الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية وزارة التعليم العالى والبحث العلمي

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

جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

Université Mohammed Seddik Ben Yahia-Jijel-

Faculté des Sciences de la Nature et de

laVie

Département : Biologie Moléculaire et

Cellulaire



كلية علوم الطبيعة والحياة قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de fin d'études

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

Option: science pharmacologique

Thème

Identification des molécules bioactives lichéniques

Membres de Jury: Présenté par:

Présidente : Dr BRIHOUM Hadjar KIMOUCHE Meriem

Examinatrice: Dr LEBSIR Dalila

Encadreur: Mme SALEM Samira

Année Universitaire : 2019-2020

Numéro d'ordre(bibliothèque) :.....

REMERCIEMENTS

LE plus grand remerciement à « ALLAH » le tout puissant pour le courage, l'espoir et la réussite.

Ma Síncère gratítude à Mme SALEM SAMIRA quí m'a suíví, dírigé et conseillé dans ce travail.

Mon síncère remercíement s'adressent à Mme la présidente d'avoir accepté de présider le jury de ce travail.

Mon profond respectueu remerciement à Mme **l'examinatrice** d'avoir accepté de faire partie de jury.

Mon profond remerciement à toute personne qui m'a aidé de près ou de loin, directement ou indirectement durant ce passage.



Dédicaces

A l'aide de dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,

J'ai pu réaliser ce travail que je dédie:

A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie

Ma Mère qui m'apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son Sacrifice et

Soutien qui m'a donné confiance, courage et sécurité.

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

A ma très chère sœur Sabrina, son marie Mohamed et son fils Anas

A mes très frères Imad, Abd ghani, Mouad,

A toute ma famille, proche ou éloignée.

A mes chères Amies surtout Ghada, sara, shaima, omaima

Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii
Introduction	01
Chapitre I : Généralités sur les lichens	
I.I. Définition	02
I.2. Les principaux groupements lichéniques	02
I.2.1. Lichens terricoles et humicoles.	02
I.2.2. Lichens corticoles.	02
I.2.3. Lichens saxicoles.	02
I.3. Classification des lichens	03
I.3.1. Ascolichens	03
I.3.2. Basidiolichens	03
I.4. La morphologie des lichens	03
I.5. Anatomie des lichens	06
I.5.1. Structure homéomère	06
I.5.2. Structure hétéromère.	07
I.6. Echanges nutritionnel entre mycobionte et photobionte	10
I.6.1 Mycobionte.	10
I.6.2 Photobionte.	10
I.7. Reproduction chez les lichens	11
I.7.1. Reproduction végétative.	11
I.7.2. Reproduction sexuée.	12
I.8. Utilisation des lichens	14
I.8.1 Utilisation alimentaire	14
I.8.2 Utilisation médicinale et en pharmacie	15
I 8 3 Industrie teinturière	15

I.8.4 Parfums et cosmétique	15
I.8.5 Bioindication.	16
I.8. La croissance des lichens	16
Chamitus II a I sa mátabalitas sacandaines liab	
Chapitre II : Les métabolites secondaires lich II.1. Historique	•
II.2. Généralité sur les lichens	
II.3. Les voies de biosynthèses des métabolites secondaires	
II.3.1 La voie des acétates polymalonates	
II.3.2 La voie de l'acide shikimique	
III.3.3 La voie de l'acide mévalonate	21
Chapitre III: Identification des métabolites seco	ondaires lichéniques
III.1 Les techniques d'identification des métabolites secondaires.	24
III.1.1 LD-MSI	24
III.1.2 HPLC	25
III.2 Les activités biologiques des métabolites secondaires	26
III.2.1 Les activités anticancéreuses	26
III.2.2 Les activités écologiques	27
III.2.3. Les activités pharmacologiques	28
III.2.4 Les activités antibactériennes et antivirales	28
III.2.5 Les activités antioxydants et photoprotectrices	29
Conclusion	30
Références bibliographiques	30

AU: Acide usnique

ABTS: Acide 2,2'- azino-bis (3 éthylbenz-thiaoline-6-sulfonique)

CCM: Chromatographie sur couche mince

CMI: Concentration minimale d'inhibition

CI50: Concentration inhibitrice a 50%

Cu+2: Ion de cuivre

DL50: Concentration létal médiane

DMPD: N,N-dimethyl-1,4-diaminobenzene.

DPPH: 2,2- Diphenyl -1 -picryl -hydrazyl

Ellman : 5,5'-dithiobis- (acide 2-nitrobenzoïque)

Fe+2: Ions ferreux.

Fe+3: Ions ferriques

FRAP: Pouvoir antioxydant réducteur ferrique

G-LBM: Milieu d'extrait de malt-extrait de levure

G-LBM+: Milieu d'extrait de malt-extrait de levure modifié

H1N1: Hémagglutinine de type 1 et la Neuraminidase de type 1

LSP: Lipopolysaccharide

MY: Milieu d'extrait de malt-extrait de levure

m/z: Masse sur charge

NO: Oxyde nitrique

O-2: Ion superoxyde

ORAC: Capacité d'absorbance radicale d'oxygène

PDA: Gélose pomme de terre-dextrose

PGE2: Prostaglandine E2

R: Regression

SARM: Staphylococcus aureus résistant à la méticilline

SAS: System d'analyse statistique

TPTZ : Réactif à la Tri-Pyridyl-Triazine

UV-A: Rayonnement ultraviolet A

UV-B: Rayonnement ultraviolet B

Figure 1 : Un thalle gélatineux03	3
Figure 2: Un thalle fruticuleux04	1
Figure 3 : Un thalle foliacé04	4
Figure 4: Un thalle squamuleux04	ļ
Figure 5 : Un thalle crustacé	5
Figure 6 : Un thalle lépreux	
Figure 7: Un thalle filamenteux	5
Figure 8: Un thalle composite	
Figure 9 : Structure homéomère de Collema tenax	
Figure10 : Coupe transversale de Collema tenax	,
Figure 11 : Structure hétéromère stratifiée de Lobaria pulmonaria	3
Figure 12 : Coupe transversale de Nephroma laevigatum	3
Figure 13 : Structure hétéromère radiée)
Figure 14 : Coupe transversale usnea intermedia	
Figure 15 : Changements nutritionnels entre le mycobionte et le photobionte	0
Figure 16 : Présentation schématique de la colonisation bactérienne d'un fragment de thalle de Laboria pulmonaria	l
Figure 17 : Propagule végétative (sorédie)	2
Figure 18 : Propagule végétative (isidie)	2
Figure 19 : Apothésie de Physcia leptatea	3
Figure 20 : Périthèse de Thelopsis isiaca	3
Figure 21 : Schéma représentative du mécanisme de la reproduction sexuée	Ļ
Figure 22 : Produits contenant des extraits de lichen	5
Figure23 : Voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques	9
Figure 24 : Distribution des principaux lichens phénols polycycliques issus de la voie acétyl-polymalonyle)
Figure 25 : Structure de quelque précurseur des polycétide aromatique	

Figure 26 : Structure chimique de l'acide shikimique, de la phénylalanine et des composé dérive
de l'acide pulvunique21
Figure 27 : Structure des précurseurs des composés de la voie de l'acide mévalonique22
Figure 28: Spectre de masse LDI en mode ion négatif d'un extrait au dichlorométhane D'ophioparma ventosa
Figure 29 : Consommation de gel, estimée par un score d'alimentation (moyenne ± se), par les
escargots27

Introduction

Les lichens résultent d'une association symbiotique entre un champignon (mycobionte) et une algue et/ou une cyanobactérie (photobionte). Environ 85% des photobiontes sont des algues vertes et 10% sont des cyanobactéries (Shrestha et Clair, 2013).

Les civilisations anciennes leurs connaissaient déjà des propriétés remarquables : les égyptiens les utilisaient par exemple pour préserver l'odeur des épices d'embaumement ou encore pour traiter les maux. Bien que moins utilisés que les plantes en médecine traditionnelle, ils sont devenus plus récemment des sources potentielles de molécules biologiquement actives (Andraud-Dieu, 2015).

Les lichens disposent d'un large spectre de composés bioactifs appelés métabolites secondaires. Leurs effets biologiques comme les activités antioxydantes et antibactériennes sont largement étudiés (Goga M et *al.*, 2020).

L'acide usnique, est principalement utilisé dans les préparations pharmaceutiques, est l'un des métabolites les plus connus des lichens (Huneck, 1999).

Et Pour valoriser au mieux cette ressource privilégiée, des méthodes de spectrométrie de masse qui ont été développées dans le but de minimiser la préparation de l'échantillon et la durée des analyses. L'apport de ces méthodes a pu être établi sur un large panel de lichens, représentant une part importante de l'espace chimique couvert par ces organismes. Il a été démontré que des profils chimiques complets pouvaient être obtenus respectivement à partir de thalles lichéniques et d'extraits acétoniques totaux (Le Pogam-Alluard, 2016).

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

L'objectif de ce travail est basé sur :

- ➤ Identification des molécules bioactives par des méthodes de spectrométrie de masse (HPLC, LDI-MSI).
- Déterminer les activités biologiques de certains métabolites secondaires.

Chapitre I:

Généralité sur les lichens

I.1. Définition

Les lichens font partie des thallophytes, vaste ensemble de végétaux dépourvus de tiges, feuilles et racines, et qui ne sont donc pas vascularisés (Yuan et *al.*, 2005) Ce sont des végétaux complexes résultant de l'association intime et durable, autrement dit de la symbiose d'un champignon (mycosymbiote) avec un végétale chlorophyllien qui est soit un cyanophyte, soit plus fréquemment un chlorophyte (phycosymbiote) (Molnar K et Farkas E, 2009).

