 636 p.

Roland J.C., (2004). Biologie Végétale : Organisation du plant sans fleurs. 6^{ème} Edition. *Dunod*. Paris. 142 p.

Roland J-C., El Maarouf-Bouteau H., Bouteau F., (2008). Atlas de biologie végétale 1. Organisation des plantes sans fleurs, Algues et Champignons. 7^{ème} Edition. *Dunod*. Paris. 142 p.

S

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

Sarni-Manchado P., Cheynier V., (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. *Lavoisier (Tec & Doc)*. Paris. 398 p.

- Sasikumar J.M., Mathew G.M., Teepica P.D.D., (2010).** Comparative studies on antioxidant activity of methanol extract and flavonoid fraction of *Nyctanthes arbor-tristis* leaves. *Electron J Environ Agric Food Chem.* 9: 227-233.
- Sati S.C., Joshi S., (2011).** Antibacterial activity of the Himalayan lichen *Parmotrema Nilgherrense* Extracts. *British Microbiology Research Journal.* 1(2): 26-32.
- Scheidegger C., Clerc P., Dietrich M., Frei M., Groner U., Keller C., Roth I., Stofer S., Vust M., (2002).** Liste rouge des espèces menacées en Suisse. *OFEFP, WSL et CJBG.* Genève. 396 p.
- Serussiaux E., Diederich P., Lambinon J., (2004).** Les macrolichens de Belgique, du Luxembourg et du Nord de la France. *Ferrantia.* Luxembourg. 192 p.
- Sharma A.K., Sharma M.C., Dobhal M.P., (2012).** Phytochemical investigation of therapeutic important lichen : *Parmelia Perlata.* *J Nat Prod Plant Resour ;* 2: 101-106.
- Shrestha G., (2015).** Exploring the Antibacterial, Antioxidant, and Anticancer Properties of Lichen Metabolites . These of doctorat. Department of Biology. Brjham Young University. 126 p.
- Shukla V., Upreti DK., Bajpai R., (2014).** Lichens to Biomonitor the Environment. *Springer.* India. 185 p.
- Silar Ph., Malagnac F., (2013).** Les Champignons : Redécomuverts. *Belin.* Paris. 136 p.
- Stocker-Wörgötter E., (2008).** Natural Product Reports. 25: 188-200.
- Subramanion L.J, Zuraini Z., Sasidharan S., (2011).** Phytochemicals screening, DPPH free radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activities of *Cassia fistula* seeds extract. 5(10), 1941-1947.
- Sujetovienė G., (2015).** Monitoring lichen as indicators of atmospheric quality. In : Recent advances in lichenology : Modern methods and approaches in biomonitoring and bioprospection.

T

- Talbi H., Boumaza A., El-Mostafa K., Talbi J., Hilali A., (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella Sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous Extracts of *Nigella Sativa* L.). *Mater. Environ. Sci.* 6 (4) 1111-1117.
- Tiévant P., (2001).** Guide des Lichens 350 Espèces de Lichens d'Europe. *Delachaux et Niestlé.* Paris. 304 p.

U

- Upreti K., Divakar P K., Shukla V And Bajpai R.** Springer. India. 265 p.

V

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

Verma N., Behera B.C., (2015). Future directions in the study of pharmaceutical potential of lichens. In : Lichen secondary metabolite bioactive properties and pharmaceutical potential. **Rankovi B.** Springer. India. 202 p.

Vries B Et Vries I., (2008). Common lichens of cypress hills interprovincial Park. *Saskatchewan.* Canada. 24 p.

Vust M., Clerc Ph., Habashi Ch., Mermilliod JC., (2015). Liste rouge des lichens du Canton de Genève. *Conservatoire et Jardin Botaniques de la Ville de Geneve.* Genève. 159 p.

W

Wallace R.J., (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of Nutrition Society.* Vol. (63) : 621–629.

Wink M, Van Wyk B.E., (2008). Mind-Altering and poisonous plants of the world. *Timber Press* 464 p.

Wolseley P., James P., (2000). Factors affecting changes in species of *Lobaria* in sites across Britain 1986–1998. *Snow Landsc. Res.* 75, 3: 319–338.

