



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Bitechologie

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

THEME

L'étude et l'évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne du lichen *Xanthoria parietina*

Réalisé par :

ABDESSELAM Douaa

SADOU Marwa

Soutenu le 30/06/2024 devant le jury composé de :

Président(e)	Mme SAADI W	MCB	U. Khemis Miliana
Examineur	Mme ITATAHINE A	MCB	U. Khemis Miliana
Promoteur	Mr BELABED B	MAA	U. Khemis Miliana

Remerciements

Avant tout, nous remercions « Allah » le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à adresser nos très sincères remerciements à notre promoteur

M^r Belabded B qui nous ont guidé dans ce travail, Merci pour nous avoir accordé votre temps et d'avoir être très patients avec nous, Merci d'avoir mis votre expérience à notre profit.

Nous tenons à présenter nos sincères et vifs remerciements aux membres de jury : **M^{me} Saadi W** qui nous fait l'honneur de présider ce jury et à **M^{me} Itatahine A** d'avoir exprimée son entière disponibilité à participer à ce jury et à examiner ce mémoire.

Nous remercions également toutes les équipes des laboratoires d'analyses **Dr Houti** et ceux **Dr Zibouche** qui nous ont ouvert leurs portes pour faire les différentes analyses.

Nous remercions s'adressent également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

JE DEDIE CE MODESTE TRAVAIL A :

Mon père : DJILALI

La lumière de ma vie ; merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

Ma mère : SAIDA

de m'avoir donnée la vie et la joie de vivre.

Ma sœur: CHIRAZ

Mon encadreur : BELABED BELLAL

Pour ses conseils, sa présence et sa patience.

Mes TOUT mes amis.....

Douaa

Dédicace

Mon père : BELKACEM

La lumière de ma vie et, merci pour toute que vous avez fait pour moi.

Ma mère : KHADIDJA

Pour m'avoir donnée la vie et la joie de vivre.

Mes frères : MOHAMED AISSAM EL DIN

Mes sœurs : AYA , MARIA

Mon encadreur : BELAABED BILAL

Pour leur conseil, leur présence, Et leur patience.

Mes TOUT amis...

Marwa

Résumé :

Les lichens sont des organismes symbiotiques possédant différentes activités biologiques et sont considérés comme un réservoir des métabolites secondaires grâce à leur diversité. L'objectif de cette étude était de valoriser l'espèce *Xanthoria parietina* en évaluant son activité antimicrobienne et antioxydante en utilisant deux extraits, l'eau distillée et l'éthanol. Les résultats montrent aucun résultat de l'eau distillée comme solvant d'extraction des métabolites à effet antibactérien, où le résultat de l'antibiogramme était négatif. L'extrait éthanolique avait un effet antimicrobien contre une souche *S. aureus* et le champignon *C. albicans* avec des CMI de 20 µg/ml et 30 mg/ml respectivement.

L'activité antioxydante des deux extraits était intéressante avec un IC₅₀ pour la conversion du DPPH égale à 37,27 ± 3,75 µg/ml pour l'extrait aqueux et 46,03 ± 4,05 µg/ml pour l'extrait éthanolique. La teneur en flavonoïdes était de l'ordre de 14.32 ± 1.96 pour l'extrait aqueux et 20.20 ± 2.12 pour l'extrait éthanolique.

Mots clés : lichen, *Xanthoriaparietina*, antioxydante, antimicrobien, DPPH.

Abstract:

Lichens are symbiotic organisms that have different biological activities and have a potential to be a reservoir for secondary metabolites. The aim of this study is to valorize the species *Xanthoria parietina* by evaluating its antioxidant and antibacterial metabolites activities by using distilled water and ethanol as solvents for the extraction. The results show that the aqueous extract had an antimicrobial inefficiency for all tested species. The ethanolic extract had a positive effect against *S.aureus* and *C. albicans* with a MIC of $20 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$ and $30 \pm 2.03 \mu\text{g/mL}$ respectively.

For the antioxidant activity, the DPPH scavenging activity was quite interesting with an IC 50 of $37,27 \pm 3,75 \mu\text{g/mL}$ for the aqueous extract and $46,03 \pm 4.05 \mu\text{g/mL}$ for the ethanolic extract. The flavonoids content was about $14.32 \pm 1.96 \text{ mgQE/ gDM}$ et $20.20 \pm 2.12 \text{ mgQE/ gDM}$ for the aqueous and ethanolic extracts respectively.

Key words: Lichen, *Xanthoria parietina*, antioxidant, antimicrobial, DPPH.

الأشنيات هي كائنات تكافلية لها أنشطة بيولوجية مختلفة ولديها القدرة على أن تكون مستودعًا للمكونات الثانوية. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم نوع *Xanthoria parietina* من خلال تقييم نشاط مكوناته المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا باستخدام الماء المقطر والإيثانول كمذيبات للاستخلاص. أظهرت النتائج أن المستخلص المائي لم يكن له أي تأثير مضاد للميكروبات على جميع الأنواع التي تم اختبارها. مستخلص الإيثانول له تأثير إيجابي ضد المكورات العنقودية الذهبية والمبيضة البيضاء مع الحد الأدنى من التركيز للتثبيط يساوي $1,12 \pm 20$ ميكروجرام/مل و 2.03 ± 30 ميكروجرام/مل على التوالي.

بالنسبة لنشاط مضادات الأكسدة، كان نشاط كسح DPPH مثيرًا للاهتمام للغاية مع IC 50 يبلغ $37,27 \pm 3.75$ ميكروجرام/مل للمستخلص المائي و $46,03 \pm 4.05$ ميكروجرام/مل للمستخلص الإيثانولي. كان محتوى الفلافونويد حوالي 14.32 ± 1.96 mgQE/ gDM و 20.20 ± 2.12 mgQE/ gDM للمستخلصين المائي والإيثانولي على التوالي.

الكلمات المفتاحية : أشنيات، *Xanthoria parietina*، مضاد الأكسدة، مضاد الميكروبات، DPPH.

Liste des abréviations :

Abs : Absorbance

DO : Densité optique

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (a,a-diphényl-B-picrylhydrazyle)

GCMS : Chromatographie Gazeuse- Spectroscopie de Masse

HPLC : High Pression LiquidChromatography (Chromatographie Liquide à Haute Performance)

NMR : Résonance Magnétique Nucléaire

TLC : Thin Layer Chromatography (Chromatographie sur Couche Mince)

Liste des figures :

Figure01	<i>Lichens sur des substrats artificiels</i>	<u>05</u>
Figure02	<i>représentation des différents types de thalles lichéniques</i>	<u>06</u>
Figure03	<i>Structure anatomique des lichens : structure homogène (a), structure hétérogène (b).</i>	<u>07</u>
Figure04	<i>classification des lichens .</i>	<u>10</u>
Figure05	<i>fructification de la reproduction sexuée.</i>	<u>11</u>
Figure06	<i>fragments intervenants dans la reproduction asexuée</i>	<u>12</u>
Figure07	<i>Echanges nutritionnels entre les différents partenaires de la symbiose.</i>	<u>12</u>
Figure08	<i>utilisation pharmaceutique a base des lichens.</i>	<u>13</u>
Figure09	<i>Espèce xanthoria parietina</i>	<u>15</u>
Figure10	<i>Voie de biosynthèse des métabolites secondaires du lichen.</i>	<u>21</u>
Figure11	<i>Structures d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique</i>	<u>22</u>
Figure12	<i>structure d'acide protocétrarique et acidenorstictique</i>	<u>23</u>
Figure13	<i>depstone, l'acidepicrolichénique.</i>	<u>23</u>
Figure14	<i>Biogenèse des dibenzofuranes par couplage de deux unités de type acide orsellinique.</i>	<u>24</u>
Figure15	<i>la structure des anthraquinones.</i>	<u>24</u>
Figure16	<i>Schéma de biosynthèse proposé pour les chromone.</i>	<u>25</u>
Figure17	<i>Structure de base d'une xanthone.</i>	<u>25</u>
Figure18	<i>Situation géographique de la wilaya de Saida.</i>	<u>34</u>
Figure19	<i>Xanthoria parietina .</i>	<u>35</u>
Figure20	<i>Séchage du lichen</i>	<u>36</u>
Figure 21	<i>Transformation du lichen en poudre.</i>	<u>36</u>
Figure 22	<i>L'extrait éthanolique.</i>	<u>37</u>
Figure 23	<i>L'extrait aqueux.</i>	<u>37</u>
Figure 24	<i>l'étape de filtration.</i>	<u>37</u>
Figure 25	<i>Evaporation d'extraitéthanolique.</i>	<u>38</u>
Figure 26	<i>Suspension de Mc Farland.</i>	<u>39</u>

Figure 27	<i>Résulta d'activité antioxydant d'extrait éthanolique.</i>	<u>41</u>
Figure 28	<i>Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.</i>	<u>42</u>
Figure 29	<i>Le courbe étalonnage de la quercétine.</i>	<u>45</u>
Figure 30	<i>Résultats de CMI du deux souches pathogènes.</i>	<u>48</u>
Figure 31	<i>Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux, éthanolique et acide ascorbique.</i>	<u>49</u>
Figure 32	<i>Les concentrations efficaces à piéger 50% (IC50) du radical DPPH par les extraits étudiés et l'acide ascorbique.</i>	<u>50</u>
Figure 33	<i>Teneur en flavonoïde.</i>	<u>51</u>

Liste de tableaux

Tableau 1	<i>Activité biologique de quelques substances lichiniques citées par littérature.</i>	30
Tableau 2	<i>Les micro-organismes utilisés.</i>	36
Tableau 3	<i>Tableau de dosage des Flavonoïdes</i>	44
Tableau 4	<i>Résultats de l'évaluation de l'effet antibactérien.</i>	46
Tableau 5	<i>Résultats de la sensibilité et la résistance des extraits contre les souches pathogènes.</i>	47
Tableau 6	<i>Diamètre des zones d'inhibition</i>	47
Tableau 07	<i>Résultats de dosage des flavonoides .</i>	50

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

La liste de tableaux

Introduction 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Généralités sur les lichens 4

1.1 Origine et écologie : 4

1.1.1 L'origine : 4

1.1.2 L'écologie : 4

1.2 Morphologie et anatomie des thalles : 5

1.2.1 Morphologies des lichens : 5

1.2.2 Anatomies des thalles : 7

1.2.2.1 Les principaux organes portés par le thalle 7

2 Les constituants des lichens 8

2.1 Le Mycobionte : 9

2.2 Photobionte : 9

3 Classification des lichens 10

4 Reproduction des lichens 11

4.1 La reproduction sexuée : 11

4.2 La reproduction asexuée : 12

5 Métabolisme des lichens 12

6 Utilisation des lichens 13

6.1 Usage alimentaire : 13

6.2 Usage médical: 13

6.3 Usages industriel : 13

6.4 La bio-indication 14

7. *Xanthoria parietina* 15

7.1 Définition 15

7.2 Classification : 15

7.3	Reproduction	15
7.4	Intérêt écologique.....	17
1	Les métabolismes sur des lichens :.....	17
1.1	Les métabolites primaires.....	18
1.1.1	Définition.....	18
1.1.2	Les classes de métabolites primaires.....	18
1.1.2.1	Les glucides	18
1.1.2.2	Les lipides.....	18
1.1.2.3	Les protéines.....	18
1.2	Les Métabolites secondaires	19
1.2.1	Définition.....	19
1.2.2	Les classes de métabolites secondaires	19
1.2.2.1	Les alcaloïdes.....	19
1.2.2.2	Les terpénoïdes	19
1.2.2.3	Les composés phénoliques	19
1.2.2.4	Les flavonoïdes	19
1.2.3	Les voies de métabolisme secondaire	20
1.2.3.1	La voie Acétate – Polymalonate	20
1.2.3.2	Apartir de l'acétylCoA	20
1.2.3.3	La voie de l'acide shikimique.....	20
1.2.4	Principale famille de métabolisme secondaire :.....	22
1.2.4.1	Les depsides.....	22
1.2.4.2	Les depsidones.....	22
1.2.4.3	Les depsones et diphényléthers	23
1.2.4.4	Les dibenzofuranes et l'acide usnique.....	23
1.2.4.5	Les anthraquinones, naphtoquinones, chromones et xanthones	24
1.2.4.5.1	Les anthraquinones et naphtoquinones	24
1.2.4.5.2	Les chromones	25
1.2.4.5.3	Les xanthones.....	25
1.2.4.5.4	Les phtalides.....	26
1.2.5	Méthodes de détermination des métabolites secondaires du lichen	26
1.2.5.1	Test ponctuel.....	26
1.2.5.2	Microcristallographie.....	26
1.2.5.3	Chromatographie sur papier	27
1.2.5.4	Chromatographie sur couche mince (CCM).....	27

1.2.5.5	Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	28
1.2.5.6	Méthodes chimiques	28
1.2.5.7	Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse.....	29
1.2.6	Rôle des métabolites secondaires	29

PARTIE EXPERIMENTALE

1	Préparation des extraits :	34
	Présentation de la zone d'échantillonnage :	34
1.1	Matériel	35
1.1.1	Matériel végétal :	35
1.1.2	Matériel biologique :	36
1.2	Déshydratation:	36
1.3	Broyage:	36
1.4	Extraction par macération :	37
1.5	Filtration:	37
1.6	Evaporation :	38
2	Evaluation de l'activité antimicrobienne	38
2.1	Mc Farland :	38
	Préparation de Mc Farland :	67
2.2	Activité antibiogramme	39
3	Activité antioxydant :	40
	Mode opération :	67
3.1	Activité antiradicale	41
4	Dosage de Flavonoïdes :	43
1	Les résultats de l'activité antibactérienne.....	45
2	Résultats de l'activité antioxydante :	48
2.1	Résultat d'activité antioxydant	48
3	Résultats de dosage des flavonoïdes.....	50
	Conclusion	48
	Références	48
	Annexe.....	50

INTRODUCTION

Introduction :

L'introduction des antibiotiques en thérapeutique a révolutionné le traitement des maladies infectieuses. Malheureusement, depuis ces trente dernières années, l'antibiorésistance est devenue la préoccupation majeure de bon nombre de cliniciens (**Aboya, 2013**). La diminution de l'efficacité des antibiotiques actuels fait de la recherche de nouveaux remèdes un objectif prioritaire.

L'émergence de nouveaux agents pathogènes augmente les besoins de découvrir de nouvelles molécules bioactives (**Silver, 2011**). La diversité du monde végétale et microbien est largement exploitée aujourd'hui afin de découvrir de nouvelles molécules qui peuvent remplacer efficacement les antibiotiques actuels qui perdent leur activité de jour en jour.

Les lichens, organismes résultant d'une association symbiotique entre un champignon et une algue, qui produisent des métabolites biologiquement actifs avec une grande variété d'effets, y compris des activités antibiotique, antifongique, antivirales, anti-inflammatoires, analgésiques, antipyrétiques, antiproliférative et cytotoxiques.

Cependant, seulement un nombre très limité de ces substances ont été examinées pour leurs activités biologiques et leur potentiel thérapeutique en médecine (**Boustie & Grube, 2005**). Les produits dérivés des lichens et leurs propriétés antibiotiques présentent un intérêt grandissant pour les chercheurs. En effet, 50% des lichens possèdent des activités antibactériennes (**Sharnoff, 1997**) et antifongiques (**Mitrović et al., 2011**). L'acide usnique est l'un des dérivés lichéniques les plus fréquemment déclarés avec une forte activité antimicrobienne (**Ingoldsdottir, 2002**). Cette caractéristique le propose comme solution alternative aux parabènes, et en fait un candidat de choix en tant que conservateur (**Dieu A, 2015**).

Les lichens sont aussi connus pour leur capacité de produire des molécules à caractère antioxydant et qui deviennent de plus en plus intéressantes pour les chercheurs et les industriels plus particulièrement (**Athamena, 2009**). Devant l'augmentation considérable du nombre de pathologies impliquées par les antioxydants synthétiques, de nombreux chercheurs à travers le monde, se sont orientés vers la recherche de composés naturels.

Le lichen *Xanthoria parietina* est très connu comme une espèce bio indicatrice de la pollution atmosphérique mais sur le plan thérapeutique elle est peu étudiée malgré qu'il puisse renfermer plein d'activités exploitable à l'échelle scientifique et industrielle.