I.2. Principaux groupements lichéniques

Les lichens sont divisés en trois groupes principaux :

I.2.1. Lichens terricoles et humicoles

Ce sont des lichens qui croissent sur la terre ou l'humus, le thalle est toujours entièrement situé à la surface de substrat, mais il émet toujours des hyphes fixateurs (filaments constitutive de mycélium des champignons supérieurs et des lichens) à l'intérieur de celui-ci (Ozenda et Clauzade, 1970).

Ils jouent un rôle essentiel dans le maintien et la stabilité écologique des croûtes du sol avec référence à leur stabilité physique, hydrologie et croissance de la microflore du sol (Singh et Sinha, 1997)

I.2.2. Lichens corticoles

Ce sont les lichens qui se développent sur les branches des arbres les écorces des troncs. Ils sont les plus abondants et complexes, ils se divisent en plusieurs peuplements (Ait Hammou, 2015):

- Peuplements plus ou moin ombrophobes : plus ou moins protégé des pluies et l'écoulement.
- Peuplements non ombrophobes : se développent sur les branches des arbres.

I.2.3. Lichens saxicoles

Se trouvent sur les murs, les toits et les roches, ils sont très adhérant au substrat. Les lichens saxicoles sont les plus variés, abondants et présents (plus de ¾ des lichens présents en monde). (Gregory et Dimijian, 2003).

I.3. Classification des lichens

La Classification est base sur le partenaire fongique (Singh et Sinha, 1997).

- **I.3.1. Ascolichens**: Le partenaire fongique appartient aux ascomycètes
 - > Gymnocarpae: Le corps frutant est un disque comme l'apothécie. Ces lichens sont également connus sous le nom de décolichens. par exemple. Parmelia.
 - Pyrenocarpae: Le corps fructifère est un périthèce en forme de flacon. par exemple. Dermatocarpon.
- **I.3.2. Basidiolichens**: Le composant fongique de ces lichens appartient à la classe des basidiomycètes, par exemple. Corella, Dictyonema.

I.4. Morphologie des lichens

Le thalle est l'appareil végétatif des lichens, il assure la nutrition, l'entretien de la vie et la croissance. Le thalle des lichens présente une morphologie spécifique, différente de celle des algues et des champignons libres (Tievant, 2001).

Les déférents types de thalles :

• Thalles gélatineux : ils sont connus chez les lichens à cyanophycées, ils sont noir et cassants à l'état sec, ils gonflent et deviennent gélatineux-pulpeux à l'état humide (Collema flaccidum etc...) (Tiévant, 2001) (Fig. 01).

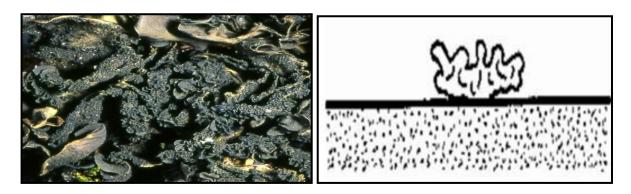


Fig. 01. Un thalle gélatineux (Lagarde, 2017; Tiévant, 2001).

• Thalles Fruticuleux : présentent des formes barbues ou en lanière et sont fixés en un seul point au support (Gregory et Dimijian, 2003) (Fig. 02).



Fig. 02. (A): Un thalle fruticuleux (Gregory et Dimijian, 2003; Tiévant, 2001).

• Thalles foliacés: forment des thalles en forme de lames ou de feuilles, ils sont faiblement appliqués au substrat et sont facilement détachables par endroits (Gregory et Dimijian, 2003)

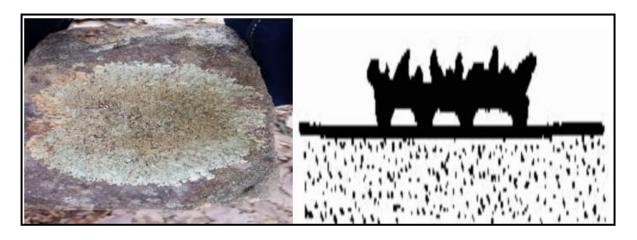


Fig. 03. Un thalle foliacé (Gregory et Dimijian, 2003; Tiévant, 2001).

• Thalles squamuleux : sont formés de petites écailles ou squamules sont très convexes, la face supérieure est plane ou concave avec un bord plus au moins adhérant au substrat (ex. Psora, Romjularia,) (Tiévant, 2001) (Fig 4)

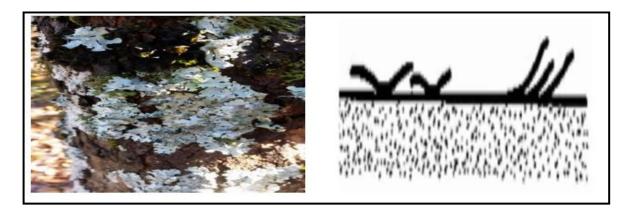


Fig. 04. Un thalle squamuleux (Lagarde, 2017; Tiévant, 2001)

• Thalles crustacés: forment des thalles ressemblant à des croûtes, ils adhèrent au support sur toute leur surface ; ils ne peuvent en être détachés (Gregory et Dimijian, 2003) (Fig. 05).

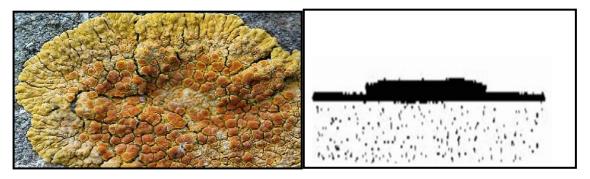


Fig. 05. Un thalle crustacé (Gregory et Dimijian, 2003; Tiévant, 2001)

• **Thalles lépreux** : rassemblent à de la poudre qui se détache facilement du substrat (Chrysothrix candelaris) (Tiévant, 2001) (Fig6).



Fig. 06. Un thalle lépreux (Tiévant, 2001).

• Thalle filamenteux: formés par des filaments très fins, emmêlés, ce genre de thalle est étalé sur le support et très adhérant au substrat (Tiévant, 2001) (Fig. 07).

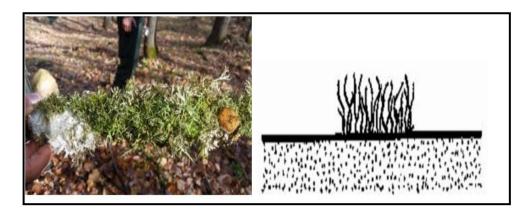


Fig. 07. Un thalle filamenteux (Lagarde, 2017; Tiévant, 2001).

• Les thalles complexes ou composites : sont formés de deux parties distinctes, un thalle primaire plus au moins foliacé, squamuleux ou crustacé, adhérant au substrat, sur lequel se développe sur un thalle secondaire dressé, fruticuleux formé d'éléments plus ou moins perpendiculaires au substrat (Cladonia) (Tiévant, 2001) (Fig. 08).



Fig. 08. Un thalle composite (Lagarde, 2017; Tiévant, 2001).

I.5. Anatomie des lichens

Il existe deux structures anatomiques chez les lichens: homéomère et hétéromère.

I.5.1. Structure homéomère

Les deux partenaires sont répartis uniformément au sein de la structure (Figure 3). C'est le cas par exemple des lichens du genre Collema (Noel, 2017).

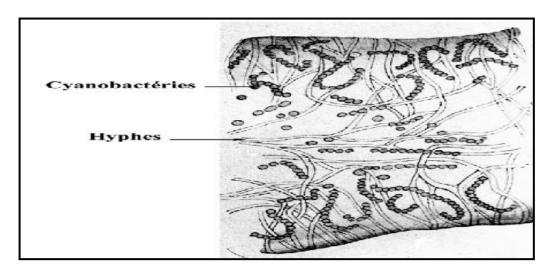


Fig. 09. Structure homéomère d'un cyanolichen (Collema ; Harmand, 1905).



Fig. 10. Coupe transversale de Collema auriforme. (Andraud-Dieu, 2015)

I.5.2. Structure hétéromère

Elle est caractérisée par l'existence de plusieurs couches superposées bien visible sur une section transversale sauf dans la structure filamenteuse. La photosymbiote constitue une zone bien délimitée entre les couches du mycosymbionte. Les couches sont superposées bien visibles sur une section transversale sauf dans la structure filamenteuse (Singh et Sinha, 1997). Deux types de structures sont reconnus.

Structure stratifiée

Correspond à la présence des couches superposées, une coupe transversale montre à partir de la phase supérieure - Un cortex supérieur de nature fongique à hyphes très serrées. - Une couche algale comportant également des hyphes beaucoup plus lâches. - Une médulle à hyphes encore plus lâches. - Un cortex inférieur à hyphes serrées. EX : Lobaria pulmonaria. La plupart des thalles foliacés, un grand nombre de thalles crustacés, très peu de lichens fruticuleux possèdent cette structure (Ozenda et Clausande, 1970).

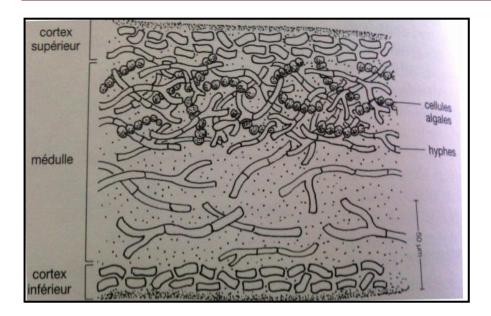


Fig. 11. Structure hétéromére stratifiée de Lobaria pulmonaria (Tievant, 2001).

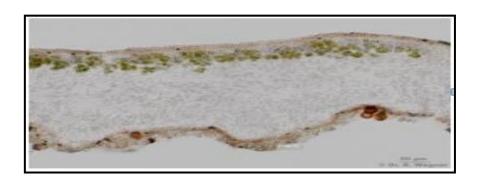


Fig. 12. Coupes transversales de Nephroma Laevigatum (Andraud-Dieu, 2015).