Y

Yamamoto Y., Hara K., Kawakami H., Komine M., (2015). Lichen substances and their biological activities in : Recent advances in lichenology modern methods and approaches in lichen systematics and culture techniques. **Upreti D.K., Pradeep K., Shukla D.V., Bajpai R.** 2^{ème} Edition. *Springer.* India. 232 p.

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

Annexes

Annexe 01 : Courbes d'étalonnages.

C $\mu\text{g/ml}$	ABS
0	0
8	0,094
16	0,26
24	0,399
32	0,612
40	0,764

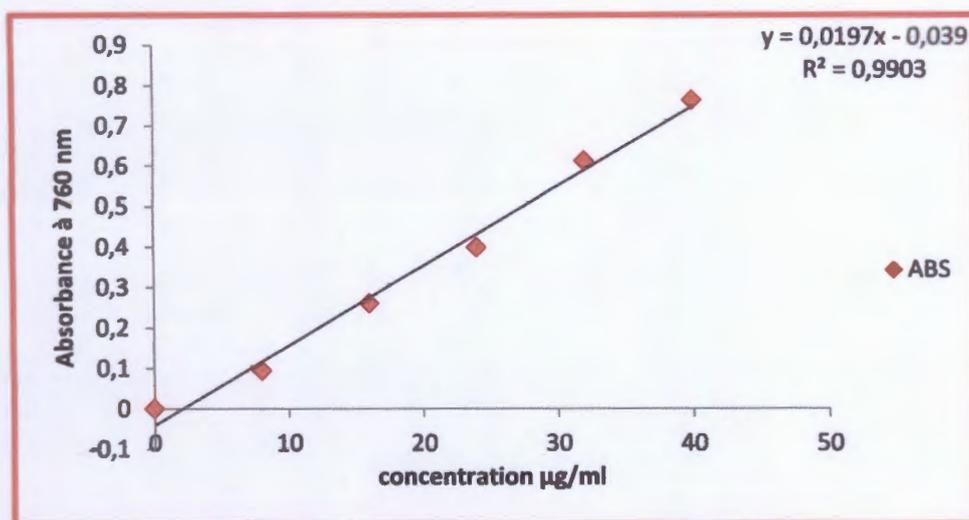


Figure 1 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

C $\mu\text{g/ml}$	Abs
0	0
4	0,655
8	1,422
12	2,307

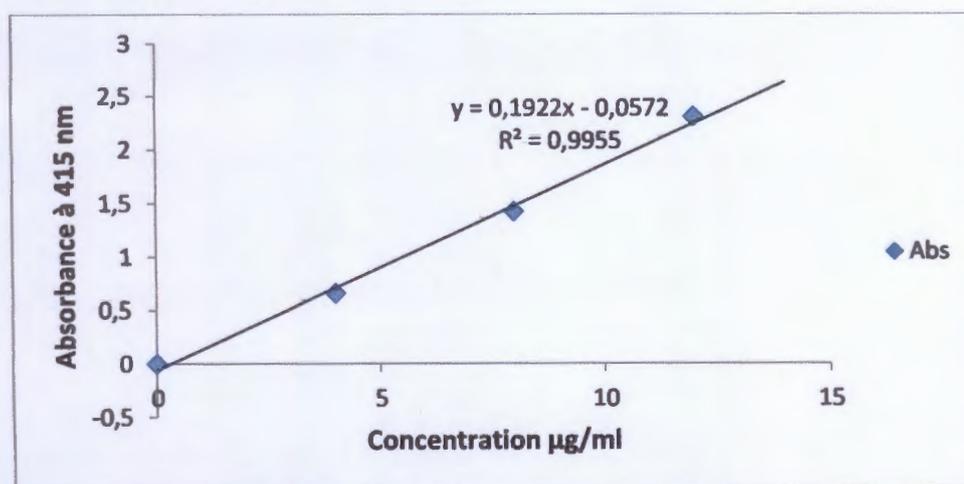


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

C $\mu\text{g/ml}$	ABS
0	0
0,25	0,018
0,5	0,04
1	0,077

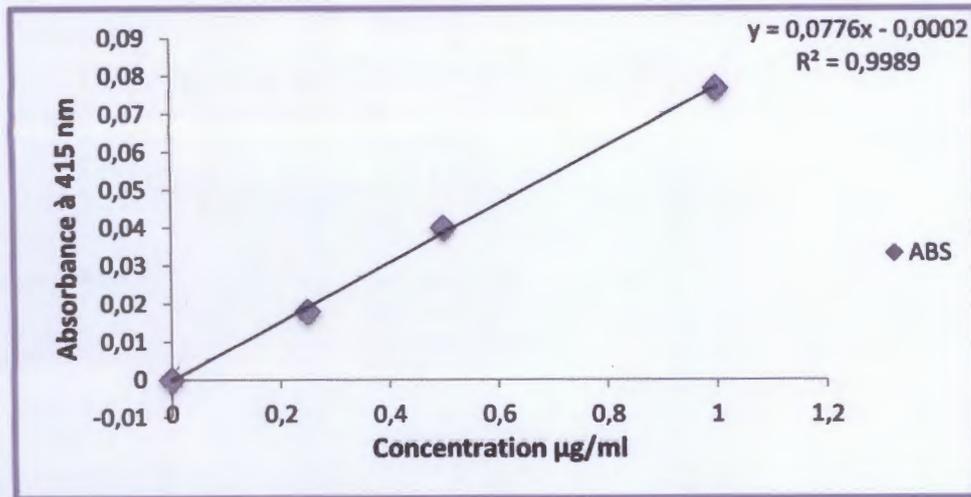


Figure 3 : Courbe d'étalonnage d'acide tannique.

Annexe 02 : Résultats des tests phytochimiques.