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail, dont l'objectif essentiel est d'identifier le lichen *Xanthoria parietina* et d'évaluer l'activité antioxydante et antimicrobienne de ses extraits éthanoliques et aqueux.

Pour cela, cette étude a été devisée en deux principaux volets, un volet bibliographique et un autre pratique ; le premier est à son tour divisé en 3 chapitres incluant la présentation des lichens et leur diversité, les métabolites secondaires des lichens et une description approfondie de l'espèce *Xanthoriaparietina*. Le deuxième volet pratique renferme les méthodes et les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante des extraits de l'espèce, et nécessite aussi une continuation afin d'identifier les espèces chimiques présentes dans les extraits et aller vers l'évaluation d'autres activités telles que l'anticancéreuse.

Les résultats obtenus ont été intéressants malgré les obstacles rencontrés durant la réalisation de ce mémoire, citant ainsi le manque des moyens et surtout des produits ce qui nous a obligé de faire des tests en dehors de l'université.

PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE

1 Généralités sur les lichens

1.1 Origine et écologie :

1.1.1 L'origine :

Le terme de « lichen » est d'origine grecque et se trouve pour la première fois dans les écrits de Théophraste qui désignent des plantes croissant sur les troncs de sarbres, auxquelles on attribuait à l'époque des vertus médicinales (**Ozenda & Clausade, 1970**).

Durant les époques suivantes, les lichens ne sont que très épisodiquement mentionnés, leur étude en tant que groupe botanique distinctes relativement récente, bien qu'au 17^{ème} siècle, on les a pour la première fois séparée nettement des algues et des bryophytes.

Ainsi appelle-t-on « lichen », tous les végétaux présentent une individualité bien marquée qui résultent de la symbiose d'un Eumycète ou un chlorophyte (**Ozenda & Clausade, 1970**).

1.1.2 L'écologie :

Les lichens sont présents dans le monde entier. On les trouve sur les écorces des arbres, sur le bois, les rochers, les murs, les tombes et les toits, sur le sol de forêts claires, dans les landes, les marais. La plupart des espèces présentent des conditions écologiques bien définies (**Roland, et al., 2008**). Ils sont présents dans des zones les plus extrêmes, vers les pôles, jusqu'aux sommets, à la limite des neiges éternelles, dans les déserts rocheux. On peut les considérer plus d'un égard comme des êtres vivants pionniers, capables de coloniser le rocher le plus dur, le sol le plus désert, de supporter de très grosses variations de température : très froides (jusqu'à -40°C) ou très chaudes, des taux d'humidité ou de sécheresse très élevés.

La végétation lichénique dépend étroitement des facteurs écologiques, en particulier de facteurs substratiques, climatiques et biologiques. Ces facteurs jouent un rôle dans la croissance, le développement, la distribution et la diversité des espèces de lichens. (**Adjiri, 2020**).

Les lichens colonisent les milieux terrestres suffisamment stables et humides, et se rencontrent même dans certains milieux aquatiques ainsi on peut distinguer trois principaux types de peuplements :

→ Sur les rochers : les lichens saxicoles Les lichens qui colonisent les rochers sont très nombreux et diversifiés ; il est possible de distinguer des lichens calcifuges (sur terrains non calcaires) et d'autres calcicoles.

→ Sur le sol : les lichens terricoles Les lichens terricoles se trouvent sur le sol nu ou sur les mousses du sol ou des rochers. Dans des pelouses, landes, bois clairs. Un certain nombre d'entre eux vivent en saprophytes aux dépens de la matière organique présente dans le sol.

→ Sur les végétaux : les lichens épiphytes Colonisant les écorces de nombreux arbres et arbustes, les lichens corticoles sont très abondants et variés. Les essences, résineuses montrent une flore légèrement différente de celle notée sur les essences feuillues. D'autres groupements se rencontrent sur le bois mort (lichens lignicoles) ou sur les feuilles persistantes (lichens folicoles).



Figure 01: Lichens sur des substrats artificiels (Bellenfant et al., 2010).

1.2 Morphologie et anatomie des thalles :

Les lichens sont des plantes supérieures, ne possède un nifeuilles, nitiges, niracines, ni appareil conducteur et portant les organes dereproduction,mais possède un appareil simple : c'est le thallequi est caractérisé par une grande diversité de formes et de couleur (**Haluwyn, et al., 2012**).

Selon (**Haluwyn, et al., 2009**) même si les lichens sont très différents morphologiquement, leur structure anatomique est au contraire très uniforme et assure leur unité.

1.2.1 Morphologies des lichens :

- ✓ **Formes** : La structure résultant de la symbiose lichénique est le plus souvent organisée par le mycobionte.
- ✓ **Couleur** : La couleur des thalles est ordinairement terne : verdâtre, grisâtre, brune plus ou moins foncée, noire ; plus rarement vive : verte, jaune, orangée ou rouge
- ✓ **Les différents types de thalle** :

On distingue plusieurs grands types de thalles morphologiques :

Les thalles crustacés : ce sont les thalles les pluslargementreprésentés.

Les espèces crustacées aux échanges faibles et à croissance plus lente que les espèces foliacées et fruticuleuses, sont moins affectées par la pollution atmosphérique et résistent mieux à l’environnement urbain et industriel.

- Les thalles foliacés : ils ressemblent à de petites feuilles plus au moins lobées. (ex : *Parmelia, Xanthoria*)
- Les thalles fruticuleux : ils forment des faisceaux de tiges plus au moins ramifiées. (ex : *Usnea, Ramalina*)
- Les thalles complexes (thalles composites) : ils comportent un thalle primaire crustacé, squamuleux ou plus rarement foliacé et un thalle secondaire fruticuleux. (**Ramade, 1995**).
- Les thalles squamuleux : ce sont des thalles formés par des sortes d’écailles, plus au moins rapprochés et contigües. (ex :*Tonina, Fulgensia* et *Squamarina*).
- Les thalles gélatineux : formés par des filaments très fins.
- Les thalles lépreux : ressemblent à de la poudre se détachant facilement du substrat. (ex : *Lepraria, Chrysothrix*).



Figure 02: représentation des différents types de thalles lichéniques (Gavériaux,2009)

1.2.2 Anatomies des thalles :

On peut distinguer deux types de structure : homéomère et hétéromère (**Haluwyn et al., 2012**).

Structure homéomère :

Les cellules algales sont réparties de façon homogène parmi les hyphes. On retrouve cette structure chez les lichens crustacés (*Caloplaca*), les lichens gélatineux.

Structure hétéromère :

Histologiquement le thalle est formé par la superposition de plusieurs couches bien visibles sur une section transversale (cortex, couche algale, médulle).

Dans ce type de structure, il existe trois sous-types :

- ✓ La structure radiée pour la plupart des lichens fruticuleux (couche algale faisant le tour de la section transversale).
- ✓ La structure stratifiée pour la plupart des lichens foliacée et un petit nombre de lichens aux thalles fruticuleux ou crustacés (la coupe transversale permet d'observer la succession suivante : cortex supérieur, couche algales, médulle, cortex inférieur pouvant former des rhéines).
- ✓ La structure filamenteuse moins répandue (thalle constitué par des filaments de chlorophycées ou de cyanophytes revêtus par des gaines d'hyphes).

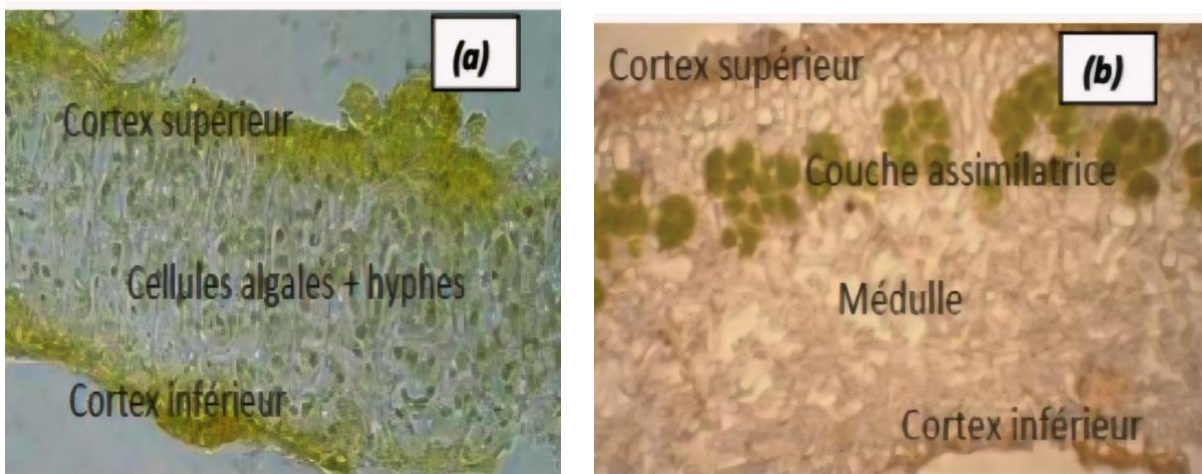


Figure 03: structure anatomique des lichens : structure homogène (a), structure hétérogène (b). (April et al., 2011).

1.2.2.1 Les principaux organes portés par le thalle

* Pseudocyphelle

La Pseudocyphelle est une ouverture, une fente ou une fissure dans l'épiderme supérieur du thalle. Elle joue un rôle dans les échanges gazeux avec l'atmosphère (**Delfosse *et al.*, 2006**).

★ **Rhizine**

La Rhizine est constituée d'un faisceau d'hyphes, elle peut être simple ou ramifiée. Elle est un organe de fixation à la face inférieure des thalles foliacés (**Delfosse *et al.*, 2006**).

★ **Apothécie :**

L'apothécie a une structure de coupe, de cratère. Elle est la fructification la plus courante, elle produit des spores (uniquement le champignon) (**Delfosse *et al.*, 2006**).

★ **Soralie :**

La Soralie présente l'aspect d'un amas granuleux le plus souvent d'une couleur différente de celle du thalle (absence de cortex). Elle est constituée de petites «boules» (sorédies), véritables lichens miniatures. Très légères, les sorédies sont facilement transportées par le vent, la pluie ou les insectes et permettent une dissémination lointaine de l'espèce (**Delfosse *et al.*, 2006**).

★ **Isidie :**

L'Isidie est une excroissance dressée, simple ou ramifiée de même couleur que le thalle (car recouverte de cortex). Plus lourdes que les soralies, les Isidies ne peuvent pas être transportées plus loin par le vent. Ce sont de petites boutures qui assurent la colonisation du substrat (**Delfosse *et al.*, 2006**).

★ **Cil :**

Le cil est une excroissance filiforme souvent d'une coloration différente du thalle. Les cils protègent le thalle des radiations, ils limitent l'évapotranspiration, et retiennent l'humidité (rosée et eau de pluie) mais n'ont aucune fonction de nutrition (**Delfosse *et al.*, 2006**).

2 Les constituants des lichens

La symbiose de lichen est une grande réussite car les lichens sont trouvés dans presque tous les habitats terrestres, des tropiques aux régions polaires. Dans les lichens, les champignons utilisent les dérivés carbonés produits lors de la photosynthèse par les algues, et en retour, fournissent de l'eau et des éléments nutritifs pour les algues en assurant la protection physique à l'ensemble. Grâce à la symbiose, le photobionte et le mycobionte du lichen peuvent survivre dans de nombreux habitats où ils seraient rares ou inexistantes séparément, et font du lichen un organisme autotrophe. La spécificité d'association entre photobionte et mycobionte peut être

étroite ou large, mais la plupart des lichens sont modérément spécifiques : un même photobionte peut s'associer à différentes espèces de mycobionte. Les différentes associations sont :

- dans 85 % des cas, une (ou des) algue(s) associée(s) à un champignon – Chlorolichen.
- dans 10 % des cas, une cyanobactérie associée à un champignon – Cyanolichen.
- dans 5 % des cas, simultanément à la fois, une algue et une cyanobactérie associés à un champignon – Lichen tripartite.

Les lichens sont des organismes symbiotiques associant un mycosymbiote (mycobionte) et un photo symbiote (photobionte).

2.1 Le Mycobionte:

Sont des champignons appartiennent aux ascomycètes qui assure une fonction de protection et stockage l'eau dans ses membranes avec la transmettre à l'algue par ses parois(**Gonjion, 2004**). On rencontre les mycobionte appartenant aux ascomycètes ou aux basidiomycètes :

- **Les ascomycètes** : Les champignons lichénisés sont principalement des Ascomycètes. Ils développent leurs spores à l'intérieur de cellules spécialisées en forme de sacs nommés asques. Ces spores sont libérées par rupture du sommet de l'asque selon des mécanismes bien précis ou par désintégration de la paroi. Les organes reproducteurs se présentent sous forme de petites cupules, les apothécies, ou de petites sphères creuses plus ou moins enfoncées dans le thalle, les périthèces.

- **Les basidiomycètes** : Au contraire des ascomycètes, les spores des basidiomycètes sont formées à l'extérieur de cellules fertiles nommées basides, au sommet de petites cornes nommées stérigmates. Chez les basidiomycètes, la lichénisation est un processus assez rare (de 1 à 2 % des lichens sont des basidiomycètes). Le genre le plus commun est le genre *Lichenomphalia* : les organes reproducteurs sont de petits chapeaux à lames, tout à fait semblables à ceux des basidiomycètes non lichénisés. Ils poussent surtout en montagne, sur sols nus.

2.2 Photobionte :

Sont des cyanobactéries et des algues qui assure la nutrition carbonée grâce à la photosynthèse. Elle apporte des vitamines, des protéines et des glucides au champignon (**Gonjion, 2004**).

Les partenaires des lichens qui réalisent la photosynthèse sont nommés photobiontes ou photosymbiotes et près de 40 genres d'algues et de cyanobactéries ont été décrits [9]. Ce sont essentiellement des algues vertes (Chlorophycées ou Trébouxiophycées), dont les genres appartiennent aux espèces unicellulaires *Trebouxia* (lichen souvent vert), *Coccomyxa*, *Elliptochloris*, *Myrmecia*, et aux espèces filamenteuses *Trentepohlia* (Ulvophycées) (lichen souvent orange, en raison des gouttelettes de caroténoïdes de *Trentepohlia*). Parmi les cyanobactéries, le genre *Nostoc* est le plus commun, et les genres *Stigonema*, *Gloeocapsa* ou *Scytonema* sont moins rencontrés.

3 Classification des lichens

Les lichens sont des thallophytes, cryptogames non vasculaires. Ils peuvent être classés en fonction de leur substrat et du champignon partenaire, de la structure du thalle et de la distribution des deux partenaires dans le thalle. (Clauzade & Roux,1987 ;Ozenda,1990)

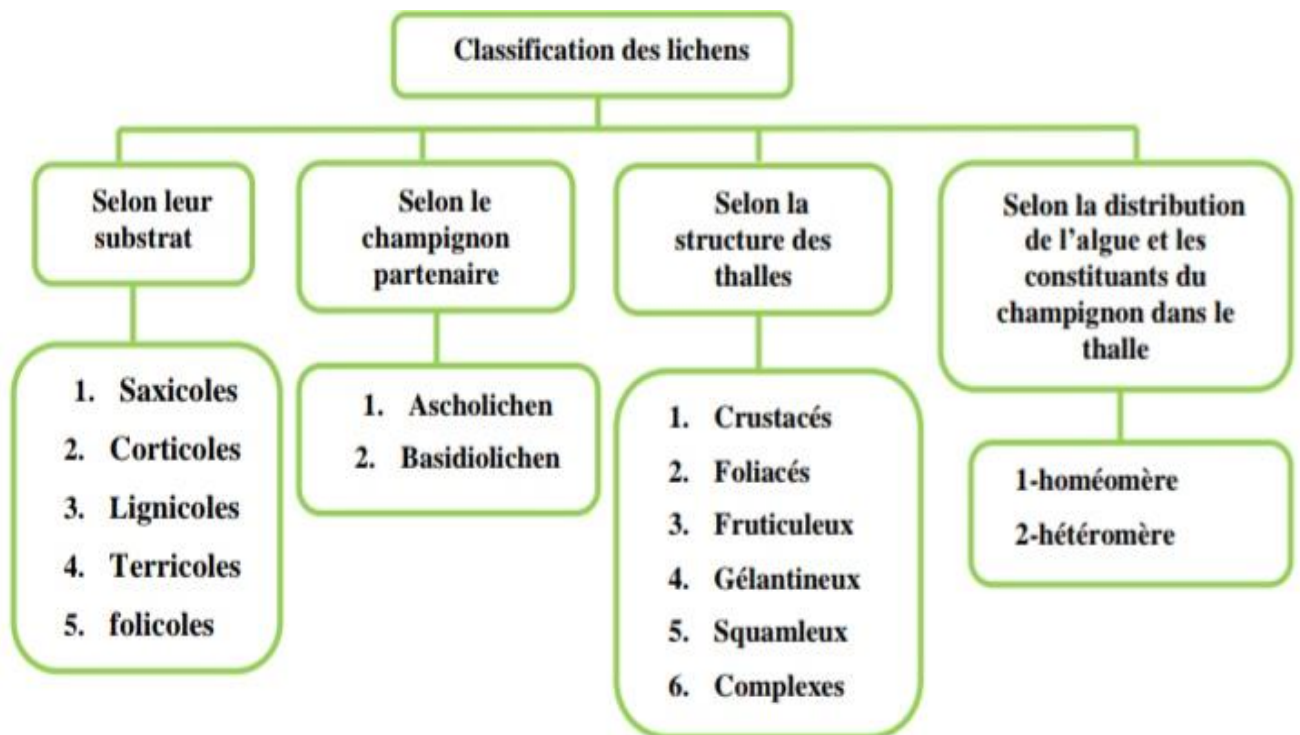


Figure04 : classification des lichens (Clauzade et Roux,1987 ;Ozenda,1990)

4 Reproduction des lichens :

Il-y-a deux modes de reproduction, reproduction sexuée et asexuée.