Structure radiée

La majorité des lichens fruticuleux correspondent à une structure radiée où les couches sont disposées concentriquement, et la couche gonidiale fait tout le tour de la section transversale à l'exception de certains Cladonia, particulièrement le sous genre Cladina, la couche gonidiale est discontinue (Fig. 11) (Ozenda et Clausande, 1970).

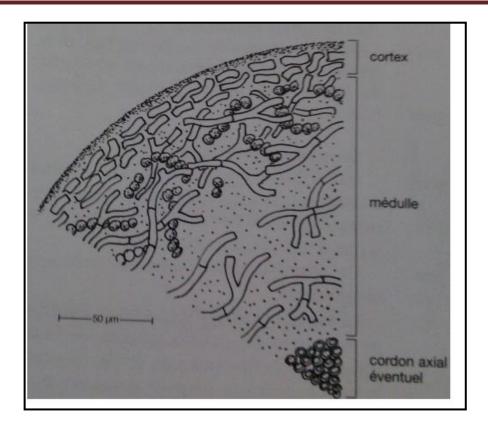


Fig. 13. Structure hétéromère radiée (Tievant, 2001).

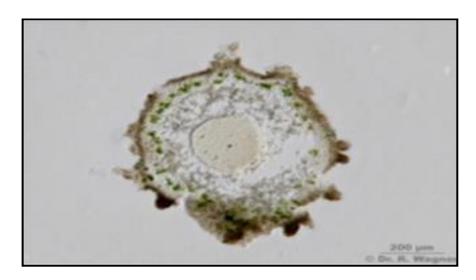


Fig. 14. Coupe transversale usnea intermedia (Andraud-Dieu, 2015)

I.5.3 Structure filamenteuse

Il s'agit d'un type de structure peu répandu, se rencontre chez les thalles filamenteux et chez quelques thalles, gélatineux, dont le thalle est constitué par des filaments de chlorophycée ou de cyanophycée revêtus par une gaine d'hyphes (Ozenda et Clausande, 1970).

I.6. Échanges nutritionnels entre mycobionte et photobionte

I.6.1. Mycobionte

Le mycobiente permet la fixation au substrat, joue un rôle de protection et apporte aussi l'eau et les sels minéraux et d'autre vitamine (notamment C) qu'il capte dans le substrat (Bellenfant et *al.*, 2010). Et assure aussi la structure et la reproduction sexuée (Van Haluwyn et *al.*, 2009).

I.6.2. Phytobionte

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

Dans le cas des cyanobactéries, le carbone est cédé au champignon plutôt sous forme de glucose. Elles sont aussi capables de fixer l'azote atmosphérique, fourni au champignon sous forme d'ammonium. Les polyols et le glucose sont ensuite transformés par le champignon en polysaccharides et en métabolites secondaires, appelés substances lichéniques. L'association symbiotique permet donc la production de composés originaux et spécifiques qui ne pourraient pas être synthétisés par chaque individu seul (Fig. 12) (Van Haluwyn et *al.*, 2009).

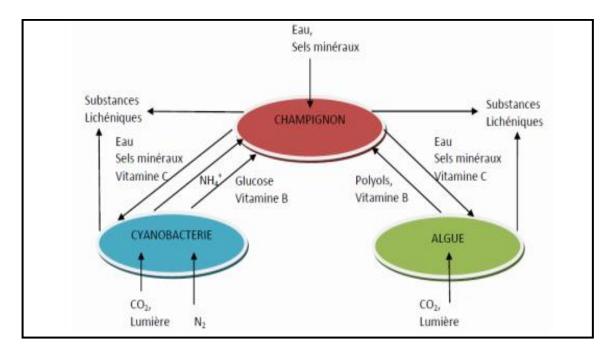


Fig. 15. Changements nutritionnels entre le mycobionte et le photobionte

(Van Haluwyn et al., 2009).

Les lichens abritent des communautés bactériennes, appelées bactériobiontes, pouvant former des structures de type biofilm sur certaines parties du thalle. Il a également été mis en évidence que les bactéries sont capables de pénétrer la paroi cellulaire fongique. Et les souches bactériennes fixatrices d'azote permettraient d'augmenter la quantité d'azote disponible pour le lichen en libérant des composés azotés, notamment des acides aminés. Cela est particulièrement vrai pour les lichens dont le photobionte n'est pas une cyanobactérie (Fig. 13) (Andraud-Dieu, 2015).

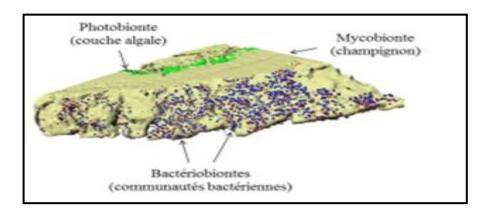


Fig. 16. Présentation schématique de la colonisation bactérienne d'un fragment de thalle de Laboria pulmonaria (Andraud-Dieu, 2015).

I.7. Reproduction chez les lichens

Les lichens utilisent deux stratégies de reproductions divergentes, une méthode sexuelle par propagation de spores et une stratégie asexuée dérivée basée sur des systèmes perpétuant la symbiose par la diffusion de diaspores spécialisées. (Murtagh et *al.*, 2000).

I.7.1. Reproduction végétative ou asexuée

La reproduction végétative ou asexuée est assurée par des propagules végétatives symbiotiques. Les propagules végétatives les plus importantes sont les isidies et les sorédies. (Lagarde, 2017)

Les sorédies ressemblent à de petits granulés poudrés situés sur le bord du thalle. Chez certaines espèces, ils peuvent apparaître n'importe où sur le thalle ou se localiser à des zones délimitées appelées soralies et peuvent prendre diverses formes. Chaque sorédie se compose de quelques cellules algales entourées d'hyphes fongiques (Singh et Sinha, 1997).

Les isidies sont des petites excroissances (bourgeons) formées d'algues et d'hyphes protégées par le cortex. Elles varient en fonction de l'espèce, de bulbaire à cylindrique ou ramifiée, parfois coralloïde (Singh et Sinha, 1997).

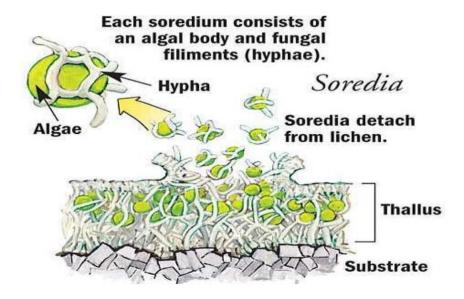


Fig. 17. Propagule végétative (sorédie) (Singh et Sinha, 1997).

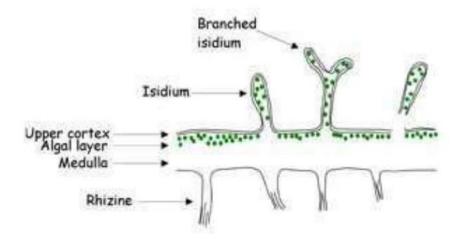


Fig. 18. Propagule végétative (isidie) (Singh et Sinha, 1997).

Les isidies et les sorédies peuvent être transportées par le vent, l'eau ou les animaux. Une fois déposée sur un substrat approprié, elles peuvent générer de nouveaux thalles (Lagarde, 2017).

I.7.2. Reproduction sexuée

Seul le mycobionte assure la reproduction sexuée (le photobionte ne se divise que par mitose). L'organe reproducteur est nommé ascome chez les ascolichens et basidiome pour les basidiolichens (Singh et Sinha, 1997).

La reproduction sexuée implique la rencontre entre les spores issues du mycobionte et un photobionte. Elle est majoritairement retrouvée chez les lichens. Les apothécies sont des structures de reproduction principalement rencontrées chez les ascolichens. Celles-ci sont typiquement circulaires et semblables à un disque ou une coupe. Il existe également des espèces dans lesquelles

la surface de l'apothécie s'élargit vers l'extérieur. La plupart des apothécies se trouvent sur la surface supérieure du thalle (le genre Nephroma est une exception) (Lagarde, 2017).

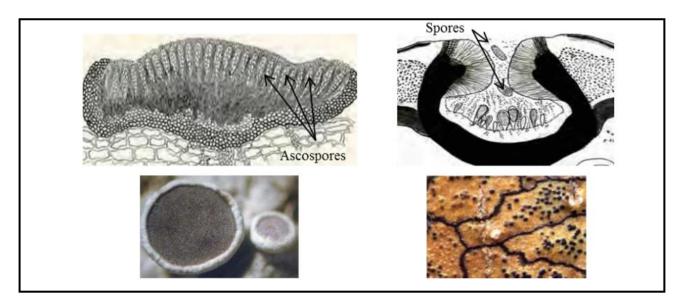


Fig. 19. Apothécie de Physcia leptalea (Andraud-Dieu, 2017).

Un autre type d'organe reproducteur retrouvé chez les lichens est le périthèce. A l'œil nu, il ressemble à de petits boutons sphériques, généralement noir dont le diamètre varie entre un à deux millimètres environ. Il s'ouvre par un pore (ou ostiole) dans sa partie supérieure et ainsi permet l'expulsion des spores. En fonction de l'espèce, le périthèce peut se développer totalement sur le thalle ou être incorporé dans celui-ci (Noel, 2017).

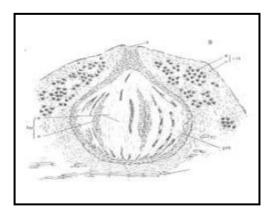


Fig. 20. Périthèce de Thelopsis isiaca (Noel, 2017).

Chez les basidiolichens, les spores se forment à l'extérieur de cellules fertiles, les basides. Les basidiomes sont de petits champignons à lames, qui ressemblent à ceux des basidiomycètes non lichénisés (Fig. 20) (Lagard, 2017).