(1)



(2)

Figure 4 : Test de détection des flavonoïdes.



(1)



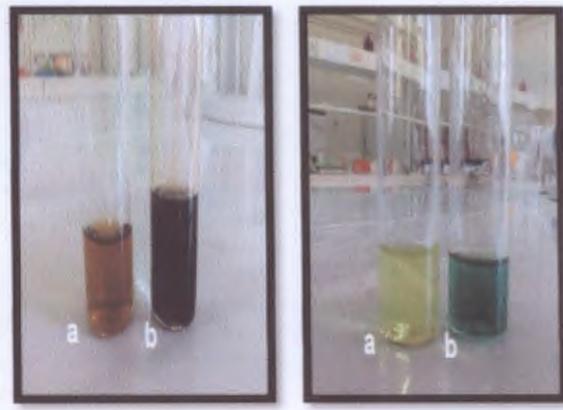
(2)

Figure 5 : Test de détection des tanins.



(1) (2)

Figure 6 : Test de détection des saponines.



(1) (2)

Figure 7 : Test de détection des terpénoïdes.

(1) *L. pulmonaria*(2) *L. virens*

a. avant le test

b. après le test

Annexe 03 : Analyse statistique.

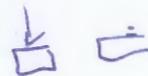
I-Analyse de la variance entre *L. pulmonaria* et *L. virens*.

➤ Teneur en phénols totaux

Différence	-10,610
t (Valeur observée)	-6,936
t (Valeur critique)	4,303
DDL	2
p-value (bilatérale)	0,020
alpha	0,05

➤ Teneur en flavonoïdes

Différence	1,535
t (Valeur observée)	12,522
t (Valeur critique)	2,776
DDL	4
p-value (bilatérale)	0,02
alpha	0,05



➤ *Teneur en tannins condensés*

Différence	-1,357
t (Valeur observée)	-7,673
t (Valeur critique)	2,776
DDL	4
p-value (bilatérale)	0,002
alpha	0,05