4.1 La reproduction sexuée :

Le champignon se produit par formation de fructification sur le thalle des lichens qui sont en général des Apothécies ou des lirelles (forme de fente dans le thalle) et des périthèces (un dôme avec un orifice apical).

Ces structures produisent les spores qui se développeront après la rencontre avec une algue appropriée. (Agnan,2013).

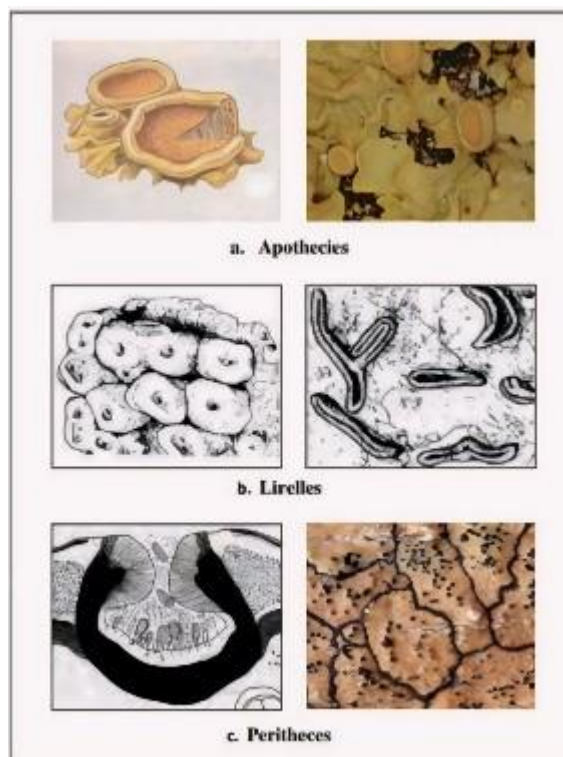


Figure05: fructification de la reproduction sexuée (Bauwens & kivits, 2011)

4.2 La reproduction asexuée :

Elle se fait par dissémination d'un fragment du lichen soit par **sorides** (capsule émise par les gonidies et l'hyphe) soit par des **isidies** (qui sont des bourgeonnements du thalle qui sont libérés pour reconstituer un nouveau thalle)(Ozenda & Clauzade,1970)



a. Isidies

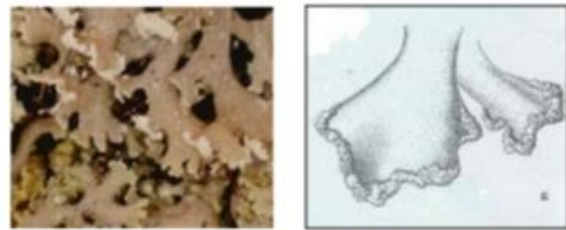


Figure 06 : fragments intervenants dans la reproduction asexuée (Bauwens A et kivits S (2011))

5 Métabolisme des lichens

Le métabolisme des lichens est basé sur la capacité autotrophe du photobiotte et le mode de vie hétérotrophe du mycobiote.

L'algue verte (ou la cyanobactérie) capte le CO₂ atmosphérique afin de produire

des polyols (ou du glucose dans le cas de la cyanobactérie) qui seront transmis au champignon comme éléments de base pour son métabolisme et comme source de carbone. L'activation de la photosynthèse n'est possible qu'après absorption de vapeur d'eau (chlorolichens) ou d'eau liquide (cyanolichens) (Lange et al. 1986). Les cyanobactéries possèdent également la capacité de fixer l'azote atmosphérique et le transmettent au mycobiote sous forme d'ions ammonium. Les principaux échanges nutritionnels au sein de la symbiose sont résumés sur la Figure 8.

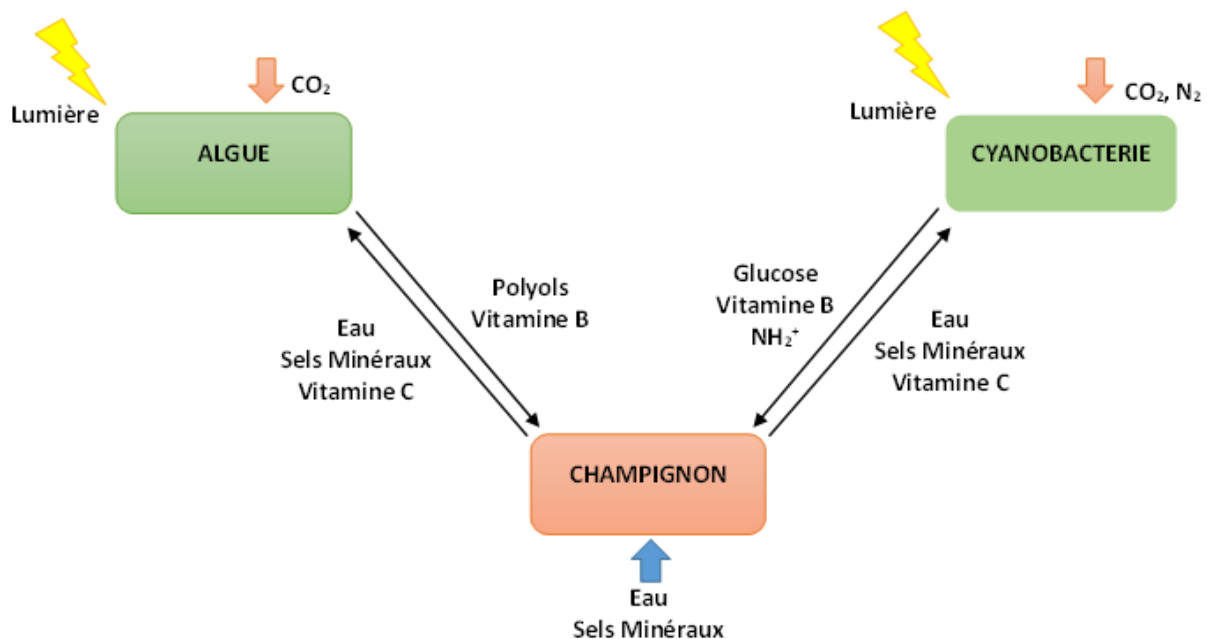


Figure07 : Echanges nutritionnels entre les différents partenaires de la symbiose.

6 Utilisation des lichens :

6.1 Usage alimentaire :

Les espèces lichéniques doivent contenir des macromolécules de lichénine dégradée en glucose au cours de la digestion. Elles utilisées pour l'alimentation des animaux.

6.2 Usage médical :

Les lichens furent étudiés pour la recherche d'antibiotiques ; beaucoup d'espèces ont révélé des propriétés antibactériennes. La plupart des vertus médicales de quelques lichens expliquent leur utilisation, nous citons les plus célèbres des espèces médicales :

- *Lobariapulmonaria*, préconisé contre les affections pulmonaires.
- *Parmeliasulcata*, utilisée contre les maux de tête.
- *Pertusariaalbescens*, contre la fièvre et les névralgies.

6.3 Usage industriel :

Teinture et pigments : Les lichens ont anciennement été utilisés comme colorants par l'artisanat puis dans l'industrie textile.

Parfums et cosmétiques : Plusieurs lichens fournissent des extraits à odeur persistante, utilisés dans l'industrie des parfums.

Utilisation en pharmacie : Les lichens produisent des nombreux composés chimiques qui sont propres et qui sont susceptibles d'avoir des applications pharmaceutiques.



Figure08 : utilisation pharmaceutique a base des lichens

6.4 La bio-indication :

Du fait de leur sensibilité ou de leur capacité d'accumulation de polluants, les lichens sont des indicateurs de pollution utilisés pour la bio surveillance. Ils permettent d'étudier, 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), et surtout le degré de pureté de l'atmosphère (Collembert,1989).

Les lichens ont une écologie très précise de sorte que leur présence dans un milieu naturel est susceptible de donner des indications sur les caractères physiques et chimiques de ce milieu.

7 *Xanthoria parietina*

7.1 Définition

Le lichen *Xanthoria parietina* est une espèce très commune partout sur tout substrat, roches, les arbres, le bois, les tuiles, la toile goudronnée, etc.

Le thalle est foliacé, atteint jusqu'à 15 cm, à lobes plats, arrondis, bien appliqués au substrat, jusqu'à 7 mm de large à la marge du thalle, très voyant en raison de sa couleur jaune-orange, face inférieure presque blanche avec des Rhizines éparses et simples.

7.2 Classification de *Xanthoria parietina* :

Règne : Fungi

Embranchement : Ascomycota

Classe : Lecanoromycetideae

Ordre : Teloschistales

Famille : Teloschistaceae

Genre : *Xanthoria*

Espèce : *Xanthoria parietina*



7.3 Reproduction :

Le développement du lichen *XanthoriaParietina* commence avec la germination des spores. Les hyphes qui poussent hors des spores, entrent en contact avec le substrat au moyen 'une sécrétion gélatineuse et se propagent relativement et rapidement sur la surface du substrat. Comme plusieurs hyphes germent habituellement à partir d'un groupe de spores, la colonisation du substrat commence dans de nombreuses directions en même temps. Cela améliore considérablement la probabilité que des hyphes rencontrent des algues.

A ce stade, il est important de savoir si ces algues sont des pseudo-algues étrangères ou *PseudoTrebouxia* vivant libre, avec lesquelles le champignon de *XanthoriaParietina* peut former une véritable symbiose. Même si les hyphes fongiques ne sont pas en mesure d'entrer en symbiose avec les algues étrangères, elles sécrètent toujours des substances gélatineuses au contact de toutes les algues et les incorporent dans un réseau lâche constitué d'algues, d'hyphes et de gelées.

7.3 Intérêt écologique

Les lichens s'insèrent dans les chaînes alimentaires, sont consommés par certains animaux, ou font l'objet d'un parasitisme par d'autres champignons qui leur sont inféodés.

Du fait de leur sensibilité ou de leur capacité d'accumulation de polluants, les lichens sont souvent utilisés comme bio-indicateurs. Très peu tolérants vis-à-vis de gaz toxiques tels que le Dioxyde de soufre, ils disparaissent de ces zones polluées. La présence d'une grande variété d'espèces et leur abondance sont généralement indicatrices d'une bonne qualité de l'air (AFL, 2011).

les métabolites secondaires

1 Les métabolismes sur des lichens :

La production de nombreux métabolites est facilitée par les conditions spécifiques dans lesquelles vivent les lichens, ce qui les protège efficacement contre diverses influences physiques et biologiques néfastes. Les métabolites créés par les lichens sont classés en deux catégories : primaires et secondaires (Lawrey, 2004). Les protéines, les acides aminés, les caroténoïdes, les polysaccharides et les vitamines sont des métabolites primaires (intracellulaires). Ils sont généralement solubles dans l'eau et peuvent être facilement séparés des lichens par ébullition avec de l'eau. Les champignons produisent certains métabolites primaires tandis que les algues en produisent d'autres. La majorité de ces métabolites ne sont pas spécifiques et peuvent être trouvés dans les champignons, les algues et les plantes supérieures libres.

Bien qu'il n'ait pas été possible de confirmer que Pannarin était une source naturelle de lichen, une étude dans l'herbier a démontré le potentiel biosynthétique de cette depsidone pour l'espèce. La production d'atranorine chez *Usneahirta* lorsqu'elle est cultivée dans un milieu LB modifié est un autre résultat similaire, car ce composé n'est pas présent dans l'ensemble du genre *Usnea*. Chaque mycobionte de lichen préfère des conditions de culture spécifiques pour produire des métabolites secondaires spécifiques. Ces conditions de culture incluent des facteurs tels que le milieu nutritif, les sucres ou les polyols ajoutés, le pH, la température, la lumière et le stress. De même, les cultures de « tissus » de lichens peuvent souvent produire des substances secondaires. Les niveaux plus élevés de métabolites du lichen dans des conditions de fortes concentrations d'UV-A peuvent entraîner une production plus élevée de photosynthétiques qui, à leur tour, soutiennent une production plus élevée de composés de lichen, tandis qu'une production plus faible de composés de lichen en présence d'UV-B peut être due à une production plus faible de composés de lichen en raison de la production d'enzymes de dégradation extra. Diverses études ont montré que la concentration de métabolites secondaires chez certaines espèces de lichens peut être affectée par les différences de situation géographique et les changements de saison Björke & coll (2004).

1.1 Les métabolites primaires

1.1.1 Définition

Les métabolites primaires sont les molécules qui existent dans toutes les cellules végétales et sont nécessaires à la vie de la plante. Ils sont à la base de la machinerie moléculaire de la cellule. Les glucides, les lipides et les acides aminés sont des exemples importants de métabolites primaires. Ces macromolécules sont les produits essentiels du métabolisme, impliqués dans la croissance et le développement de toutes les cellules végétales (**Hopkins, 2003**).

1.1.2 Les classes de métabolites primaires

1.1.2.1 Les glucides

Comprennent tous les sucres et leurs polymères, chaque glucide contient du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène, et peut faire partie soit des monosaccharides, soit des disaccharides, soit des polysaccharides. Les glucides sont les biomolécules les plus abondantes chez presque toutes les espèces, ils jouent au sein des êtres vivants un nombre de rôle très divers (**Weinman & Méhul, 2004**). Au niveau extracellulaire, les glucides sous forme de fibres ou de gel jouent un rôle structural, ils soutiennent et protègent les structures biologiques et entrent dans la constitution des tissus. Au niveau intracellulaire, les glucides jouent un rôle énergétique, ils sont des sources d'énergie (**Moussard, 2006**).

1.1.2.2 Les lipides

Alors que la plupart des familles des molécules de base du monde vivant sont définies par leurs structures chimiques. Les lipides (du grec lipos, graisse) sont caractérisés par une propriété physique : la solubilité, ils sont des composés à solubilité, nulle ou faible dans l'eau par contre élevée dans les solvants organiques non polaires (méthanol, chloroforme, cyclohexane ...). Un lipide est une molécule : soit complètement apolaire (lipide neutre), soit bipolaire (molécule amphiphile ou amphiphathique) (**Touitou, 2005**). Les lipides ont plusieurs fonctions : Huileuses, Réserves ... etc.

1.1.2.3 Les protéines

Il existe vingt acides aminés que les cellules utilisent dans des combinaisons diverses pour former des centaines de protéines différentes. Chaque acide aminé a la même structure de base, constituée d'un atome de carbone centrale auquel sont liés un groupe aminé (NH₂), un groupe carboxyle (-COOH), un atome d'hydrogène et une chaîne latérale variable nommée groupe R (**Touitou, 2005**). Les protéines sont des polymères linéaires d'acides aminés unis par une liaison

amide, dite liaison peptidique, établie entre le groupement α -carboxyle de l'un et le groupement α -amine.