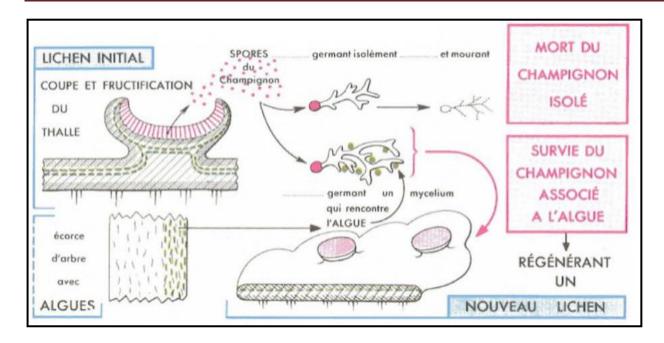


Fig. 21. Schéma représentative du mécanisme de la reproduction sexuée (Poelt, 1969) in (Ait hammou, 2015).

I.8. Utilisations des lichens

Les lichens sont les végétaux qui recouvrent près de 8 % de la surface terrestre de la planète et sont rencontrés pratiquement tous les milieux et vivent souvent très longtemps. Leur intérêt écologique apparait dans plusieurs domaines (Manier et *al.*, 2009).

I.8.1. Alimentaire

Les lichens renferment une substance amylacée mucilagineuse, la lichénine à laquelle on a reconnu des propriétés nutritives et médicamenteuses. Ce mucilage a la faculté de se gorger d'eau, facilitant le transit intestinal et augmentant la sensation de satiété. De ce fait, ils sont consommés par les rennes et caribous et certains bétails comme les chèvres. Certains peuples nordiques consomment Cetrariais landica (Parmeliaceae) en farine pour en faire des pains ou gâteaux. Quelques espèces sont utilisées comme émulsifiant et épaississant dans l'industrie agroalimentaire (Lebail, 1853).

Les indiens du nord de l'amérique, des umbilicaria ; A l'ile maurice, on emploie le receela tinctoria pour fabriquer des bouillons nutritifs (Lebail, 1853).

En temps de disette, les norvégiens, les lorpons, en forment une pate qu'il melent soit avec des pommes de terre, soit avec d'autre aliments (Lebail, 1853).

La parmélie est utilisée comme nourriture en Inde du Sud Lecanora, aussi utilisée comme une nourriture délicieuse en Israël Cetraria (mousse d'Islande) et comestible en Islande (Singh et Sinha, 1997).

I.8.2. Médicinale et pharmaceutique

Les lichens produisent de très nombreux composés chimiques qui leur sont propre et qui sont susceptibles d'avoir des applications pharmaceutiques. Certaines de ces molécules ont une activité antibiotique ou anti- inflammatoire marquée ou bien encore des propriétés photo protectrices

(Mitrović et al., 2011).

I.8.3. Industrie teinturière

Il y a plus de 150 ans, le pharmacien Robiquet a décrit les procédés chimiques de formation de colorant à partir de lichens. De nombreux lichens ont anciennement été utilisés comme colorants par l'artisanat puis dans l'industrie textile. Ces espèces étaient dénommées « orseille de terre » ou « orseille de mer » selon leur lieu de ramassage (Lebail, 1853).

I.8.4. Parfums et cosmétique

Le marché de la dermo-cosmétique, en renouvellement permanent, propose des soins toujours plus innovants et efficaces. Pour cela, il y a une recherche constante de nouveaux actifs essentiellement d'origine naturelle et multifonctionnels (anti-âge, anti UV, hydratants,...). Ils ont la capacité à réduire les radicaux libres formés par les UV soit une activité antioxydant qui aide à lutter contre la photo -vieillissement de la peau Plusieurs lichens (Calvier et *al.*, 2013) comme Evernia prunastri et Pseudevernia furfuracea fournissent des extraits à odeur persistante, utilisés dans l'industrie des parfums (Fig. 18) (Manier et *al.*, 2009).



Fig. 22. Produits contenant des extraits de lichen (de gauche a droit) : parfum masculin d'Hermès, déodorant d'Earth science, gel cryo-raffermissant de polaar (Andraud-Dieu, 2015).

I.8.5. Bio indication

Une association lichénique apporte plus d'informations sur la relation entre lichens et pollution qu'un seul individu pris isolément. Quand la pollution atmosphérique augmente, les communautés lichéniques contiennent de moins en moins d'espèces. Du fait de leur sensibilité ou de leur capacité d'accumulation de polluants, très peu sont tolérants vis à vis de gaz toxiques tel que le dioxyde de soufre, ils disparaissent de ces zones polluées (Van Haluwyn et Lerond, 1986).

La présence d'une grande variété d'espèces et leur abondance sont généralement indicatrice d'une bonne qualité de l'air (Munzi, 2014).

De nombreuses espèces de lichens ont une écologie très précise, de sorte que leur présence est susceptible de donner des indications sur les caractères physiques ou chimiques du milieu considéré. L'utilisation des lichens permet donc d'étudier, par exemple, la chimie et la stabilité des sols, la hauteur moyenne de l'enneigement (certaines espèces ne supportent pas l'humidité permanente due à la couverture nivale), le degré de pureté de l'atmosphère (Gregory et Dimijian, 2003).

I.9. Croissance des lichens

Les lichens sont caractérisés par leur faible taux de croissance. La croissance du thalle est directement liée aux facteurs de l'environnement. Le climat aura un rôle important, la croissance des lichens n'est réellement effective que 120 jours par an. A la suite d'une pluie, le champignon stocke l'eau dans ses hyphes, les deux partenaires vont alors fonctionner pendant un certain temps (photosynthèse pour l'un, et croissance pour l'autre) ; le lichen en profitera donc pour se nourrir et développer son thalle. En période de sècheresse, le lichen devient sec, inactif, mais il est capable de survivre jusqu'à la prochaine pluie : c'est le phénomène de reviviscence (Shukla et *al*, 2010).

Le substrat reste toujours un facteur primordial, selon ses particularités physiques et chimiques. Généralement, la croissance annuelle est de:

- 0,5 à 2 mm pour un crustacé.
- 0,5 à 4 mm pour un foliacé.
- 1,5 à 5mm pour un fruticuleux.

Cette vitesse n'est pas constante tout au long de la vie du lichen. Elle est d'abord faible au début puis s'accélère pour les thalles déjà moy ens avant d'atteindre un plateau (Elix et Stockerwörgötter, 2008).

La lente croissance du thalle est attribuée à la faible activité photosynthétique, la productivité est de 5 à 10 fois plus faible que celle des végétaux supérieurs et des algues vivant librement (Elix et Stocker-wörgötter, 2008).

Chapitre II:

Les métabolites secondaires lichéniques

II.1. Historique

Le point de départ de la lichénologie a été établi avec les travaux de Zopf et Hesse (Lagarde, 2017). En 1907, Zopf publie ses travaux sur 150 composés lichéniques (Zopf, 1907). En 1912, environ 180 substances ont été décrites chez les lichens (Hesse, 1912). En 1954, Asahina et Shibata, ont publié leurs travaux dans le livre « Chemistry of Lichen Substances » contenant des structures de nombreux composés, des méthodes d'isolement, de purification et d'identification de substances lichéniques notamment des méthodes de micro-cristallisation. L'utilisation de la chromatographie sur couche mince a été ajoutée par Culberson et Elix dans les années 70 en recensant plus de 430 molécules lichéniques (Culberson et Elix, 1989). L'ouvrage de référence des substances lichéniques a été publié par Huneck et Yoshimura en 1996 (Huneck et Yoshimura, 1996). En 2008, environ 1050 métabolites spécialisés ont été identifiés (Stocker-Wörgötter, 2008). Une troisième édition du catalogue des substances lichéniques a été publié par la suite en 2014 (Elix, 2014). (Lagard. 2017).

II.2. Généralité sur les métabolites secondaire lichnique

Les métabolites secondaires sont complexes, mais principalement de petites molécules, qui comprennent jusqu'à à 20% du poids sec du lichen et sont produites principalement par le champignon et sécrété à la surface des hyphes du lichen sous des formes amorphes ou sous forme de cristaux (Mitrović, 2011).

La majorité des substances lichéniques sont de petits polycétides aromatiques biosynthétisés par le champignon lichen lors de sa relation mutualiste (symbiose) avec les photobiontes verts. Les lichens cyanobactériens sont souvent dépourvus des polycétides de lichen typiques, mais forment une variété d'autres métabolites secondaires intéressants, par exemple des terpènes et des terpénoïdes (Stocker-Wörgötter E 2015).

Les lichens produisent des métabolites secondaires qui ont d'abord été considérés comme un support chimique pleinement impliqué dans la taxonomie des lichens. (Le Pogam, 2015).

II.3. Voies de biosynthèse

La chimie de base de la famille dérivée d'acétyl-polymalonyle (polycétides) est relativement uniforme dans toutes les espèces de lichen connues et consiste principalement en deux cycles phénoliques avec divers substituants, joints par des liaisons ester et / ou éther. Les unités d'acide phénolique les plus courantes dérivées de la voie acétate-polymalonate (voie polycétide) et combinées pour former les substances lichéniques typiques représentent deux types: (a) les unités de type orcinol telles que l'acide orsellinique et les unités mononucléaires associées et (b) β- des unités de type oucinol, qui ont un substituant C1 en position 3 du cycle aromatique. Compte tenu

de la biosynthèse des unités orcinol et β-orcinol, on peut s'attendre à ce que deux types de polycétide synthases (PKS) soient impliqués dans leur formation (Stocker-Wörgötter, 2015).

Plusieurs activités de ces molécules lichéniques, principalement celles issus de la voie des acétates polymalonates, ont un intérêt pour la cosmétique: photoabsorbantes, antioxydantes et inductrices de la mélanogénèse. Ces propriétés ont été étudiées pour un nombre encore limité de métabolites secondaires. la majorité dérive de l'orcinol ou duβ -orcinol. En assemblant, des unités de l'un ou l'autre on obtient les différents dérivés d'intérêt avec : (Mitrovié, 2011).