II- Régressions linéaires

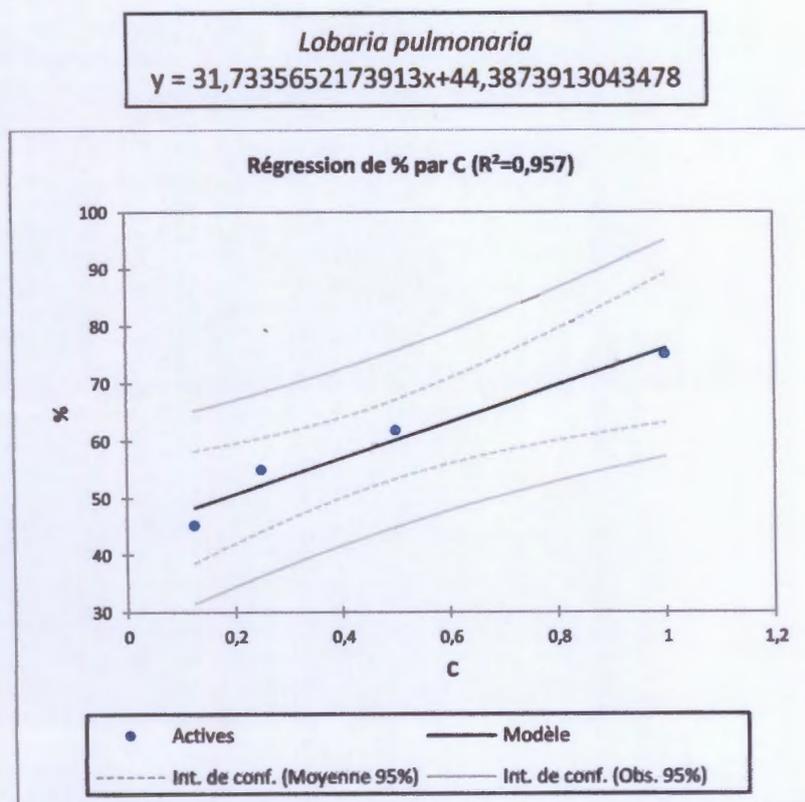


Figure 8 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique de *Lobaria pulmonaria*.

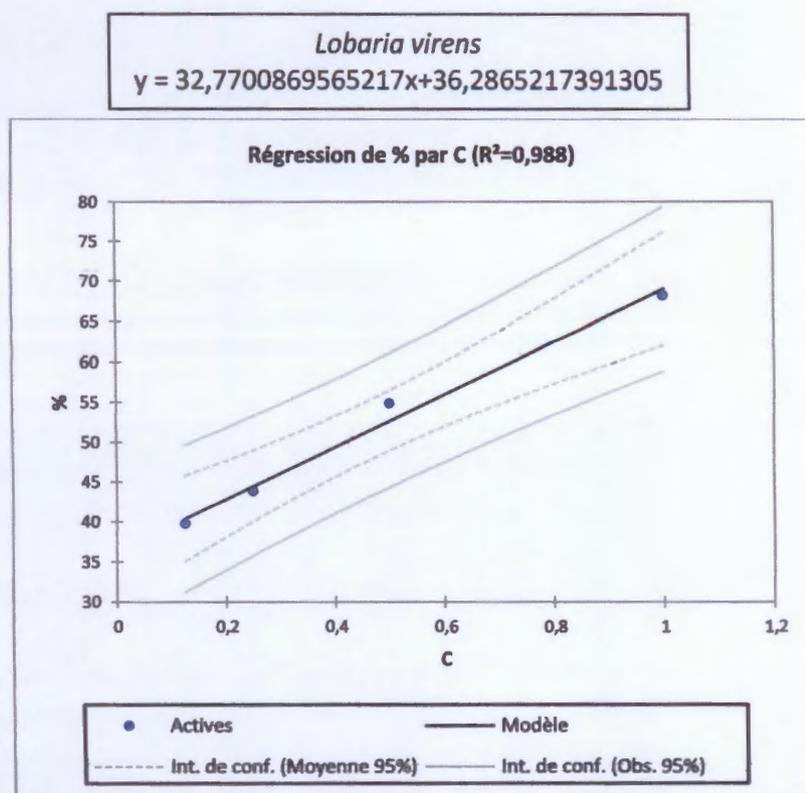


Figure 9 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique de *Lobaria virens*.