1.2 Les Métabolites secondaires

1.2.1 Définition

Indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal (**Colmar, 2007**). Ces composés ne sont pas produits directement lors de la biosynthèse mais résultent des réactions chimiques ultérieures (**Sevenet, 1994**). Ces métabolites sont, soit des produits terminaux ou des déchets du métabolisme, soit des substances de réserve manifestant une mobilisation réorientée.

1.2.2 Les classes de métabolites secondaires

Chez les plantes les trois classes principales de métabolites secondaires sont les alcaloïdes, les terpénoïdes et les substances phénoliques (**Bruneton, 1993**).

1.2.2.1 Les alcaloïdes

Selon **Bruneton (1993)**, les alcaloïdes sont initialement définis comme des substances azotées, basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte. Le mot « alcaloïde » est pratiquement synonyme du mot « drogue » (10 des 12 drogues qui ont pour origine une plante et qui sont commercialement les plus importantes sont des alcaloïdes) (**Hopkins, 2003**).

1.2.2.2 Les terpénoïdes

Existe chez toute les plantes, ils peuvent être considérés comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités pentacarboxées ramifiées dérivées du 2 – méthylbutadiène(**Bruneton, 1993**). Selon Reven et ses collaborateurs (**2007**), les terpénoïdes sont des composés d'unités isoprène et comprennent les huiles essentielles, le taxol, le caoutchouc et les glycosides cardiotoniques.

1.2.2.3 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont en effet des éléments importants, de qualités sensorielles (couleur ; astringence) et nutritionnels des végétaux que consomme l'homme et leur intervention dans la santé est maintenant reconnue dans des domaines variés (**Richter, 1993**).

1.2.2.4 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux presque toujours hydrosolubles, les pigments floraux agissent comme signaux visuels pour attirer les

pollinisateurs, oiseaux et abeilles (**Raven et al., 2007**). Certains flavonoïdes ont des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, et des effets protecteurs sur le foie

1.2.3 Les voies de métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires du lichen proviennent de trois voies chimiques : la voie de l'acétate polymalonate, la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acide mévalonique (**Elix & Stocker-Wörgötter 1996; Stocker-Wörgötter 2008; Nguyen et al., 2013**)

1.2.3.1 La voie Acétate – Polymalonate

Elle utilise comme précurseur l'acétyl-coenzyme A (AcétylCoA), est la voie de la majorité des métabolites spécialisés lichéniques, en particulier des depsides (téniorine, acide gyrophorique, atranorine,...) et des depsidones (acide stictiques et ses dérivés, acide fumarprotocétrarique, caloploïcine,...) et des dibenzofuranes (acide usnique). comprend les composés de lichen les plus courants :

- Acides aliphatiques secondaires, esters et dérivés apparentés
- Mononucléaires Composés phénoliques
- Dépsides , tridepsides et esters benzyliques
- Depsidones et esters diphényliques
- Depsones
- Dibenzofuranes , acides usniques et dérivés
- Anthraquinones et xanthonessébiogénétiquement apparentées
- Chromones
- Naphtoquinones
- Xanthones

1.2.3.2 Apartir de l'acétylCoA

Un'autre voie de biosynthèse existe ,la voie de Mévalonates , à l'origine des. terpénoïdes (triterpènes de type hopane par exemple) ,des stéroïdes et des caroténoïdes

1.2.3.3 La voie de l'acide shikimique

Conduits aux dérivés de l'acide pulvinique :

- Terphénylquinones
- L'acide pulvinique
- Calycine
- Acide vulpinique

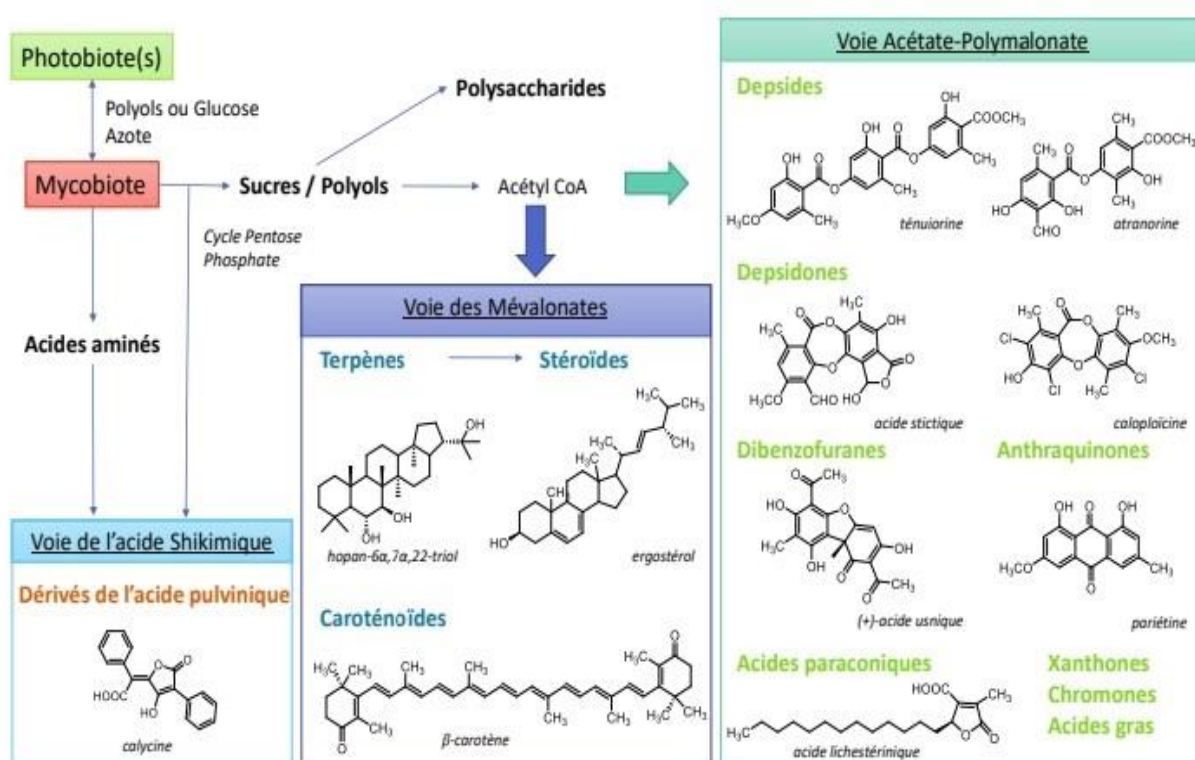


Figure 10 : Voies de biosynthèse simplifiées des métabolites spécialisés lichéniques et familles de composés associées. Schéma réalisé à partir des travaux de Elix and Stocker-Wörgötter (1996), Stocker-Wörgötter (2008) et Nguyen et al. (2013).

En plus des composés provenant de ces voies courantes, présents dans tous les principaux groupes de lichens, il y a également des catégories de composés inhabituelles présentes dans ces organismes, telles que l'arthogaline, un depsipeptide cyclique (Huneck and Himmelreich 1995) et d'autres dérivés d'acides aminés. Des substances telles que les composants cytotoxiques de scabrosine extraits de *Xanthoparmelia scabrosa*. (Ernst-Russell et al. 1999).

Les résidus des classes de substances courantes présentent également des caractéristiques peu communes. Ces caractéristiques peuvent être présentées sous la forme d'autres arrangements intramoléculaires ou en association avec d'autres composés comme les sucres. Des séries de glycosides d'acide aliphatique γ -lactonique, certains d'entre eux formant un cycle macrolactone, ont également été identifiées. Bien que les glycosides ne soient pas courants dans les lichens, des recherches récentes ont révélé la présence de glucosides de xanthone et de mycosporinecollemine A dans *Collema cristatum* (Torres et al. 2004).

1.2.4 Principale famille de métabolisme secondaire :

1.2.4.1 Les depsides

Parmi les depsides, les didepsides (atranorine par exemple) et les tridepsides (acide lasallique par exemple) sont issus du couplage entre deux ou trois unités d'acide orsellinique par estérification du groupement carboxylique d'une molécule avec le groupement hydroxyle d'une seconde molécule. Cet hydroxyle peut être en para ou en meta du deuxième noyau d'où la nomenclature de para- et meta-depsides. Les depsides ne sont pas spécifiques aux lichens et sont également retrouvés dans certaines plantes de la famille des Lamiacées, des Papavéracées ou des Géraniacées. Plus rarement, des tétradepsides, tels que l'aphthosine isolée du lichen *Peltigeraaphthosa* (Bachelor & King, 1970).

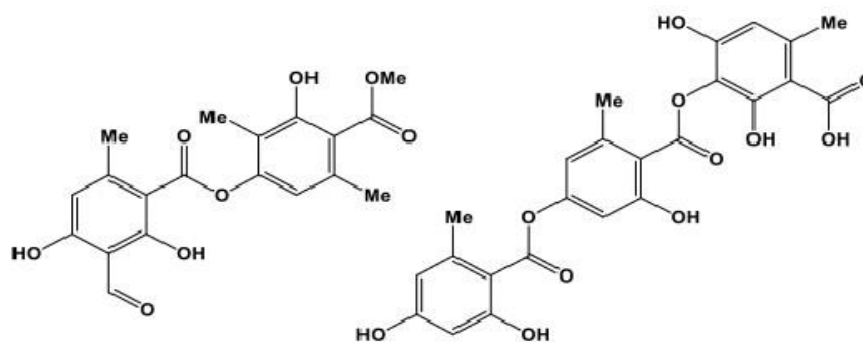


Figure 11 : Structures d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique)

1.2.4.2 Les depsidones

Les depsidones, telles que les acides protocétrarique et norstictique, sont issues du couplage oxydant intramoléculaire de depsides. Différentes études s'attachant à élucider la voie de biosynthèse *in vivo* des depsidones ont démontré que celle-ci inclut des réarrangements moléculaires, de type réarrangements de Smiles, en passant par la formation d'un depside intermédiaire puis d'un diphenyléther (Culberson & Elix, 1989). L'hypothèse la plus récente décrite dans la littérature implique une oxydation du noyau depside par une dioxygénase suivie d'une cyclisation de l'intermédiaire dihydroxydihydro-benzène formé (Stojanović *et al.*, 2012). Des depsidones ont également été retrouvées dans des champignons tels que *Botryosphaeria rhodina* (Abdou *et al.*, 2010) et *Corynesporacassicola* (Chomcheon *et al.*, 2009), ainsi que sporadiquement dans des plantes supérieures du genre *Garcinia* (Ngoupayo *et al.*, 2008).

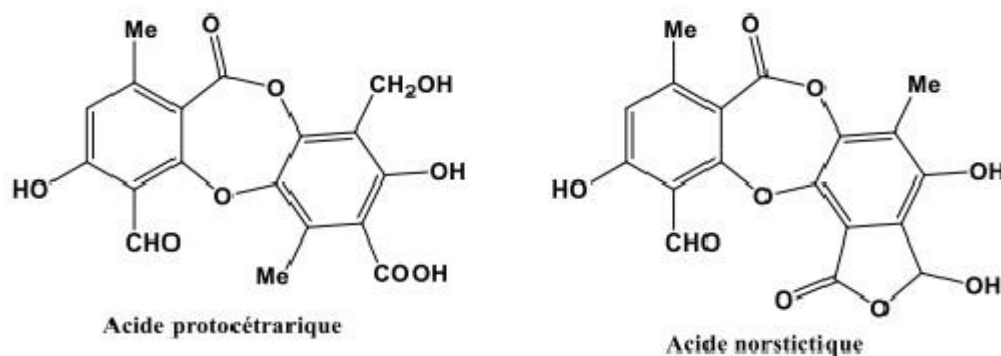


Figure12 : structure d'acide protocétrarique et acide norstictique

1.2.4.3 Les depsones et diphenyléthers

Les depsones (acide picrolichénique par exemple, Figure 14) sont des composés lichéniques rares et sont issues elles aussi des depsides par oxydation intramoléculaire conduisant à un couplage carbone-carbone (Romagni & Dayan, 2002).

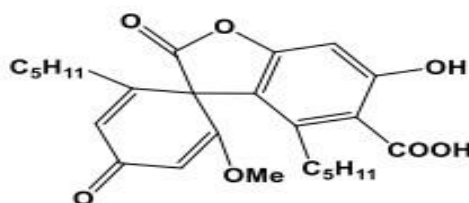


Figure13 : depsones, l'acide picrolichénique

1.2.4.4 Les dibenzofuranes et l'acide usnique

Les dibenzofuranes sont issus du couplage oxydant entre deux unités de type acide orsellinique (Figure 15). Une cyclisation entre un groupement acide carboxylique et un groupement hydroxyle est possible et peut conduire à la formation d'un noyau lactone ; c'est le cas par exemple de l'alectosarmentine (Gollapudi *et al.*, 1994) et de la strepsiline (Gonzalez *et al.*, 1992).

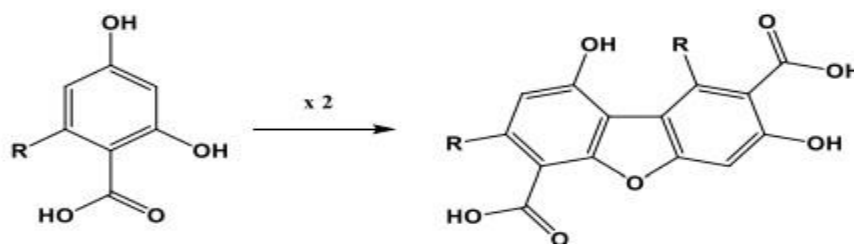


Figure14 : Biogenèse des dibenzofuranes par couplage de deux unités de type acide orsellinique

1.2.4.5 Les anthraquinones, naphthoquinones, chromones et xanthones :

1.2.4.5.1 Les anthraquinones et naphthoquinones :

Les anthraquinones, telles que l'émodyne et l'endocrocine (Figure 16), proviennent de la cyclisation d'octacétides linéaires, et sont des pigments produits principalement par les hyphes du cortex supérieur. Elles sont également responsables de la couleur (jaune, orange, rouge...) des fructifications (apothécies) et représentent un large groupe parmi les métabolites lichéniques biologiquement actifs. La plupart de ces composés sont également présents chez d'autres organismes (Romagni & Dayan, 2002). Les anthraquinones sont souvent produites par les lichens appartenant à la famille des Teloschistes, *Caloplaca* et *Xanthoria* (Stocker-Wörgötter *et al.*, 2013). Parmi elles, la pariétine, un pigment jaune orangé isolé de *Xanthoriparietina* (Solhaug & Gauslaa, 1996), la draculone, un pigment rouge isolé de *Melanothecacruenta* (Mathey *et al.*, 2002), et l'haematommone, un autre pigment rouge isolé de *Haematommapuniceum*.

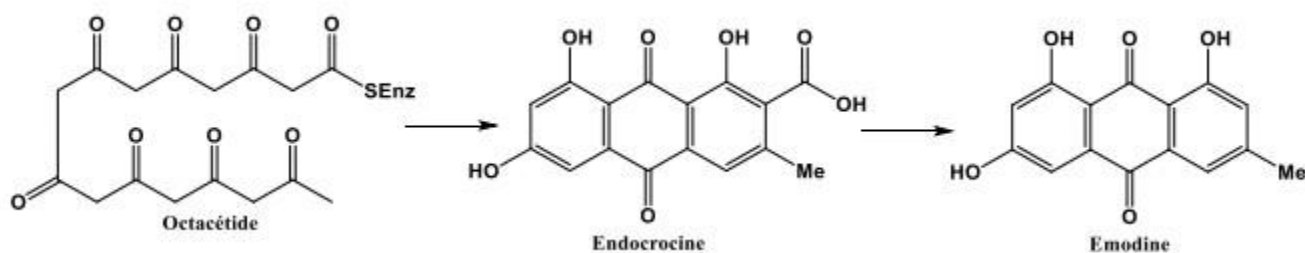


Figure15 : la structure des anthraquinones

1.2.4.5.2 Les chromones :

Les chromones dérivent de la cyclisation de pentacétides linéaires (Figure 17) ; elles ne sont pas propres aux lichens et peuvent être retrouvées par exemple dans certains micro-organismes endophytes (Andrioliet *al.*, 2012).