- une liaison ester qui conduit à des depsides,
- une liaison éther qui conduit à des diphényléthers
- un couplage oxydant qui conduit à la formation de dibenzoquinones, dibenzofuranes et deposes.

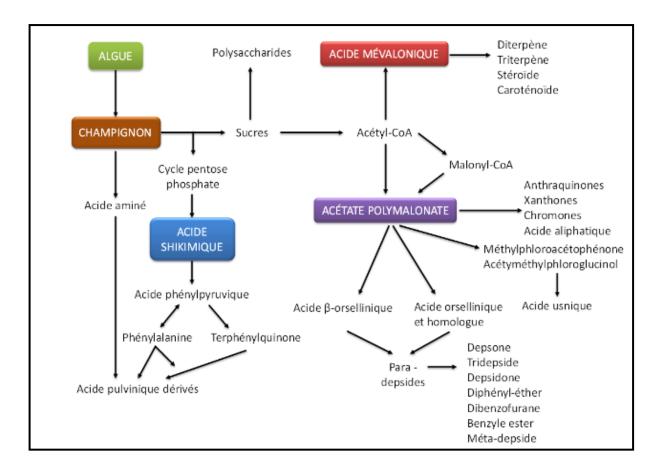


Fig. 23. Voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques (Elix, 1996; Stockerwörgötter, 2008).

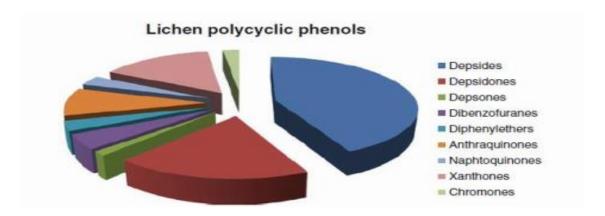


Fig. 24. Distribution des principaux lichens phénols polycycliques issus de la voie acétylpolymalonyle (sur la base des 600 phénols polycycliques de lichens compilés par huneck et yoshimura 1996) (Elix et Stocker-worgtter., 2008).

II.3.1. Voie des acétates polymalonates

La voie de l'acide mévalonique conduit essentiellement à la synthèse de mono-, di-, tri-, sesteret sesquiterpènes, stéroïdes et caroténoïdes. Pour la plupart, ils ne sont pas spécifiques des lichens et sont issus de l'assemblage d'unités isopréniques formées à partir de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) (Fig. 20) (Andraud-Dieu, 2015).

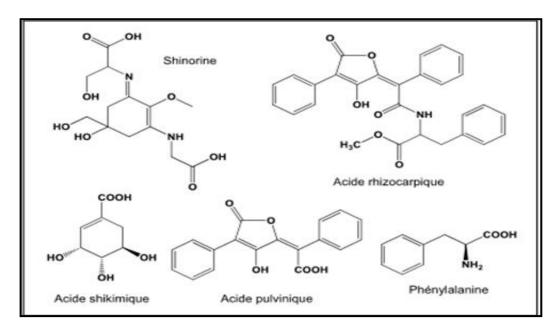


Fig. 25. Structure de quelque précurseur des polycétide aromatique (Andraud-Dieu, 2015).

II.3.2. Voie de l'acide shikimique

Cette voie permet la synthèse d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) qui, chez les plantes, sont les précurseurs des flavonoïdes, des coumarines, ou encore des alcaloïdes. En revanche, chez les lichens, des composés atypiques, tels que l'acide vulpinique et la calycine(Stocker-Wörgötter, 2008).

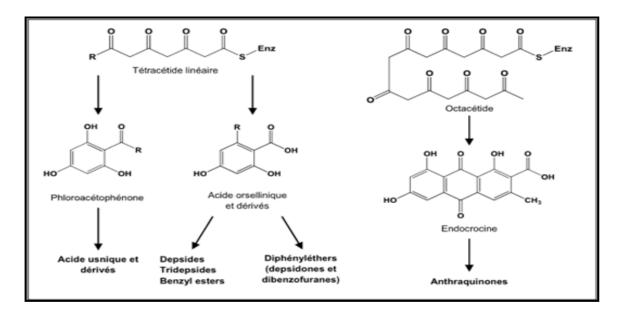


Fig. 26. Structure chimique de l'acide shikimique , de la phénylalanine et des composé dérive de l'acide pulvunique. (Andraud-Dieu, 2015).

II.3.3. Voie de l'acide mévalonique

La voie de l'acide mévalonique conduit essentiellement à la synthèse de mono-, di-, tri-, sesteret sesquiterpènes, stéroïdes et caroténoïdes (Huneck, 1999). Pour la plupart, ils ne sont pas spécifiques des lichens et sont issus de l'assemblage d'unités isopréniques formées à partir de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA). L'isopentenylpyrophosphate (unité en C5), obtenu à partir de l'acide mévalonique, conduit soit au géranylgéranylpyrophosphate (unité en C20), précurseur des diterpènes et des caroténoïdes, soit aux sesterterpènes (unités en C25), soit au squalène (unité en C30), précurseur des stéroïdes et des triterpènes (Amandine, 2015).

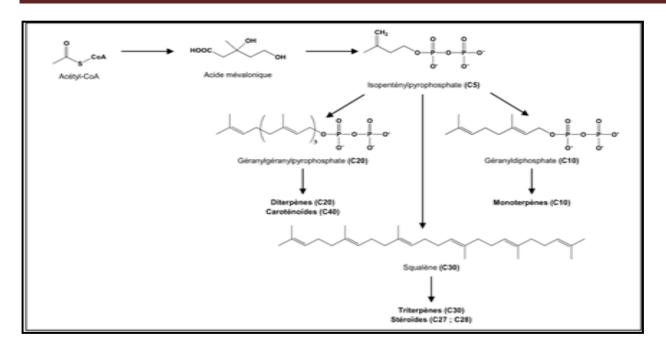


Fig. 27. Structure des précurseurs des composés de la voie de l'acide mévalonique. (Andraud-Dieu, 2015).

Chapitre III:

Identification des molécules bioactives lichéniques

III.1. Techniques d'identification des métabolites secondaires

Certaines techniques anciennes de taxonomie des lichens sont encore utilisées comme tests ponctuels, qui impliquent l'application de réactifs spécifiques directement sur le thalle du lichen. La CCM est également encore largement utilisée avec des protocoles standardisés offrant des informations plus précises sur les profils métaboliques des lichens. L'identification des composés de lichen à partir de la forme des cristaux observés au microscope a été facilitée car certains métabolites majeurs du lichen sont extraits avec des rendements élevés (Pradeep, 2015).

III.1.1 Technique d'imagerie par spectrométrie de mas, laser-desorption- ionization (LDI-MSI)

Dans les travaux de Gadea et ses collaborateurs (2020), LDI-MSI semble être un outil complémentaire pour les études sur les interactions lichen-lichénivores. Cette technique pourrait également être intéressante avec d'autres problèmes d'écologie chimique comme la photoprotection, l'allélopathie ou les activités antimicrobiennes. Les principaux avantages du MSI sont les analyses in situ, contournant le problème de solubilité rencontré en spectroscopie de masse en solution et évitant la dégradation de l'échantillon.

Dans les travaux de Le Pogam et ses collaborateurs (2016), LDI-MSI apparaît comme une approche polyvalente pour la cartographie des métabolites du lichen. En ce qui concerne l'épaisseur des tranches, les tranches régulières obtenues à l'aide d'une lame de rasoir sont parfaitement adaptées à des fins d'imagerie, en contournant le besoin obligatoire d'installations de tranchage coûteuses. Hémoventosine, acide usnique. l'acide divaricatique et l'acide thamnolique sont des composés diagnostiques d'Ophioparma ventosa. LDI-MSI a révélé que l'acide usnique était concentré dans les zones corticales qui contiennent le photobionte.

Exemple: l'acide usnique déprotoné (m/z 343) et l'ion moléculaire de l'hémoventosine (m/z 304) ont été sélectionnés pour représenter la distribution de ces métabolites. Les depsides ont subi une fragmentation significative sous une ionisation par désorption laser de 355 nm similaire à celle déclenchée à 337 nm de sorte que les acides divaricatiques, miriquidiques et thamnoliques ont été mieux détectés à travers leurs fragments que leur molécule déprotonée. Depsides ont par conséquent été imagés par leurs groupements alcool, libérés par rupture de leur liaison ester comme indiqué précédemment (acide divaricatique: m/z 195, acide miriquidique: m/z 223 et acide thamnolique: m/z 211) (Le Pogam et al., 2016).

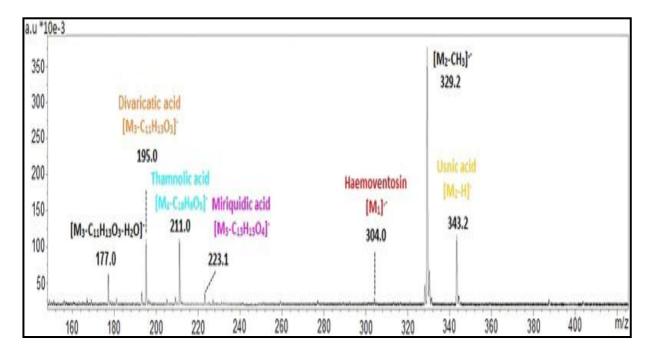


Fig. 28. Spectre de masse LDI en mode ion négatif d'un extrait au dichlorométhane D'ophioparma ventosa affichant des ions sélectionnés pour l'imagerie par spectrométrie de masse avec des couleurs associées. (Le Pogam et *al*, 2016).

Technique de chromatographie en phase liquide a haute performance (HPLC)

La première utilisation de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) sur des extraits bruts de lichen était essayé par Culberson (1972), car la plupart des les produits naturels secondaires des lichens ont une faible volatilité et faible stabilité thermique, et donc gaz la chromatographie ne peut pas les analyser. (Molnár et Farkas, 2010).