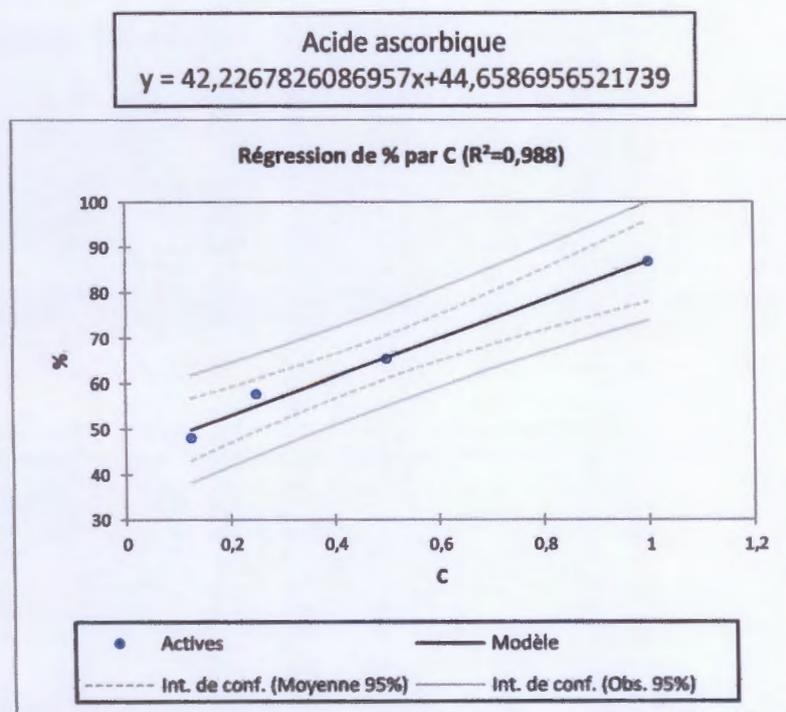


Figure 10 : Pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique.

Annexe 04 : Résultats de l'activité antibactérienne.



L'extrait de *L. pulmonaria* contre les bactéries Gram-positif.



L'extrait de *L. pulmonaria* contre les bactéries Gram-négatif.



L'extrait de *L. virens* contre les bactéries Gram-positif.



L'extrait de *L. virens* contre les bactéries Gram-négatif.

Présenté par : Djennas Mounira
Hamioud Lamia

Encadreur : M^{elle} Salem S

Date de soutenance : Juillet 2016

Thème

Contribution à l'étude des métabolites secondaires et évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des extraits de deux lichens du genre *Lobaria* : *L. pulmonaria* (L.) Hoffem et *L. virens* (With.) Laundon.

Résumé

Notre étude est basé sur la recherche et la valorisation des substances naturelles bioactives issues des lichens, son objectif est d'évaluer *in vitro* l'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait méthanolique de deux lichens du genre *Lobaria* (*L. pulmonaria* et *L. virens*) après une extraction et une quantification des composés phénoliques.

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits est effectuée par deux méthodes différentes : Test au DPPH^o, et la méthode de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). La méthode de diffusion sur disque a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne. Les résultats obtenus montrent la bioactivité des extraits testés.

Mots clés : Lichens, extrait méthanolique, composés phénoliques, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract:

Our study's basis is the research and valorisation of bioactive natural substances outcome of lichens. The object is evaluating *in vitro* the antioxidant and antibacterial activity of the methanol extract of two lichens *Lobaria* (*L. pulmonaria* et *L. virens*) after extracting and quantifying the phenolic compounds. The evaluation of the antioxidant activity of the extracts is been carried out using two different methods: DPPH test, and FRAP method (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). Diffusion disc method is been used in order to evaluate antibacterial activity. The results obtained finally show the bioactivity of tested extracts.

Key words : Lichens, Methanol extracts, Phenolic compounds, Antioxidant activity, Antibacterial activity.

ملخص

تمتد دراستنا على البحث والتطوير في المواد الطبيعية النشطة بيولوجيا المستمدة من الأشنيات (والهدف منها هو تقييم المواد المضادة للأكسدة في المختبر والنشاط المضاد للبكتيريا من مستخلص الميثانول لإثنين من الأشنيات (*L. pulmonaria* et *L. virens*) بعد استخراج وتقدير المركبات الفينولية.

يتم إجراء تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات الناتجة بواسطة طريقتين مختلفتين : اختبار DPPH واختبار FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) (لطاقمة للمضادات الأكسدة المقلمة للحديد). كما تم استخدام أسلوب الانتشار القرصي لتقييم النشاط المضاد للجراثيم. وأظهرت النتائج المتحصل عليها من تفاعل المستخلصات المختبرية.

الكلمات المفتاحية : الأشنيات, مستخلص الميثانول, الفينول, النشاط المضاد للأكسدة, النشاط المضاد للبكتيريا.