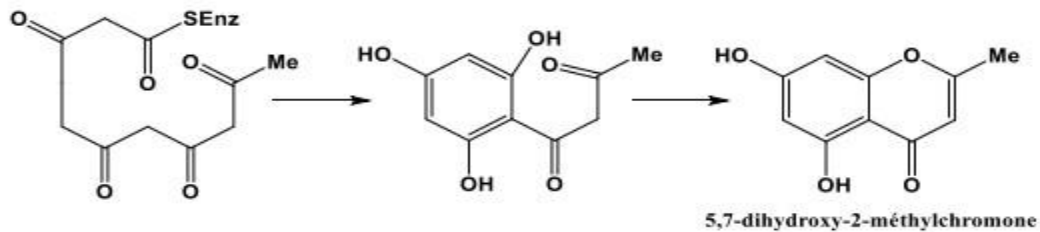


Figure16 : Schéma de biosynthèse proposé pour les chromones (Romagni et Dayan, 2002).

1.2.4.5.3 Les xanthones :

Les xanthones (du grec xanthos : jaune) sont des métabolites secondaires qui ne sont pas exclusivement lichéniques (Figure 18). En effet, elles peuvent être retrouvées chez certaines plantes de la famille des Gentianacées ou des Guttifères (Vieira & Kijjoa, 2005). Par exemple, le mangoustanier (*Garciniamangostana*) et ses fruits contiennent plusieurs dérivés de xanthones (Ragasaet *al.*, 2010 ; Al-Massarani *et al.*, 2013). Aussi, des xanthones sont décrites chez plusieurs espèces de champignons (Abdel-Lateff *et al.*, 2003).

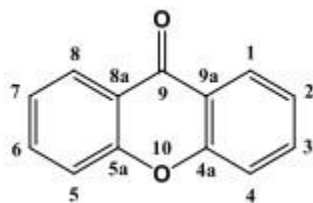


Figure17 : Structure de base d'une xanthone.

1.2.4.5.4 *Les phtalides :*

Les phtalides, ou isobenzofuran-1-ones, sont des intermédiaires importants dans les stratégies de synthèse de métabolites lichéniques comme les naphthalènes, anthraquinones ou benzophénones (Sargent, 1987). Peu de phtalides sont décrits chez les lichens ; par exemple, le 5,7-dihydroxy-6- méthylphtalide et le 5,7-dihydroxy-6-formylphtalide (Figure 20) ont été isolés des lichens *Alectorianigricans*, *Alectoriacapillaris* et *Calvitimelaarmeniaca*(Hertel & Andreev, 2003). On retrouve également ce type de composés chez certains champignons tels qu'*Alternariaporri*(Suemitsu *et al.*, 1995) et *Stachylidium*sp. (Almeida *et al.*, 2012)

1.2.5 Méthodes de détermination des métabolites secondaires du lichen

Les méthodes suivantes sont utilisées pour l'identification des composés de lichen :

1.2.5.1 *Test ponctuel*

Ce test a été utilisé universellement comme moyen rapide et non spécifique pour détecter la présence de certaines substances lichens non spécifiées. Ce test est le plus pratique et le plus simple à réaliser, même sur le terrain. Il ne s'agit toutefois que d'une étape préliminaire dans le processus d'identification des lichens ou de leurs substances. Afin d'identifier avec précision le métabolite secondaire présent dans le thalle de lichen, il faut effectuer des tests plus sensibles tels que la TLC ou la HPLC.

Le test ponctuel est réalisé en plaçant une petite goutte de réactif sur le thalle du lichen, soit directement sur la surface supérieure (cortex), soit sur la moelle. Dans ce dernier cas, le cortex est gratté ou superficiellement coupé à l'aide d'une lame. Les réactifs utilisés sont une solution aqueuse de KOH à 10 % (K), une solution aqueuse saturée de poudre décolorante (NaOCl₂) ou d'hypochlorite de calcium (Ca(OCl)₂) (appelée C) et une solution alcoolique de p-phénylènediamine (PD) à 5 %. Les changements de couleur au point d'application du réactif sur le thalle sont notés + r . Ces changements de couleur sont dus à la présence d'un métabolite secondaire particulier dans le thalle, appelé « taches » (Nash, 1996 ; Karunaratne 1999 ; Karunaratne *et al.*, 2005 ; Molnár & Farkas 2010 ; Shukla *et al.*, 2013).

1.2.5.2 *Microcristallographie*

Certains métabolites secondaires forment des cristaux caractéristiques lorsqu'un réactif cristallisant est ajouté et doucement chauffé. Le test est effectué sur la lame de verre. Le composé de lichen est extrait à l'acétone. Le glycérol, l'éthanol et les acides acétiques glacials sont quelques-uns des produits chimiques utilisés dans différentes combinaisons pour fabriquer le réactif.

La micro cristallographie a été largement remplacée par la méthode plus sensible et plus fiable telle que la CCM. Mais la technique reste utile pour un certain nombre de composés de lichen qui sont difficiles à identifier en CCM en raison de la même classe (ou valeur) Rf ou de la même couleur ponctuelle (par exemple, l'acide lécanorique et les acides gyrophoriques, les acides barbatiques et diffractaïques). Cependant, les mélanges de substances peuvent être difficiles à identifier avec cette méthode, et des substances mineures peuvent également être indétectables (Nash, 1996 ; Karunaratne, 1999 ; Karunaratne *et al.*, 2005 ; Molnár et Farkas 2010 ; Shukla *et al.*, 2013).

1.2.5.3 Chromatographie sur papier

Est utilisé pour la séparation des acides aminés. Le papier est utilisé comme support ou adsorbant, mais la séparation joue probablement un rôle plus important que l'adsorption dans la séparation des composants des mélanges, car les fibres de cellulose sont entourées d'un film d'humidité même à l'état sec. La technique est donc étroitement liée à la chromatographie de partage sur colonne, mais alors que cette dernière est capable de traiter un gramme de matière supplémentaire, la première nécessite des microgrammes. Il s'agit donc d'une technique extrêmement sensible et d'une énorme valeur dans les domaines chimiques et biologiques (Nash 1996 ; Karunaratne 1999 ; Karunaratne *et al.* 2005 ; Molnár et Farkas 2010 ; Shukla *et al.*, 2013).

1.2.5.4 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Il s'agit d'une technique relativement simple et peu coûteuse qui peut être réalisée par toute personne ayant accès aux installations de laboratoire de base. Les substances lichenes sont extraites dans de l'acétone et l'extrait est déposé sur des plaques de verre ou d'aluminium recouvertes de gel de silice. La plaque est placée dans une cuve étanche de manière à ce que la base de la plaque soit immergée dans une couche peu profonde d'un mélange spécifique ou de solvants organiques. Les différentes substances lichenes présentes dans l'échantillon sont séparées les unes des autres lors du passage du solvant à travers la couche de gel de silice et sont ensuite rendues visibles par pulvérisation d'acide sulfurique. Les taches résultantes sont provisoirement identifiées par leur couleur et leur position relative par rapport à l'échantillon témoin (Nash, 1996 ; Karunaratne, 1999 ; Karunaratne *et al.*, 2005 ; Molnár & Farkas 2010 ; Shukla *et al.*, 2013).

1.2.5.5 Chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Cette méthode a été appliquée pour identifier et quantifier les substances caractéristiques présentes dans les produits à base de mousse de chêne disponibles dans le commerce. Cette technique constitue un complément puissant à la méthode TLC établie. Les colonnes liées à phase inverse sont utilisées ici, et tous les produits de lichen aromatique peuvent être analysés avec cette méthode. Les échantillons sont dissous dans du méthanol et injectés dans la colonne de portions appropriée, à travers laquelle un solvant approprié ou une séquence de solvants passe sous haute pression. Les substances se séparent et sont détectées à l'aide d'un détecteur UV. Le temps de rétention (R_t ou temps de passage) et l'intensité maximale sont enregistrés par un enregistreur graphique. La HPLC est également utilisée pour mesurer les concentrations absolues ou relatives de composés de lichen, car l'intensité maximale (aire sous la courbe) est proportionnelle à la concentration. La plupart des chercheurs utilisent la HPLC pour détecter les composés de lichen et combinent cette technique avec la CCM et/ou la spectrométrie de masse pour vérifier l'identification des pics (Nash, 1996 ; Karunaratne *et al.*, 2005 ; Molnár & Farkas 2010 ; Shukla *et al.*, 2013).

1.2.5.6 Méthodes chimiques

Comme dans de nombreux domaines de la chimie des produits naturels, un nouvel élan dans la chimie des substances lichens est fourni par les méthodes plus rapides et améliorées pour détecter, isoler et purifier ces composés et déterminer leur structure. Les techniques de CCM préparative, de chromatographie radiale et de HPLC préparative fournissent des méthodes rapides et efficaces pour la purification des substances lichens, et les développements en spectrométrie de masse, en spectroscopie RMN du proton et du carbone 13 (résonance magnétique nucléaire) et en analyse aux rayons X facilitent grandement études structurales. Les procédures chimiques plus classiques de dégradation et de synthèse totale se sont également développées rapidement avec l'utilisation de réactifs et de méthodes de synthèse plus récents. Par exemple, l'utilisation de réactifs de condensation anhydride trifluoroacétique et dicyclohexylcarbodiimide fait de la préparation des lichens depuis une procédure relativement simple, de sorte que la synthèse totale est désormais un moyen courant de confirmation structurale. (Nash, 1996 ; Karunaratne 1999 ; Karunaratne *et al.* 2005 ; Molnár & Farkas 2010 ; Shukla *et al.*, 2013).

1.2.5.7 Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse :

Les xanthones, les anthraquinones, les dibenzofuranes, les terpènes et les dérivés de l'acide pulvinique dépourvus de groupes esters thermolabiles peuvent être étudiés par chromatographie en phase gazeuse avec spectrométrie de masse (GCMS). Les xanthones présentes dans les lichens ont été étudiées en injectant un extrait de lichen directement dans un spectromètre de masse. Plus récemment, les principaux composants terpénoïdes des lichens de la famille des Pyxinaceae ont été étudiés par GMCS (Nash, 1996).

1.2.6 Rôle des métabolites secondaires

Actuellement, de nombreux lichens ont prouvé leurs capacités d'être une excellente source de métabolites secondaires pour les industries pharmaceutiques (Huneck, 1999; Oksanen, 2006 ; Lopes *et al.*, 2018) et ils sont encore utilisés en tant que traitements alternatifs dans diverses parties du monde (Sahin *et al.*, 2015). Un large spectre de potentiel biologique est montré par les lichens, mais ils ont été longtemps négligés par les chercheurs et surtout par l'industrie pharmaceutique en raison de leur nature à croissance lente et les difficultés dans leur culture artificielle et ils ont à peine été étudiés d'un point de vue biochimique (Crittenden & Porter, 1991; Behera *et al.*, 2004 ; Ranković & Kosanic, 2015).

Au sein du lichen, les substances lichéniques sont censés aider le thalle lichénique à se protéger dans son environnement, contre les herbivores, les pathogènes et les facteurs abiotiques tels que les irradiations UV. Pour ces raisons, la plupart des molécules isolées des lichens font souvent preuve de multiples activités biologiques comme l'acide usnique (l'acide (+)-usnique et l'acide (-)-usnique selon les sources lichéniques). Il présente à la fois des activités antimicrobiennes, antiprolifératives et capte facilement les rayonnements UVs. Cependant, le rôle des métabolites lichéniques au sein de la symbiose reste encore peu connu. (Molnar *et al.*, 2010)

Comme on a déjà dit le potentiel thérapeutique des lichens est depuis longtemps exploité par la médecine, différentes préparations provenant de lichens ont montré des effets analgésiques, antipyrétiques (Huneck, 1996 ; Moreira *et al.*, 2015 ; Behera *et al.*, 2016), antibactériens et antifongiques (Huneck, 1999). Différentes autres activités peuvent être décrites :

- Activité anti-herbivore et insecticide.
- Activité antipyrétique, anti-inflammatoire.

- Activité antioxydante et photoprotectrice (Huneck, 1999).

Le tableau suivant résume les différents travaux pharmaceutiques réalisés sur les substances lichéniques :

Tableau 1 : Activités biologiques de quelques substances lichéniques citées par la littérature (Branislav Ranković 2019):

Composés lichéniques	Activités étudiées	Composés lichéniques	Activités étudiées
<i>Acide lécanorique</i>	Antitumor, antioxydant, antibactérien, antifongique, antidiabétique, anticancéreux, anti-inflammatoire	<i>Acide physodique</i>	Antibactérien, antifongique, antioxydant, anticancéreux, antineurodégénératif, anti-inflammatoire
<i>L'atranorine</i>	Antimicrobien, antioxydant, anti-inflammatoire, anticancéreux, antineurodégénératif, antidiabétique	<i>Acide stictique</i>	Antioxydant, antimicrobien, anticancéreux
<i>Zeorin</i>	Antioxydant, antifongique, antidiabétique	<i>Acide vulpinique</i>	Antimicrobien, anticancer
<i>Acide gyrophorique</i>	Antimicrobien, anticancéreux, antioxydant, antidiabétique	<i>Acide evernique</i>	Innovant, antibactérien, antioxydant, anticancéreux
<i>Acide protocétrarique</i>	Antibactérien, antifongique, antioxydant, anticancéreux	<i>Acide protolichesterinique</i>	Antitumoral, antibactérien, anticancéreux, anti-inflammatoire
<i>Acide fumarprotocétrarique</i>	Antibactérien, antifongique, antioxydant, anticancéreux, neuroprotecteur	<i>Acide lobarique</i>	Innovant antibactérien, antifongique, anticancéreux, antineurodégénératif
<i>Acide norstictique</i>	Antimicrobien, antioxydant, anticancéreux	<i>Ramalin</i>	Antioxydant, antibactérien
<i>Acide salazinique</i>	Antitumoral, antibactérien, antifongique, antioxydant, antidiabétique, antiviral	<i>Acide diffractaïque</i>	Analgésique, antiprolifératif, antioxydant, antipyrétique, analgésique, anti-inflammatoire
<i>Acide barbatique</i>	Antioxydant, antimicrobien	<i>Acide divaricatique</i>	Antioxydant, antimicrobien, antidiabétique

<i>Acide ombilicarique</i>	Antioxydant, antimicrobien	<i>Acide variolaire</i>	Antioxydant, anticancéreux
<i>Acide homosekikaïque)</i>	Antioxydant, antibactérien	<i>Acide sekikaïque</i>	Antioxydant, antibactérien, antidiabétique
<i>Acide benzoïque</i>	Antioxydant	<i>Vicanicine</i>	Antioxydant, anticancéreux
<i>2,4-dihydroxy-6-propyle</i>	Antioxydant	<i>10-chloropannarine</i>	Antioxydant

PARTIE EXPERIMENTALE

Objectif de l'étude

L'utilisation des plantes et des produits d'origine naturelle en phytothérapie est un objectif de plusieurs études, notamment d'autant plus qu'elles contiennent les métabolites secondaires qui peuvent avoir des vertus thérapeutiques. Les lichens, vue leur particularité d'être des organismes symbiotiques avec une grande diversité structurale et des activités biologiques très variées, sont de très bons sujets pour l'évaluation de leurs activités thérapeutiques.

L'objectif de ce travail est la réalisation d'une étude de l'activité antibactérienne et antioxydante de l'espèce *Xanthoria parietina*.

Cette étude a été réalisée dans laboratoire pédagogique microbiologie et biochimie faculté de sciences de la nature et vie et science de la terre université de Khemis Miliana .

1 Préparation des extraits :

1.1 Présentation de la zone d'échantillonnage :

La collecte des échantillons a été faite au niveau de la région de Ain ElHadjar-Wilaya de Saïda, cette zone est une des wilayas des hauts plateaux.

La wilaya de Saïda couvre une superficie totale de 6765 km², localisée au Nord-ouest del'Algérie, elle est limitée au Nord par la wilaya de Mascara, au Sud par celle d'El Bayadh, àl'Est par la wilaya de Tiaret et à l'Ouest par la wilaya de Sidi Bel Abbés (Figure 19). Lawilaya de Saïda est constituée de six daïras et de seize communes, le territoire ni franchement steppique, ni franchement tellien (ANAT, 2008).



Figure 18: situation géographique de la wilaya de Saida (Kerrache, 2011)

Pour le coté bioclimatique de la zone où les échantillons ont été prélevés, elle appartient au semi-aride frais, alors que la partie sud de la wilaya est aride frais.

1.1 Matériel

1.1.1 Matériel végétal :

Thalle foliacé jaune-orangé pouvant être gris-bleuté lorsqu'il croît à l'ombre. Les lobes sont plats et appliqués au substrat avec une largeur comprise entre 3 et 7 mm, leur marge pouvant être légèrement récurvée. Plus larges à l'apex, ils se recouvrent partiellement les-uns-les-autres et ont souvent un aspect drapé.