La HPLC est une méthode analytique moderne pour effectuer une identification rapide et à haute résolution des composés de lichen. Les spectres ont été obtenus par un détecteur à barrette de diodes qui mesure l'absorbance de la lumière de longueur d'onde fixe dans la région UV, ce qui peut être considéré comme la limitation de la méthode appliquée. La standardisation du matériel brut de lichen est généralement une étape difficile en raison des altérations dépendant des stimuli environnementaux et saisonniers (Ingelfinger, 2020).

HPLC permet de détecter la présence de métabolites secondaires absorbant les UV connus et leurs proportions relatives, plutôt que de trouver leurs concentrations précises. Les composés naturels absorbant les UV identifiés par HPLC peuvent être attribuées à trois classes de substances, les depsidones, les depsides et les dibenzofuranes (Ingelfinger, 2020).

III.2. Activités biologiques des métabolites secondaires lichéniques

Un large spectre d'activité biologique des métabolites secondaires est connu. Les dibenzofuranes, les depsides et les depsidones, les naphthoquinones, Les anthraquinones, les xanthones et certains autres composés de classe spécifique ont montré un potentiel anticancéreux prometteur. Les depsides et depsidones sont l'un des composés polyphénoliques de lichen les plus étudiés à forte activité biologique (Solárová et *al*, 2020).

III.2.1. Activité anticancéreuse

Les métabolites secondaires des lichens sont des bioressources prometteuses pour les médicament anticancéreuse candidat (Yang et al., 2019). Les travaux de Felczykowska et ses collaborateurs (2017), ont montré que les effets antiprolifératifs de deux extraits de champignons de lichens (Caloplaca pusille, xanthoria parientina) sur les lignées cellulaires cancéreuses HeLa, MCF-7, PC-3. L'extrait X. parietina cultivé sur des milieux PDA et G-LBM a diminué la viabilité des cellules cancéreuses HeLa ou MCF-7 avec des valeurs de CI 50 d'environ 8 µg mL -1, tandis que C.pusilla cultivé sur milieu G-LBM a montré que la plus grande puissance dans la diminution de la viabilité des cellules cancéreuses avec des valeurs de CI 50 pour la lignée cellulaire HeLa, 7,29 µg mL⁻¹ ,pour MCF-7 et 7,96 µg mL⁻¹ . Et selon Ingelfinger et ses collaborateurs (2020), l'extrait *flavoparmedia caperata* contient deux métabolites secondaires : l'acide usnique et l'acide protocétrarique, Ces métabolites montrent une réduction de la viabilité de la lignée cellulaire du cancer du côlon HCT-116, par mécanisme de l'apoptose et aussi par l'inhibition de cycle cellulaire. Et dans une étude différente, Martin et ses collaborateurs (2020), ont démontré que le potentiel anticancéreux de l'acide borbatique isolé de lichens Cladia aggregata sur la réduction de poids de la tumeur et n'affecte pas la prolifération de la tumeur à cause de leur faible taux de toxicité chez les souris suisses albinos femelles qui sont incubés avec des cellules de sarcom180. Tandis que Goga et ses collaborateurs (2019), ont prouvé que l'acide gyrophorique isolé de umbilicaria hirsuta exerce une activité antiprolifératif par induction de l'apoptose. Le clivage de PARP et l'activation de caspase 3 est détecté par cytométrie en flux. Le potentiel pro-apoptotique est médie par le stress oxydatif et réduit lors l'exposition d'antioxydant NAT.

III.2.2. Activité écologique

Les travaux de Gadea et ses collaborateurs (2020), ont confirmé la théorie de la défense optimal (ODT) à l'aide d'une méthode LDI-MSI, méthode innovalent et importante pour traiter les problèmes d'écologie chimique. Ils ont prouvé que la distribution de métabolites spécialisés (tenuioréne, acide stictique et calycine) a lieu dans les parties reproductrices (apothécies) de lichen pseudocyphellaria crocata et parmi ces métabolites, l'acide calycine montre une activité dissuasive plus grande que d'autres acides. Ce résultat à été obtenu grâce à une méthode alimentation sans choix. Et selon Le pogam et ses collaborateurs (2016), les apothécies de lichens ophioparama ventosa contiennent une forte concentration de l'acide hémoventosine qui agit comme un filtre anti-UV pour protéger les spores pendant leur maturation dans les asques. Ceci entraine un effet bénéfique pour les étapes initiales de la germination des spores par inhibition de la croissance des micro-organismes concurrents, par contre Gadea et ses collaborateurs (2017), ont indiqués que l'escargot N.hookeri capable de surmonter les intoxications de l'acide usnique (métabolite secondaire) par une stratégie d'extraction active.

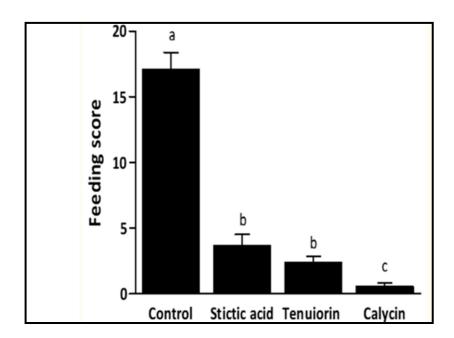


Fig. 29. Consommation de gel, estimée par un score d'alimentation (moyenne \pm se), par les escargots ($N=150 \times \text{quatre groupes}$), selon le métabolite testé sur gel d'amidon. Le gel d'amidon sans métabolites a été considéré comme le contrôle positif. Des différences significatives entre le contrôle positif et les gels contenant des métabolites (acide stictique, ténuiorine ou calycine) sont mises en évidence par les lettres en exposant minuscules a, b et c.

III.2.3. Activité pharmacologique

Les travaux de Ingelfinger et ses collaborateurs (2020), ont démêlé des profils de bioactivité intéressants pour quatre espèces des lichens (F. caperata, E. prunastri, P. furfuracea et P. glauca), Dans l'auquel, ces extraits n'avaient aucune activité inhibitrice sur les réponses inflammatoires des cellules endothéliale. Cependant, l'activité pro-inflammatoire de la leucocytose à été considérablement réduites par des extraits de f.caperata qui a fortement inhibé la formation de PGE2 et NO et pour l'activité anti-inflammatoire. Les analyses de corrélation ont détecté que l'acide physodique et l'acide atranorine inhibant la production de la PGE2 induite par le LPS et sont donc capables de protéger l'activité anti-inflammatoire. Tandis que les travaux Cetin Cakmak et Gùlcin (2019), ont montré que l'AU a la capacité de traiter les maladies neurodégénératives (principalement la maladie d'Alzheimer). Cette capacité est lié à l'effet inhibiteur de l'AU contre certaine enzyme métaboliques, notamment l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE) par méthode d'Ellman. AChE hydrolyse l'acétylcholine (ACh) en choline et acétate. L'inhibition de l'AChE augmente les niveaux d'ACh, cette inhibition a été considérée comme une approche thérapeutique utile pour traiter les troubles neurologiques. Les travaux de Thadhani et Karunaratne (2017), ont prouvé que l'extrait de lichen Caloplaca biatorina a une forte activité contre la maladie de diabète. Ce resultat a été obtenu par méthode d'inhibition des enzymes hydrolysant les glucides (Notamment α - glucosidase). Ils ont montré que triterpenoid zéorine posséde une activité inhibitrice important avec : CI 50 valeur de 100,0 \pm 0,3 μ M, par rapport aux médicaments standards, acarbose (IC $_{50}$ = 700,0 ± 10,4 μ M). In vivo, ils ont prouvé l'effet de la zéorine authentique sur des rats diabétiques induits par la streptozocine. les résultats montrent que la zéorine à 50 mg / kg était capable de faire baisser la glycémie de 500 mg / dL à 400 mg / dL en 2 heures, tandis que la zéorine, à 100 mg / Kg, réduisait la glycémie de 580 mg / dL. à 380 mg / dL.

III.2.4. Activités antibactériennes et antivirales

Les travaux de Felczykowska et ses collaborateurs (2017), ont montré que l'extrait d'acétone de champignons *protoparameliopris muralis* cultivés dans deux milieux optimales G-LBM, G-LBM + et MY inhibe fortement la croissance des bactéries G ram-positives, à savoir Bacillus subtilis (CMI de 6,67 à 23,75 μg mL -1), Enterococcus faecalis (CMI de 50 à 100 μg mL -1), Staphylococcus aureus (CMI de 21,70 à 26,70 μg mL -1) et Staphylococcus epidermidis (CMI de 6,67 à 25,00 μg mL -1). Ces résultats à été obtenu par des méthodes de diffusion sur disque d'agar(le diamètre moyen de la zone d'inhibition =15,67 mm) et de microdilution en bouillon (des méthodes qualitatif et quantitatif). Dans une étude comparatif, Oh JM et ses collaborateurs (2018),

ont montré que l'activité antibactérienne de l'acide divaricatique isolé de lichen *Evernia mesomorpha* (avec CMI de 7.0 à 64,0 μg / mL) est plus élevé que l'acide vancomycine(avec 0,78 et 25,0 μg / mL) contre les bactérie à Gram + et aussi l'acide divaricatique plus efficace que l'acide vancomycine pour le traitement des infection à SARM (Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline). Concernons l'activité anti-virale. Shtro AA et ses collaborateurs (2015), ont prouvé que les dérives de l'acide usnique ont un potentielles d'activité anti- grippale (virus de la grippe A) et l'un d'eux, le composé la valine énamine. Ce composé ne stimule pas la sélection de souches résistantes et son hépatotoxicité a été réduite comparativement à UA. Ces résultats sont confirmés par des testes *in vitro* et *in vivo*, la première est basée sur la capacité des dérivés d'acide usnique à diminuer le titre viral des cellules Madin – Darby Canine Kidney. La deuxième est basée sur la diminution de la mortalité et de l'indice de protection (60% activité modérée).