Les apothécies sont généralement nombreuses, leur diamètre peut atteindre 4 mm, le disque est de couleur orangée au centre et le rebord est jaune, il devient légèrement crénelé avec le temps. La surface du disque est d'abord concave puis devient presque plate à maturité.

Espèce très commune croissant sur tout type de support riche en nutriments comme les arbres et l'identification est assez simple.



Figure 19 : Xanthoria parietina (Happe, 2024)

Collecte :

La collecte a été faite en grattant soigneusement les écorces des arbres avec un couteau afin de récupérer le matériel lichénique intact avec un minimum de trace d'écorces.

1.1.2 Matériel biologique :

Les souches utilisés pour faire l'activité antimicrobienne sont une source de **laboratoire de Docteur Houti** <souche d'infection>.

Tableau 2: les micro-organismes utilisés.

<i>Les micro-organisme</i>	<i>Classification</i>	<i>Gram</i>
<i>Staphylococcus aureus(sp)</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Gram positif</i>
<i>Eschericia coli (sp)</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Gram négatif</i>
<i>Pseudomonasaeruginosa(sp)</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Gram négatif</i>
<i>Klebsiella pneumoniae(sp)</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Gram négatif</i>
<i>Condida albicans (sp)</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Levure</i>

1.2 Déshydratation:

Les échantillons de lichen sont d'abord triés en utilisant des pinces en plastique et un couteau en céramique, en retirant délicatement les débris végétaux (les espèces non souhaitées et les écorces d'arbre) ensuite, les thalles sont séchés à l'étuve à 105°C pendant 72 heures afin d'éliminer un maximum d'eau.



Figure 20 : séchage du lichen.

1.3 Broyage:

Réduction des échantillons en poudre fine de façon à favoriser la mise en solution des éléments à analyser. Cette étape est critique car elle peut être une source de contamination ou de perte. Pour cela, le broyeur utilisé est un mortier en agate.



Figure 21: transformation du lichen en poudre

1.4 Extraction par macération :

➤ *L'extrait éthanolique :*

Les échantillons de lichen (10 g) ont été mélangés séparément avec 100 ml de solvant organique (éthanol) à température ambiante dans l'obscurité pendant 1h avec un agitateur magnétique et conservé le mélange dans réfrigérateur pendant 48h.

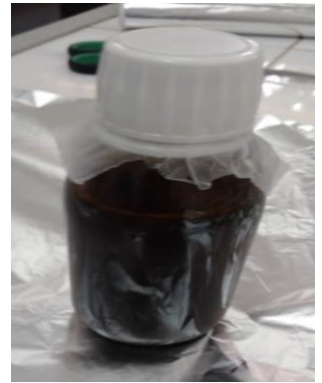


Figure 22: L'extrait éthanolique.

➤ *L'extrait aqueux :*

Les échantillons de lichen (10 g) ont été mélangés séparément avec 100 ml de l'eau distiller à température ambiante puis placés dans un placard à l'abri de la lumière pendant 48 heures.



Figure 23 : l'extrait aqueux.

1.5 Filtration:

Le mélange (les l'extraits) obtenu est transféré dans un flacon de 100 ml pour la filtration (avec un papier filtre Watman).



Figure 24 : l'étape de filtration.

1.6 Evaporation :

Les extraits de solvant organique (extrait éthanolique) ont été évaporés à sec dans température 75°C pendant 15 minute dans une rota-vapeur.



Figure 25 : Evaporation d'extrait éthanolique.

Calcul du rendement

Le rendement de l'extraction est calculé selon la formule suivante:

$$100 \quad \text{RET}\% = \frac{M-M_0}{MT} \times 100$$

Avec :

R % : taux de la matière extraite ;

M : masse du ballon avec l'extrait (g) ;

M₀ : masse du ballon vide (g) ;

MT : masse végétale totale utilisée (g).

2 Evaluation de l'activité antimicrobienne :

2.1 Mc Farland :

Les tests de sensibilité nécessitent l'utilisation d'inocula standardisés. L'étalon de McFarland 0,5 est recommandé pour l'utilisation dans la préparation des inocula pour effectuer le test de sensibilité aux antimicrobiens par diffusion sur disque. Les inoculums pour les tests de sensibilité primaires étaient généralement préparés à partir d'un bouillon incubé pendant 4 à 6 heures. Lorsque la croissance était en phase logarithmique, la densité de la suspension était ajustée en ajoutant la suspension bactérienne à un tube à essai salin stérile pour correspondre. La densité de la norme souhaitée.

Principe :

Les étalons de turbidité McFarland sont utilisés comme étalon de référence pour approximer le nombre de cellules microbiennes dans une suspension liquide. L'une des premières utilisations de la turbidité pour l'estimation des populations bactériennes a été la préparation de vaccins.



Figure 26 :la suspension de Mc Farland

2.2 Activité antimicrobienne

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits éthanolique et aqueuse de *Xanthoriaparietina*, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant les disques stériles (Berghe & Vlietinck., 1991).

Le principe :

La méthode repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, avec création d'un gradient de concentration, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible. L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. La souche sera qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante.

Préparation de suspension bactérienne :

On a préparé des cultures jeunes des bactéries (24h-48h), puis une suspension bactérienne à partir de ces cultures jeunes avec 200µl l'eau physiologique stérile, on a mesuré la DO de

cette suspension jusqu'à avoir la même DO de 0.5 Mc Farland (DO = 0,8 à 1 lue à une longueur d'onde de 600 à 620nm par spectrophotomètre).

Mode opératoire :

La technique utilisée pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques aqueux des cinq échantillons est la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé, selon le Comité National des Normes du Laboratoire Clinique (2000). Cette méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice de l'agent antimicrobien, par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque imprégné de l'extrait à tester. Pour cela, des disques de 6 mm de diamètre imprégnés de différentes concentrations (10, 15, 20, 25 µl/mL) d'extrait sont déposés à la surface des milieux de culture Mueller Hinton pour les bactéries, préalablement ensemencés par couvillonnage d'une suspension microbienne standardisée (0,5 McFarland). L'activité antimicrobienne des deux extraits est notée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition, après une incubation à 37 °C pendant 24 h pour les bactéries.

- Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques à l'aide d'un pied à coulisse.

Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des extraits (**Ponce et al. 2003**).

Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8mm

Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.

Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm

Extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20mm

3 Activité antioxydante :

L'acide ascorbique ou la vitamine C est une vitamine hydrosoluble. L'ascorbate est un très bon capteur de radicaux libres oxygénés puisqu'il réagit non seulement avec les radicaux hydroxyles mais aussi avec les radicaux superoxydes O₂. (**Diallo, 2005**). Il a été utilisé dans cette étude comme un antioxydant de référence.



Figure 27 : Résulta d'activité antioxydant d'extrait ethanolique.

3.1 Activité antiradicale

La détermination de l'activité antiradicale des différents extraits de *Xanthoria parietina* se fait par la méthode qui utilise le DPPH comme un radical libre relativement stable, selon le protocole décrit par **Bouyahya et al. (2017)** avec quelques modifications.

Principe :

Le radical 2,2-diphényl-2-picrylhydrazyl est un radical libre stable. L'activité antiradicale des deux extraits de l'espèce a été étudiée sur ce radical se traduit par la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH*) vers la couleur jaune, le 2,2-diphényl-b-picrylhydrazine (DPPH-H) (**Bougandoura & Bendimerad, 2013**).

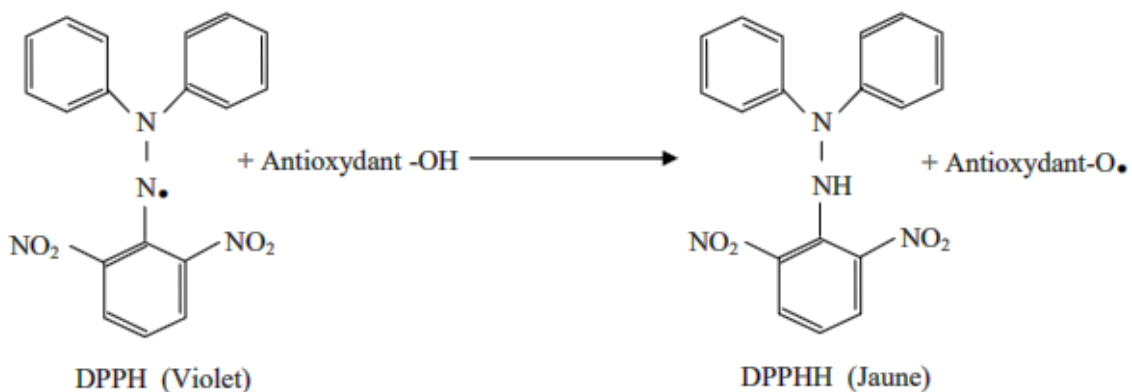


Figure 28 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH (Talbi et al., 2015)

Mode opération :

- Solubiliser 0.004g de DPPH dans 100ml d'éthanol ;
- Dans de tube, préparer des solutions des concentrations (20, 40, 60, 80, 100, 200, 250) de l'extrait (éthanolique , aqueux) a diluée par 1ml de l'éthanol
- Mettre dans chaque tube 1ml de la solution de DPPH préparé
- Incuber pendant 30 minute à température ambiante
- Lire l'absorbance à 517nm.

Calcule du pourcentage :

Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'inhibition (I%) du radical libre calculé par cette formule:

$$I \% = \frac{DO \text{ controle} - DO \text{ échantillon}}{DO \text{ controle}} \times 100$$

I %: Pourcentage de réduction du DPPH.

DO témoin: Densité optique du tube contrôle négatif.

DO extrait : Densité optique de l'échantillon

Détermination duIC50 :

Ce paramètre permet de calculer la concentration en extrait nécessaire pour piéger 50% des radicaux DPPH. L'IC50 exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50% (plus la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydant d'un composé est grande). Elle est inversement liée au pouvoir antioxydant. (Molyneux, 2004)

4 Dosage de Flavonoïdes :

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple qui est la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl_3) décrite par **Bahorumet al. (1996)** afin de quantifier les flavonoïdes dans les extraits.

- **Principe :**

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre, en position 5 qui est susceptible de donner avec le groupement CO, un complexe coloré avec le chlorure d'aluminium. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci traduit le fait que le métal (Al) perd deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons (**RibéreauGayonet al., 1972**).

- **Mode opératoire :**

1/- Préparation de gamme d'étalonnage :

Une gamme de 4 différentes concentrations de quercétine ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$) allant de 0.096 à 0.288 mg/ml a été préparée afin de tracer la courbe $DO = f(c)$, (c'est la concentration de la quercétine).

2/- Analyses des standards et extraits :

- 1 ml de chaque extrait est mélangé avec 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol).
- Dans les mêmes conditions un témoin a été préparé avec de l'eau distillée, Méthanol et éthanol à la place des extraits de lichens.
- Après 10 minutes d'incubation à température ambiante ; l'absorbance a été mesurée à 415 nm contre un blanc dans un spectrophotomètre.

La concentration des flavonoïdes a été déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g de matière sèche).

Tableau 03 : Tableau de dosage des Flavonoïdes

Concentration (mg/ml)	0.288	0.161	0.096	0.05
Volume de l'extrait (ml)	1	1	1	1
Volume d'AlCl₃ (ml)	1	1	1	1

La courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine à différentes concentrations, suivant la méthode de Bahorunet *al.*, (1996).

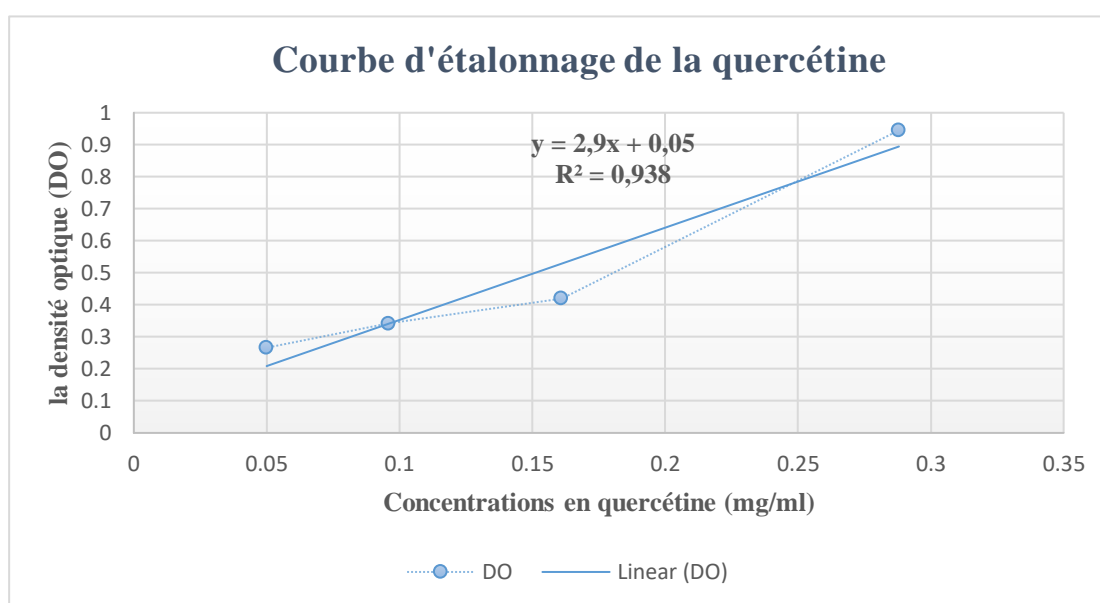






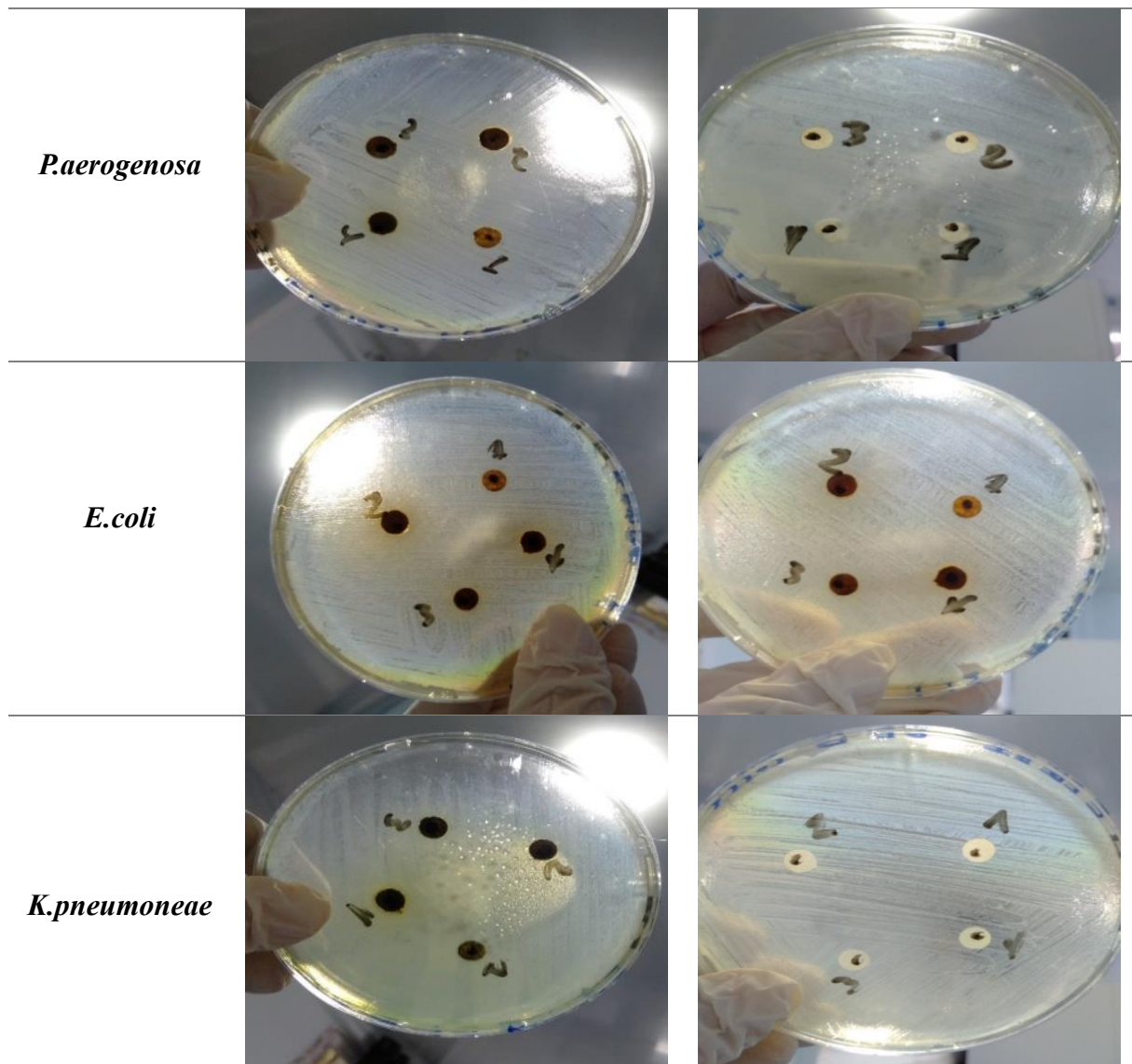
Figure 29 : La courbe étalonnage de la quercétine.

Résultat et discussion

1 Les résultats de l'activité antibactérienne

Tableau 04: Résultats de l'évaluation de l'effet antibactérien.

	<i>Extrait ethanologique</i>	<i>Extrait aqueux</i>
<i>C.albicans</i>		
<i>S.aurus</i>		



L'extrait aqueux malheureusement n'a exercé aucun effet sur les différentes souches testées, soit celles de la paroi Gram positif ou Gram négatif ou même sur la levure *Candidaalbicans*.

Pour l'extrait éthanolique été meilleur en comparaison avec l'extrait aqueux où l'activité été positive contre les souches *S.aureusetC.albicans*.

Tableau 05 : Résultats du la sensibilité et la résistance des extraits contre les souches pathogènes.

	<i>S.aurus</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aerogenosa</i>	<i>K.pneumonea</i>	<i>C.albicans</i>
L'extrait éthanolique	+++	---	---	---	++
L'extrait aqueuse	---	---	---	---	---

Tableau 06 : Diamètre des zones d'inhibition.

		La zone d'inhibition (mm)				
	Concentrations µg/ml	<i>S.aureus</i>	<i>E.coli</i>	<i>C.albicans</i>	<i>P.aerogenosa</i>	<i>K.pneumonea</i>
L'extrait éthanolique	10	13	/	8	/	/
	15	18	/	11	/	/
	20	20	/	12	/	/
	25	23	/	16	/	/
L'extrait aqueux	10	/	/	/	/	/
	15	/	/	/	/	/
	20	/	/	/	/	/
	25	/	/	/	/	/

Les résultats montrent un effet inhibiteur de l'extrait éthanolique vis-à-vis de la souche *Staphylococcus aureus* (sp) avec un diamètre d'inhibition de 23 mm pour la concentration (25µg/mL) et un diamètre égale à 13 mm pour la concentration la plus faible dans cette étude (10µg/mL). L'effet inhibiteur été positif sur la souche *Candidaalbicans* avec un diamètre d'inhibition de 8mm pour (10µg/ml) et 16 mm pour (25µg/ml).

Quant au reste des souches, *Escherichia coli* (sp) et *Klebsiella pneumoniae* (sp) et *Pseudomonasaeruginosa* (sp) ont montré résistance à l'extrait éthanolique du lichen *X.parietina*.

Calcul de la CMI :

La CMI a été mesurée uniquement pour l'extrait éthanolique qui a montré un effet inhibiteur contre les deux souches mentionnées précédemment.

Les résultats ont montrés quela CMI pour la souche *S.aureus* égale à 20µg/ml et 30 µg/ml pour *C.albicans*.

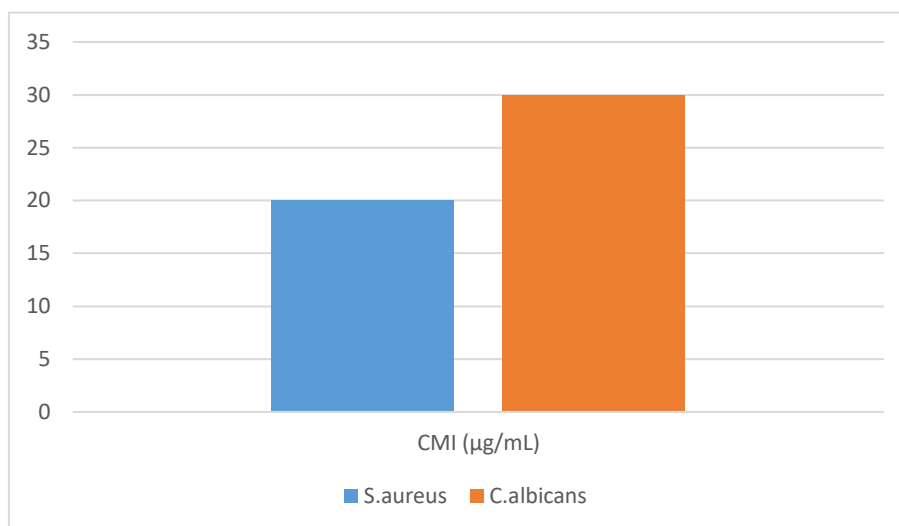


Figure 30 : Résultats de CMI du deux souches pathogènes.

2 Résultats de l'activité antioxydante :

2.1 Résultat d'activité antioxydante :

Les résultats du test au DPPH des extraits de *X.parietina* sont représentés dans le tableau 06. Les résultats montrent un pouvoir anti-radicalaire très intéressant pour les deux extraits de ce lichen. Les graphes dans la figure xx se présentent chacun sous forme d'une ligne droite qui ne passe pas par l'axe $y = ax + b$ avec une corrélation directe entre la concentration et le pourcentage de conversion du DPPH.

Concernant les IC50, comme l'acide ascorbique est l'antioxydant d'excellence, il présente un IC50 le plus importante avec une concentration égale à $37,27 \pm 3,75 \mu\text{g/ml}$, alors que l'extrait éthanolique présente une activité anti radicalaire meilleure ($46,03 \mu\text{g/ml}$) que celui de l'extrait aqueux ($48,64 \mu\text{g/ml}$).

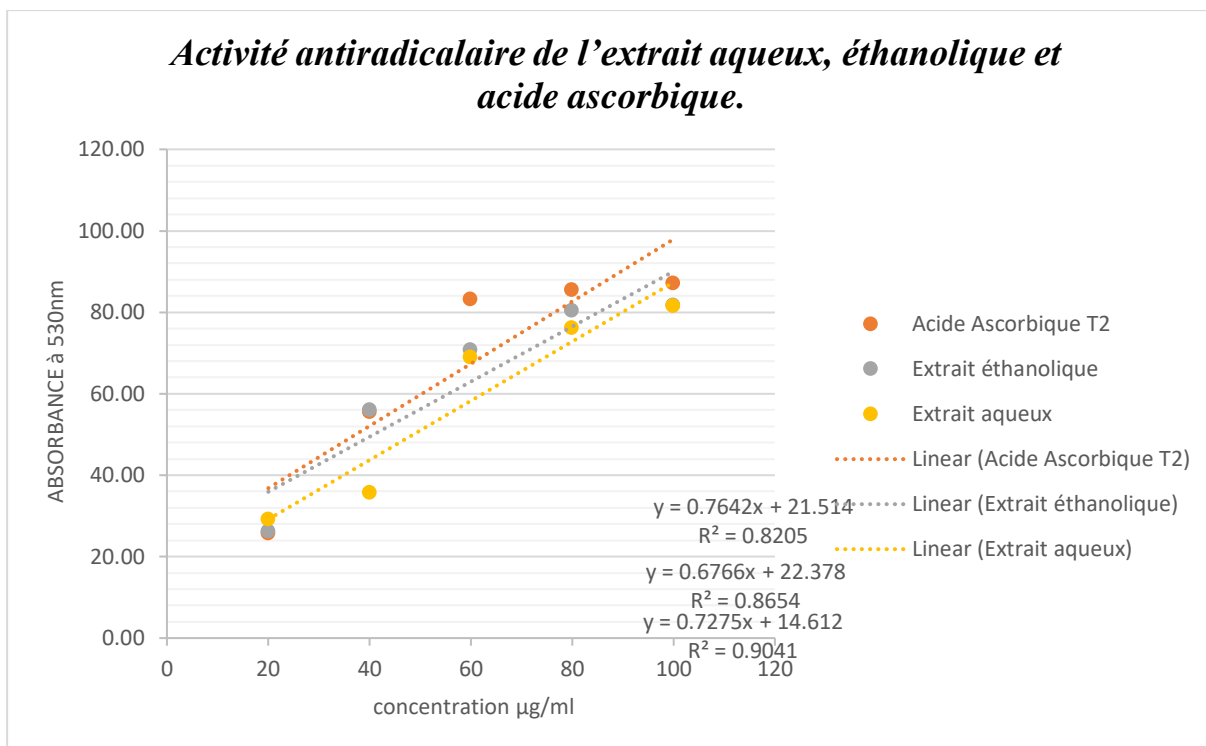


Figure 31 : Activité antiradicalaire de l'extrait aqueux, éthanolique et acide ascorbique

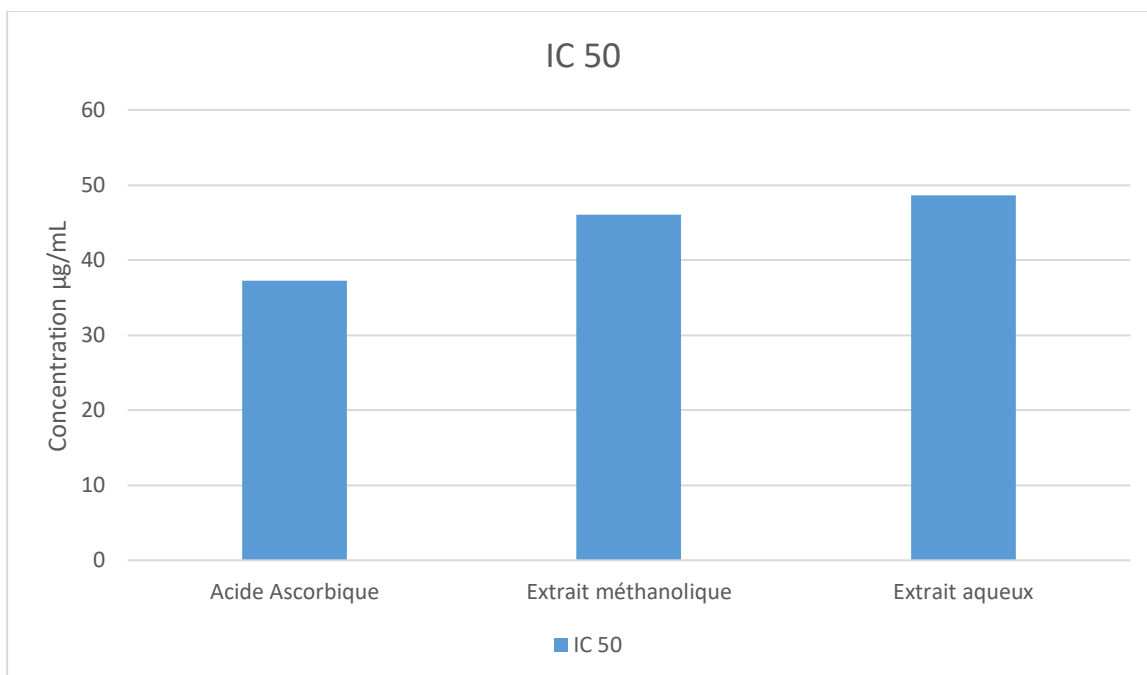


Figure 32 : Les concentrations efficaces à piéger 50% (IC50) du radical DPPH par les extraits étudiés et l'acide ascorbique.

3 Résultats de dosage des flavonoïdes

Les résultats de dosage des flavonoïdes ont été déduits en utilisant la courbe d'étalonnage de la quercétine et ceci par extrapolation et les résultats sont exprimés en mg EQ/ g MS (milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche).

Tableau 07: Résultats de dosage des flavonoïdes

Extrait	Teneur en flavonoïdes mgEQ/ gMS
Eau distillé	14.32 ± 1.96
Ethanol	20.20 ± 2.12

Ilest bien clair des résultats que l'éthanol était meilleur que l'eau distillée pour l'extraction des flavonoïdes.

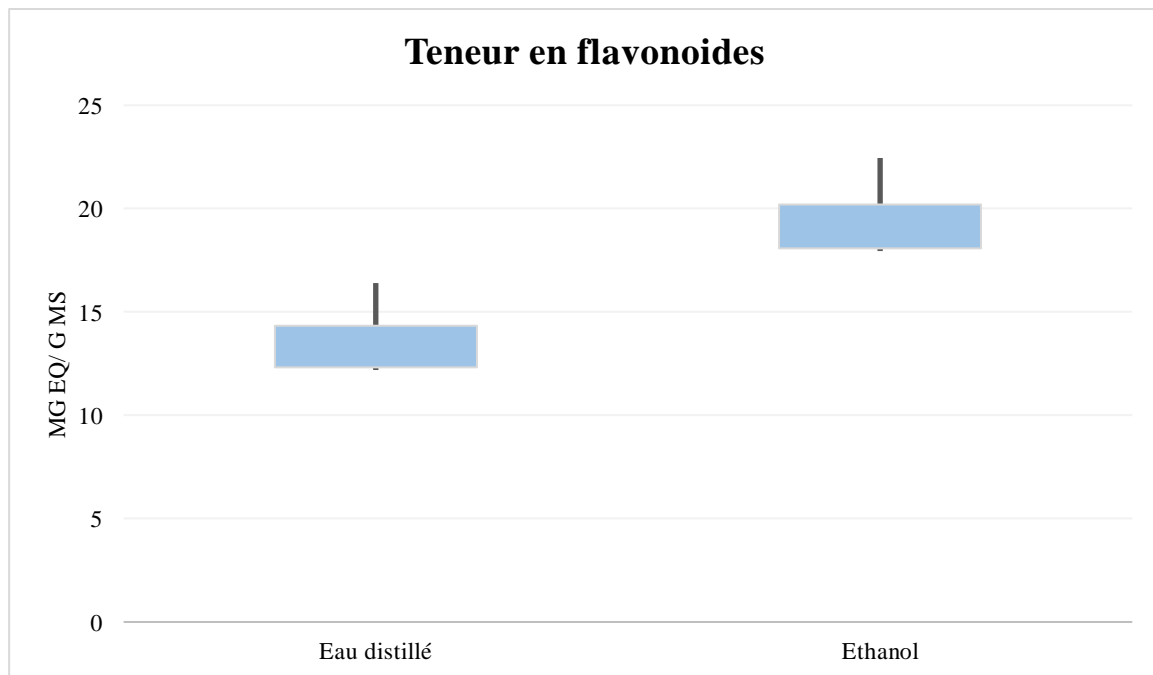


Figure 33 : Teneurs des extraits en flavonoïdes

Discussion

Les lichens sont une source de composés secondaires bioactifs. Selon cet auteur, Bouchenak *et al.* (2020), la macération consiste à extraire le maximum de molécules chimiques contenues dans les lichens en utilisant des solvants organiques qui accélèrent l'extraction et augmentent le rendement.

Pour l'extrait aqueux, les résultats n'ont montrés aucune activité antibactérienne contre toutes les souches pathogènes testées, ceci a été aussi constaté par Ali & Hmeed (2019), où le même solvant (eau distillée) qui a été utilisé pour l'extraction des métabolites secondaires de *X. parietina* n'avait aucun effet sur les souches *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Une autre étude qui montre l'inefficacité de l'extrait aqueux contre les souches bactériennes, c'est celle de Sargsyan *et al.* (2021), où tous les extraits aqueux des différents lichens (*Ramalinasinensis*, *Ramalinafarinacea* (L.), *Flavoparmeliacapitata*, (L.) Hale, *Everniaprunastri* (L.) Ach., *Punctelia subrudecta* (Nyl.) Krog, *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf, *Peltigera praetextata* et *Parmelia sulcata*) n'avaient aucun effet antimicrobien.