III.2.5. Activité antioxydant et photo protectrice

Les travaux de White et ses collaborateurs (2014), ont démontré que l'acide physodique isolé de lichen Hypogymnia physodes a une activité antioxydante élevée. Ce résultat à été obtenu par l'utilisation des méthodes de dosage de pouvoir réducteur et SAS, corrélée à une teneur élevée en phénoliques totaux des extraits d'acétone. Tandi que les travaux Cetin Cakmak K, Gülçin (2019), Ont monté que l'augmentation de l'activité antioxydant de l'AU à été testé par huit méthodes distinctes :(DPPH), (ABTS +), (O 2 -) et (DMPD +), (Cu 2+), (Fe 3+) et Pouvoir de réduction du TPTZ et activité de chélation des ions ferreux (Fe 3+). L'acide usnique a été trouvé sous forme de DPPH puissant (IC 50 : 49,50 μg / mL), DMPD + (IC 50 : 33,00 μg / mL), O 2 - (IC 50 : 18,68 μg / mL) et ABTS + (IC 50: 10,41 μg / mL). Et selon Fernández-Moriano C et ses collaborateurs (2016), l'activité antioxydatif de L'extrait méthanolique de Flavoparmelia euplecta et l'extrait de Myelochroa irrugans a été évaluée par des tests chimiques (ORAC et DPPH et le FRAP). Les auteurs ont trouvé qu'il existe une corrélation positive entre les paramètres antioxydants mesurés et la quantité de composés phénoliques présents dans les extraits, cette corrélation a été étudiée par une analyse de régression, R: 0,7430 par rapport aux valeurs ORAC, R: 0,7457 par rapport à la capacité de piégeage du DPPH et R: 0,7056 par rapport au pouvoir réducteur de FRAP. Concernant l'activité photoprotecteur, Legouin et ses collaborateurs (2017) ont prouvé que le lichen Vulpicida pinastri contient des métabolites secondaires (acide vulpinique, l'acide pinastrique et l'acide usnique) qui peuvent bloquer les UVA et UVB, et aussi la combinaison ente les composés les plus prometteurs contre les rayonnements UVB et UVB, l'acide usnique, l'acide vulpinique et l'acide pinastrique, a augmenté l'activité photoprotectrice. Ces prouves à été obtenu à partir de calculer l'index de photopromoteur (supérieur à 30%).

Conclusion et perspectives

Les lichens représentent une puissante source de molécules bioactives pour divers produits pharmaceutiques. Structure de plus de 1000 lichens substances sont disponibles, mais il en reste encore plus à caractérisé, qui est retardé par leur apparition à de faibles concentrations (Mitrović, 2011)

Les lichens ont dû faire évoluer divers voies de biosynthèse pour produire de tels tableaux complexes de métabolites secondaires, de voies de polycétide, d'acide shikimique et d'acide mévalonique. la plupart des substances de lichen sont des composés phénoliques, du polycétide, des composés aromatiques dérivés, la depsidone, le depside, les dibenzofuranes, acide usnique et dérivés, les xanthones et les naphthaquinones , présentent un grand intérêt. L'acide usnique est un dib (Stanojkovié T, 2019).

Il y'a Une forte relation significative entre les teneurs totales phénoliques ou flavonoïdes et leurs activités antioxydantes. Il a été observé une autre relation proportionnelle entre l'activité antibactérienne et la croissance des microorganismes (la diminution de la croissance des microorganismes donne une augmentation de l'activité antibactérienne) (Kosanic et Rankovic, 2011).

L'activité cytotoxique de l'acide usnique à été évalué par plusieurs tests comprenant : MTT, test de cytométrie en flux pour le cycle cellulaire, test d'invasion, détection des protéines dans les lysats cellulaires par western blot. Les résultats ont montré que l'acide usnique joue un rôle important dans la dans la régulation de l'apoptose, de la tumorigénèse et de la motilité des cellules cancéreuses (Nguyen et *al.*, 2014).

A partir des résultats des articles scientifiques on peut conclure que les activités biologiques des lichens sont nombreux et diverses, notamment l'activité écologique, anticancéreuse, andioxydante, photoprotectrice, anti-fongique, pharmacologique. Et parmi ces activités, l'activité pharmacologique est la plus importante car elle inclue la majorité des activités (antioxydant, antibactérienne, anti-fongique, anticancéreuse).

A l'issue de ce travail, Je peux suggérer un protocole expérimental pour identifier des molécules bioactives lichéniques qui ont des effets thérapeutiques et des activités biologiques (Activité anticancéreuse, antioxydant, écologique, antibactérienne...).

Xanthoria parietina est une espèce cosmopolite, qui est l'un des lichens les plus utilisés dans les études scientifiques. Il existe nombreux domaines d'utilisation parmi eux : Le domaine de la médecine, l'industrie et cosmétique, en raison de ses caractéristiques de couleur et de sa richesse en métabolites secondaires.

La première étape consiste à récolter le lichen, ce qui est facile (séparation entre le lichen et le substrat (arbre)). Cela peut être fait en toute saison et ne pose aucune difficulté avec l'utilisation d'outils simples comme un couteau et un rasoir.

Deuxièmement, Identification des lichens récoltés : pour caractériser l'espèce (morphologiques générales, telles que la forme, la couleur, la hauteur, l'orientation des extrémités et le type de ramification)

Troisièmement, Les lichens récoltés sont débarrassés d'éventuels contaminants (mousses, terre, débris végétaux...). Puis, ils sont séchés, à l'air libre pendant environ 72 heures, et sont réduits en poudre par broyage manuelle. En effet, le broyage permet d'augmenter la surface de contact entre le solvant et le lichen, et ainsi de favoriser l'extraction des composés.

Quatrièmement, Extraction par macération.

- ➤ Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules chimiques contenant dans Les lichens en utilisant des solvants organiques qui accélèrent et augmentent le rendement d'extraction.
- L'extraction des métabolites secondaires est réalisée en tenant compte de La nature du solvant, du temps et de la température d'extraction.
- L'extraction par macération consiste à faire tremper la biomasse dans un solvant pendant 24 h ou plusieurs jours sous agitation mécanique et à température pièce. La biomasse est ensuite filtrée pour récupérer le solvant qui contient les produits naturels.
- L'extraction séquentielle a été privilégié par rapport à une extraction classique (une seule étape d'extraction), dans le but d'optimiser les rendements et d'extraire le plus grand nombre de métabolites lichéniques. Les extractions successives par macération ont ensuite été mises en œuvre avec des solvants de polarités croissantes (d'heptane, hexane, toluène, éther d'éthylique, dichlorométhane, tétrahydrofurane, acétone, acétate d'éthyle, ou de méthanol).
- ➤ Une quantité déterminée de lichen (20g), broyé, est macérée dans 200 ml d'éther d'éthyle pendant 24h à température ambiante puis filtré, sachant que chaque 24 heures. Apré, la filtration et la conservation de sédiment encore une fois dans 200 ml d'acétone après 24h filtre et encore une fois dans 200 ml de méthanol. A la fin l'extrait obtenu concentré à sec au moyen d'un évaporateur rotatif (BUCHI) à une température 40 °C pour l'obtention d'un extrait sec.
- > Calculer le rendement d'extraction R%.

Puis la quantification par Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La poudre blanche, issue de la procédure d'extraction, a été analysée par HPLC semi-préparative avec détection DAD (Agilent Technologies 1260 Infinity). Pour l'analyse quantitative et l'identification de métabolites secondaire a des longueurs d'ondes bien déterminées.

La structure du composé a été vérifiée par spectres RMN à température ambiante

Finalement, des tests ont étés utilisés (MTT, DPPH, ORAC, test d'alimentation sans choix, diffusion sur disque d'agar....) pour determiner l'activité biologique appropriate.

Références bibliographiques A

Ait Hammou M (2015). "Analyses taxonomique et écologique des lichens de la région de Tiaret.". Thèse de doctorat en sciences. Université Ahmed Ben Bella d'Oran, Faculté des sciences de la nature et de la vie, 326.

Andraud-Dieu A (2015). Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique : Etude phytochimique de trois lichens et approche synthétique de deux composés actifs. Thèse pour obtenir le grade de docteur l'Université de Limoges, Français. Biologie moléculaire. 231.

В

Belleenfant S, Beguinot J, Vallade J, Sirugue D, Lemmel C (2010). Groupe Lichens de Bourgogne (GLIB). Les lichens une symbiose exemplaire. Rev. sci. Bourgogne-Nature. 45.

Burkin AA, Kononenko GP (2011). Mycotoxin contamination of cup moss. Dokl. Ross. Akad. S-kh.Nauk, 2, 54-56.

 \mathbf{C}

Cakmak KC, Gülçin İ (2019). Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid-an activity-structure insight. Toxicology Reports, 6, 1273-1280.

Calvier L, Maria M, Reboul P, Cachofeiro V, Martinez-Martinez E, Rudolf A. De Boer, Poirier F, Lacolley P, Zannad F, and Patrick (2013). "Galectin-3 Mediates Aldosterone-Induced Vascular Fibrosis." Arterioscleroses, ThrombosIs, and Vascular Biology. 33, 67–75.

Cocchietto M, Skert N, Nimis P, Sava, G (2002). Une revue sur l'acide usnique, un composé naturel intéressant. Naturwissenschaften, 89 (4), 137-146.

F

Felczykowska A, Pastuszak-Skrzypczak A, Pawlik A, Bogucka K, Herman-Antosiewicz A, et Guzow-Krzemińska B (2017). Activités antibactériennes et anticancéreuses d'extraits d'acétone de champignons cultivés in vitro formant des lichens. Médecine complémentaire et alternative BMC, 17 (1), 1-12.

Fernández-Moriano C, Gómez-Serranillos MP, Crespo A (2016). Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. Pharmaceutical Biology, 54(1), 1-17.

 \mathbf{E}

Elix JA, Stocker-Worgotter E (2008). Modern methods and approaches in biomonitoring and bioprospection. Recent advances in lichnology. Edition. Springer. India.254.

 \mathbf{G}

Gadea A, Fanuel M., Le Lamer AC, Boustie J, Rogniaux H, Charrier M, Devehat LL (2020). Mass Spectrometry Imaging of Specialized Metabolites for Predicting Lichen Fitness and Snail Foraging. Plants, 9(1), 70.

Goga M, Kello M, Vilkova M, Petrova K, Backor M., Adlassnig W, Lang I (2019). Le stress oxydatif médié par l'acide gyrophorique du lichen Umbilicaria hirsuta a affecté l'apoptose et les voies de stress / survie dans les cellules HeLa. BMC médecine complémentaire et alternative, 19 (1), 1-13.

Goga M, Elečko J, Marcinčinová M, Ručová D, Bačkorová M, Bačkor M (2020). Métabolites du lichen: un aperçu de certains métabolites secondaires et de leur potentiel biologique. Co-évolution des métabolites secondaires, 175-209.

Gregory G, Dimijian MB (2003). Fasxicule enseignants.

K

Kosanić M, Ranković B (2011). Antioxidant and antimicrobial properties of some lichens and their constituents. J Med Food. 14(12)1624-30.

Kosanic M, Rankovic B, Stanojkovic T, Vasiljevic P, Manojlovic N (2014). Activités biologiques et composition chimique des lichens de Serbie. *EXCLI J.*13, 1226-1238.

Lagarde A (2017). Études phytochimiques du lichen Nephroma laevigatum et de ses champignons endolichéniques. Évaluation des activités antiprolifératives et anti-biofilms. Thèse pour obtenir Docteur de l'Université de Limoges .Chimie appliquée. Chimie des substances naturelles. 230.

Lebail BEF, Lebail JBEF (1853). Des lichens: considérés sous le point de vue économique, médical et physiologique (nutrition). Rignoux.

Legouin B, Lohézic-Le Dévéhat F, Ferron S, et al (2017). Specialized Metabolites of the Lichen Vulpicida pinastri Act as Photoprotective Agents. Molecules. 22(7), 1162.

Le Pogam P, Herbette G Boustie J (2015). Recent Advances in Lichenology. 229-261.

Le Pogam-Alluard P (2016). Analyses de lichens par spectrométrie de masse : déréplication et his- tolocalisation. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges, Chimie analytique. 258.

M

Mambu L, Millot M (2017). Études phytochimiques du lichen Nephroma laevigatum et de ses champignons endolichéniques. Évaluation des activités antiprolifératives et anti-biofilms. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges, Chimie appliquée / Chimie des substances naturelles. 230.

Manier N, Deram A, Broos K, Denayer F, and Van Haluwyn C (2009). "White Clover Nodulation Index in Heavy Metal Contaminated Soils—a Potential Bioindicator." Journal of Environmental Quality .38: 685–692.

Mitrović T, Stamenković S, Cvetković, V, Nikolić M., Tošić, S, Stojičić, D (2011). Lichens as source of versatile bioactive compounds. Biologica Nyssana, 2(1), 1-6.

Molnar K, Farkas E (2010). Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites. Review. Biological Activities of Lichen Substances, 157-173.

Murtagh G J, Dyer P S, Crittenden P D, reproductive systems-sex and single lichen (2000). Nature, 404: 564-564.

N

Nguyen TT, Yoon S, Yang Y, Lee HB, Oh S, Jeong MH, Lee KY. (2014). Lichen secondary metabolites in Flavocetraria cucullata exhibit anti-cancer effects on human cancer cells through the induction of apoptosis and suppression of tumorigenic potentials. PloS one, 9(10), e111575.

Noel A (2017), Obtention de composes azotes bioactifs d'origine naturelle. Etude de biotransformation par des bactéries associées aux lichens. Thèse pour obtenir le garde de docteur de l'université de Rennes 1. Bretagne. Chmie.325.

0

Oh JM, Kim YJ, Gang HS, Han J, Ha HH, Kim H (2018). Antimicrobial Activity of Divaricatic Acid Isolated from the Lichen Evernia mesomorpha against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Molecules. 23(12): 3068.

Ozanda P, Clauzade G.1970. "Les lichens étude biologique et flore illustré Edition : Masson, 8 (39), 109-121.

S

Shrestha G, Clair LLS (2013). Lichens: une source prometteuse d'antibiotiques et de médicaments anticancéreux. Revues de phytochimie, 12 (1), 229-244.

Shtro AA, Zarubaev VV, Luzina OA, Sokolov DN, Salakhutdinov NF (2015). Derivatives of usnic acid inhibit broad range of influenza viruses and protect mice from lethal influenza infection. Antivir Chem Chemother. 24(3-4), 92-98.

Shukla V, Joshi G P, Rawat M S M (2010). «Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: A review », Phytochemistry Reviews, 9 (2), 304.

Solárová Z, Liskova A, Samec M., Kubatka P, Büsselberg D, Solár P (2020). Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. Biomolecules, 10(1), 87.

Stanojkovié T (2019). Lichen secondary Métabolits.Institude of o nology and Radiologie of Serbia, Belgrade, Serbia. Springer Nature Switzerland AG2019.

Stocker-Worgotter E (2015). Recente Advances in lichonology.University of Fsalzbrg, Hellbrumer Str. 34. 254.

Stocker-Wörgötter E (2015). Search for antimicrobial molecules of lichen origin: Phytochemical study of three lichens and synthetic approache of two active compounds. In Natural Product Reports, 188-200.

Stocker-Wörgötter E (2015). Biochemical diversity and ecology of lichen-forming fungi: Lichen substances, chemosyndromic variation and origin of polyketide-type metabolites (biosynthetic pathways). In Recent Advances in Lichenology. Springer, New Delhi. 161-179.

 \mathbf{T}

Thadhani VM, Karunaratne V (2017). Potential of lichen compounds as antidiabetic agents with antioxidative properties: A review. Oxidative medicine and cellular longevity.

Tievant P (2001). Guide des lichens. 350 espèces de lichens d'Europe. Paris, 12-26.

 \mathbf{V}

Van Haluwyn C, Lerond M (1986). "Les Lichens et La Qualité de L'air." Evaluation Méthodologique et Limites. Rapport Final Du Ministère de l'Environnement [SRETIE]. 213.

Van Haluwyn C, Asta J, Gavériaux, JP. (2009). Guide des lichens de France - Lichens des arbres (Belin).

 \mathbf{Y}

Yuan X, Xiao S, Taylor T N (2005), lichen like symbiosis 600 million ago. Science, 308, 1017-1020.

Présenté par: KIMOUCHE Meriem

Encadreur: Mme SALEM Samira

Date de soutenance:

Idenfification des molécules bioactives lichéniques

Résumé

Lichens, Malgré sa petite taille, il est considéré comme une source naturelle riche de molécules bioactives qui lui confèrent des activités biologiques qui contribuent à résoudre des problèmes médicaux, Problèmes climatiques et pharmaceutiques.

C'est l'une des activités biologiques les plus efficaces des lichens, L'activité pharmaceutique car elle contribue grandement à la production de composés efficaces et est une activité majeure qui inclut l'activité antibactérienne, l'activité antioxydant et l'activité anticancéreuse et chaque activité a une méthode spécifique pour déterminer l'efficacité d'un extrait ou d'un métabolite secondaire (Activité anticancéreuse : mesure la viabilité cellulaire, activité antimicrobienne : MCI et MDA, Activité antioxydant : DPPH, ORAC..).

Des méthodes modernes et innovantes (HPLC, LDI-MSI) ont contribué à l'identification des molécules bioactives ou des extraits présents dans le solvant brut.

Mots clés: Lichens, molécules bioactives, Activité pharmaceutique, HPLC, LDI-MSI.

Abstract

Lichens, Despite its small size, it is considered a rich natural source of bioactive molecules that give it biological activities that help solve medical, climatic and pharmaceutical problems.

It is one of the most effective biological activities of lichens, Pharmaceutical activity because it contributes greatly to the production of effective compounds and is a major activity that includes antibacterial activity, antioxidant activity and anticancer activity and each activity has a specific method to determine the efficacy of an extract or secondary metabolite (Anticancer activity: measures cell viability, Antimicrobial activity: MCI and MDA, Antioxidant activity: DPPH, ORAC...).

Modern and innovative methods (HPLC, LDI-MSI) have contributed to identification of bioactive molecules or extracts present in the raw solvent.

Key words: Lichens, bioactive molecules, Pharmaceutical activity, HPLC, LDI-MSI.

الملخص

على الرغم من صغر حجمه، إلا أنه يعتبر مصدرًا طبيعيًا غنيًا للجزيئات النشطة بيولوجيًا التي تمنحه أنشطة بيولوجية تساعد في حل المشكلات المناخية والصيدلانية. في حل المشكلات الطبية والمشكلات المناخية والصيدلانية. يعتبر النشاط الصيدلاني من أكثر الأنشطة البيولوجية فعالية للأشنات ، لأنه يساهم بشكل كبير في إنتاج مركبات فعالة وهو نشاط رئيسي يشمل النشاط المضاد للبكتيريا والنشاط المضاد للأكسدة والنشاط المضاد للسرطان، ولكل نشاط طريقة محددة

لتحديد فعالية مستخلص أو مستقلب ثانوي (نشاط مضاد للسرطان: يقيس حيوية الخلية، نشاط مضاد للميكروبات (DRAC)، نشاط مضاد للأكسدة MSI, MDA).

ساهمت الأساليب الحديثة والمبتكرة (HPLC, MDI-MSI) في تحديد الجزيئات النشطة بيولوجيا او المستخلصات الموجودة في المذيب الخام.

الكلمات المفتاحية الاشنات، الجزيئات النشطة بيولوجيا، النشاط الصيدلاني،