Felczykowska *et al.* (2017), ont utilisé l'extrait acétonique de *Xanthoria parietina*, qui a montré presque le même résultat de l'extrait éthanolique dans cette étude. L'extrait acétonique avait un effet antimicrobien uniquement contre *Staphylococcus epidermidis* alors qu'aucune

activité antimicrobienne a été enregistrée contre *B. subtilis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* et *P. aeruginosa* et c'est la même chose qui a été rapportée par Çobanoğlu *et al.* (2016).

Il est à signaler que l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique a été évalué par Sargsyan *et al.* (2021), et elle est similaire à celle dans la présente étude.

Kosanić *et al.* (2011) ont trouvé que la CMI pour *S. aureus* est de 25 µg/ml de l'extrait acétonique alors que dans cette étude la CMI pour la même souche en utilisant l'extrait éthanolique était de 20 µg/ml, alors que Basile *et al.* (2015) la CMI pour la même espèce avec l'extrait éthanolique était autour de 15.6 µg/mL, qui est une valeur très proche de celle révélée par cette présente étude.

Ce qu'on peut constater de cette étude et des études citées précédemment, est que l'eau distillée est un solvant inefficace pour l'extraction des métabolites secondaires à effet antimicrobien. Pour l'éthanol, il avait presque les mêmes résultats qu'on a pu trouver dans la littérature comme les autres solvants (acétone, méthanol)

Concernant l'évaluation de l'activité antioxydante, les extraits avaient une activité anti radicalaire très intéressante, de l'ordre de (46,03 µg/ml) pour l'extrait éthanolique et de (48,64 µg/ml) pour l'extrait aqueux.

Le travail de Kosanić *et al.* (2014), a révélé des activités antioxydantes très faibles chez les espèces testées où la plus forte était *Parmeliaarseneana* avec une IC₅₀ égale à 612,75 µg/mL, ce qui est très faible en comparaison avec les extraits éthanolique et aqueux. Une autre étude sur différents lichens collectés de l'Antarctique, avait de valeur d'IC₅₀ très faible aussi (Torres-Benítez *et al.*, 2023). La même chose pour l'étude réalisée par Aousar *et al.* (2020), où l'extrait acétonique des espèces *Pseudeverniafurfuracea*, *Everniaprunastri* et *Ramalinafarinacea* isolées du Maroc avaient des IC₅₀ très faibles qui atteignent 1 mg/mL.

Il est à signaler que peu d'études qui s'intéressent à l'activité antioxydante de *Xanthoriaparietina* et plus précisément celles qui utilisent le DPPH.

La teneur en flavonoïdes dans l'extrait éthanolique et aqueux est égale à 20.20 ± 2.12 mgEQ/ gMS et 14.32 ± 1.96 mgEQ/ gMS respectivement. La teneur en flavonoïdes dans l'extrait éthanolique est légèrement supérieure par rapport à la quantité trouvée dans l'extrait aqueux, ceci a été démontré par une autre étude, celle de Sargsyan *et al.*, (2021).

En outre, l'étude réalisée par Kosanic *et al.* (2011) sur l'extrait acétonique montre des teneurs en flavonoïdes qui s'accordent avec les résultats de la présente étude avec des valeurs autour de 20.57 $\mu\text{g RE/mg MS}$. L'étude de Assouar *et al.* (2020), révèlent une teneur en flavonoïdes égale à 12 ± 0.05 jusqu'à $25 \pm 2 \mu\text{g CE/mg}$ de matière sèche.

Contrairement aux résultats de notre étude, ceux trouvés par Aydin & Kinalioğlu (2016) qui ont analysé la contenance de certains lichens où le taux des flavonoïdes était de 40 $\mu\text{g QE/mg MS}$. Mais ils sont aussi très élevés par rapport à ceux de Sargsyan *et al.* (2021) qui ont démontrés que le taux des flavonoïdes dans les lichens est de $2,22 \pm 2 \text{ mg CE/ g d'extrait}$.

Conclusion

Conclusion

Le lichen *Xanthoriaparietina* selon cette étude avait une activité antimicrobienne assez limitée contre les espèces pathogènes testées. Il est à prendre en compte que l'eau distillée est inefficace pour l'extraction des métabolites secondaires à effet antibactérien et ceci a été démontrée par cette présente étude et ce qui renforce ce résultat est la littérature qui renforce de plus cette conclusion. L'éthanol était meilleur en comparaison avec l'eau distillée mais il sera souhaitable dans le futur d'utiliser d'autres solvants qui pourraient donner des résultats plus intéressants tels que le méthanol et l'acétone.

Pour l'activité antioxydante les deux extraits étaient bons, les résultats en comparaison avec l'acide ascorbique sont prometteurs et nécessitent d'être valorisés de plus par d'autres études dans le même contexte.

D'après cette étude, il est recommandé de diversifier les solvants et les méthodes d'extraction des métabolites secondaires des lichens, afin de donner à ces espèces symbiotiques la valeur thérapeutique qui leur convient ; ainsi qu'identifier et étudier les espèces chimiques qui les composent.

Références Bibliographique

A

- Aboya MJ. (2013), Résistance Bactérienne et phytomolécule Antimicrobienne issues de *Morinda Morindoïdes*. Thèse de Doctorat de L'Université Félix Houphouët Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 184 p
- Adjiri, F. (2020). Valorisation de la Flore Lichénique de la Région de BBA et son Application comme Bio-indicatrice de la Pollution Atmosphérique. Faculté des Sciences de la Nature et de la vie. Université Ferhat Abbas Sétif 1.
- Ali, S. & Hameed, H. N. (2019), Antibacterial and antioxidant activity of a chemically induced mutant of *Xanthoriparietina*, *The J. Anim. Plant Sci.* 29(3), p 881-888.
- Aprile, G. G.; Catalano, I.; Migliozi, A.; Mingo, A. (2011), Monitoring epiphytic lichen biodiversity to detect environmental quality and air pollution: the case study of *Roccamonfina* Park (Campania Region - Italy). In *Air Pollution - New Developments, Anca Maria Moldoveanu* : 227-244.
- Atalay F, Halici MB.,; Mavi, A., ÇakirA., Odabaşoğlu, F., Kazaz, C., Aslan, A., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2011), Antioxidant phenolics from *Lobariapulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnealongissima* Ach. Lichen species. *Turk J Chem* 35:647–661.

B

- Bahorun, T., Grinier, B., Trotin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C., & Pinkas, M. (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations Laboratoire de pharmacognosie, faculté des science pharmaceutique et biologique, lille, france. 46 (11) : 1086-1089.
- Basile, A., Daniela R., Stefano L., Annalisa D. S., Angela, N., Sergio, S., Barbara, C., Luca P., Francesca, D. R., Anna M. M. (2015), "Antiproliferative, Antibacterial and Antifungal Activity of the Lichen *Xanthoria parietina* and Its Secondary Metabolite Parietin", *International Journal of Molecular Sciences* 16, no. 4: 7861-7875. <https://doi.org/10.3390/ijms16047861>
- Behera, B. C., Adawadkar, B., Makhija, U. (2003), Inhibitory activity of xanthine oxidase and superoxide-scavenging activity in some taxa of the lichen family Graphidaceae. *Phytomedicine* 10:536–543.

- Behera, B.C., Adawwadkar, B., Makhija, U. (2004), Capacity of some *Graphidaceous* lichens to scavenge superoxide and inhibition of tyrosinase and xanthine oxidase activities. *Curr Sci* 87:83–87.
- Behera, B.C., Verma, N., Sonone, A., Makhija, U. (2008), Antioxidant and antibacterial properties of some cultured lichens. Plant science division, Agharkar Research institute, G.G. Agarkar Road, pune 411 004, India. *Bioresour Technol* 99:776–784.
- Bjerke JW, Joly D, Nilsen L et al (2004) Spatial trends in usnic acid concentrations of the lichen *Flavocetraria nivalis* along local climatic gradients in the Arctic (Kongsfjorden, Svalbard). *Polar Biol* 27:409–417
- Bogo D, de Matos MF, Honda NK, Pontes EC, Oguma PM, da Santos EC, de Carvalho JE, Nomizo A (2010). *In vitro* antitumour activity of orsellinates. *Z Naturforsch C J Biosci.* 65(1-2):43-8. doi: 10.1515/znc-2010-1-208. PMID: 20355320.
- Bouchenak O , Boumaza S, Yahiaoui K , Benhabyles N, Laoufi R, Toubal S, Khiari O, Blizak D, Arab K (2020). Evaluation de l'activité antioxydant et l'effet antimicrobien des composés phénoliques extraits du lichen «*Xanthoria parietina* » de la région de Boumerdes. 92 – 103.
- Ranković, B., (2019). Lichen Secondary Metabolites, Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential, Second Edition. Springer Nature Suisse.
- Brisdelli, F., Perilli, M, Sellitri, D., Piovano, M., Garbarino J. A., Nicoletti, M, Bozzi, A. , Amicosante, G., Celenza G., (2013) Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an in vitro study. *Phytother Res*, 27:431–437.
- Bruneton, J., (1993), Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales, Ed., Lavoisier, paris. 2^{ème} Edition. p 268, 274, 277.
- Bucar F, Schneider I, Ogmundsdottir H. (2004), Antiproliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets. *Phytomedicine* 11:602–606.
- Buçukoglu, T.Z., Albayrak, S., Halici, M. G., Tay, T. (2013) Antimicrobial and antioxidant activities of extracts and lichen acids obtained from some Umbilicaria species from Central Anatolia, Turkey. *J Food Process Preserv* 37:1103–1110.
- Burlando, B., Ranzato, E., Volante, A., Appendino, G., Pollastro, F., & Verotta, L. (2009). Antiproliferative effects on tumor cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta medica*, 75(06), 607-613.

- Candan M, Yilmaz M, Tay T, Kivanç M, Türk H, (2006) Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Xanthoria parmelia pokorny* and its gyrophoric and stenosporic acid constituents. *Anadolu University, Department of Biology, 26470 Eskişehir, Turkey. Z Naturforsch* 61:319–323.
- Candan M, Yilmaz M, Tay T, Erdem M, Türk AO, (2007) Antimicrobial activity of extracts of the lichen *Parmelia sulcata* and its salazinic acid constituent. *Anadolu University, Department of Biology, 26470 Eskişehir, Türk. Z Naturforsch* 62:619–621
- Choudhary MI, Ali M, Wahab AT et al (2011) New antiglycation and enzyme inhibitors from *Parmotrema cooperi*. *Sci China Chem* 54:1926–1931
- Çobanoğlu, G., Sesal, C., Açıkgöz, B. & Karaltı, İ. (2016), Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Physciaaipolia*, *Xanthoria parietina*, *Usneaflorida*, *Usneasub floridana* and *Melanohaleae xasperate*, *Modern Phytomorphology* 10: p 19–24,
- Colmar N, 2007 - Etude de la voie de biosynthèse des fucoumarine. Qualité des fruits et métabolisme secondaire, technologie plante à traite. UMR. INPL(ENSAIA)-INRA agronomie et environnement.
- Crittenden, D. & Porter, N. (1991), Lichen-forming fungi: potential sources of novel metabolites. *Trends Biotechnol* 9:409–414.

D

- Delfos., X., Cameron., A.C. & Brams, J. (2006). Exploring the antibiofilm and toxicity of tin oxide nanoparticles: Insights from in vitro and in vivo investigations. *School of Bio-Sciences and Technology, Vellore Institute of Technology, Vellore, 632014, TN, India. Vol. 311, Issue 5761, pp. 633-635*
- Dieu A. (2015), Recherche de molécules Antimicrobiennes d'origine lichénique : Etude phytochimique de trois lichens et Approche synthétique de deux composés Actifs. Thèse de Doctorat Chimie des Substances Naturelles. Université de Limoges, France, p.299.

E

- Elix, J. & Stocker-Wörgötter, E. (1996), Biochemistry and secondary metabolites. In: *Lichen biology*. p 154-180.
- Emsen, B., Aslan, A., Togar B. & Turkez, H. (2016), In vitro antitumor activities of the lichen compounds olivetoric, physodic and psoromic acid in rat neuron and glioblastoma cells. *Department of Biology, Turkey PharmBiol* 54:1748–1762.

F

- Felczykowska, A., Pastuszak-Skrzypczak, A., Pawlik, A., Bogucka, K., Herman-Antosiewicz, A., and Guzow-Krzemińska, B. (2017), Antibacterial and anticancer activities of acetone extracts from in vitro cultured lichen-forming fungi, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17:300, p 01-12.

G

- Gollapudi, S.R., Telikepalli, H., Jampani, H.B., Mirhom, Y.W., Drake, S.D., Bhattiprolu, K.R., Velde D.C, Mitscher, L.A. (1994). Alectorsarmentin, a new antimicrobial dibenzofuranoid lactol from the lichen, *Alectoriasarmentosa*. Department of Medicinal Chemistry, University of Kansas, Lawrence 66045. *Journal of natural products*. 57(7) :934-938.
- Gonjion M., 2004. Publication de l'agence régionale de l'environnement; Rouen. p 4.
- Gonzalez AG., Barrera JB., Rodriguez Pérez EM. (1992). Synthesis of hierrensis, a phenol from the lichen *Ramalina hierrensis*. *phytochemistry*. 31 :1436-1439.

H

- Halama P, Van Haluwin C (2004), Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *Biol Control* 49:95–107
- Hidalgo M.E., Fernández E, Quilhot, W., Lissi, E. (1994) Antioxidant activity of depsides and depsidones. Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Chile. *Phytochemistry* 37:1585–1587
- Honda, N.K., Pavan, F.R., Coelho, R.G., de Andrade Leite, A.C., Micheletti, T.I. (2010) Antimycobacterial activity of lichen substances. Universidade Federal de Mato Grosso de Sul, Departamento de Química, 79070-900 campo Grande, MS, Brazil. *Phytomedicine* 17:328–332
- Hopkins W.G. (2003), *Physiologie végétale*. Edition de Boeck université – Bruxelles. Mathey, A.; Spiteller, P.; Steglich, W. Verlag der Zeitschrift für Naturforschung 2002, 57c, 565-567.

K

- Karunaratne, V. (1999), Lichen substances: biochemistry, ecological role and economic uses. *Cey J Sci (Phys Sci)* 6:13–28

- Karunaratne, V., Bombuwela, K., Kathirgamanathar, S., & Thadhani, V. M. (2005). Lichens: a chemically important biota. *J. Natn.Sci.Foundation Sri Lanka* 33(3): 169-186.
- Kerrache, G. (2011), Impacts du préaménagement sur les formations forestières :cas de la forêt de Fenouane (Commune de Ain El Hadjar, W de Saïda, Algérie), mémoire de magistère, Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen, Algérie.
- Kosanić M, Ranković B, Stanojković T et al (2014a) Cladonia lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Sci Technol* 58:518–525.
- Kosanić M, Ranković B, Stanojković T et al (2014b) Biological activities and chemical composition of lichens from Serbia. *EXCLI J* 13:1226–1238.
- Kosanić M, Ranković B, Sukdolak S (2010) Antimicrobial activity of the lichen *Lecanora frustulosa* and *Parmeliopsis hyperopta* and their divaricatic acid and zeorin constituents. *Afr J Microbiol Res* 4:885–890.
- Kumar KC, Muller K (1999) Lichen metabolites, 2: Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *J Nat Prod* 62:821–823.

L

- Lange, O., Kilian, E., & Ziegler, H. (1986). Water vapor uptake and photosynthesis of lichens: with green and blue-green algae as phycobionts. *Oecologia* 71: 104–110.
- Lauterwein M, Oethinger M, BeIsner K et al (1995) In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (usnic acid and against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* 39:2541–2543
- Lawrey, J.D. (1986). A biological review of lichen substances. *Bryologist* 89:111–122
- Lohézic-Le Dévéhat F, Tomasi S, Elix J (2007) Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. *J Nat Prod* 70:1218–1220
- Lopes, T.I.B., Coelho, R.G., Yoshida, N.C. (2008) Radical-scavenging activity of orsellinates. *Chem Pharm Bull* 56:1551–1554.

M

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

- Martins MCB, Gonçalves de Lima MJ, Silva FP et al (2010) *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast, chemical characterization and antimicrobial activity. *Braz Arch Biol Technol* 53:115–122.
- Melo MG, Dos Santos JP, Serafini MR et al (2011) Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicol In Vitro* 25:462–468
- Mitrović T., Stamenković S., Vetkovic V., Tosic S., Stanković M., Radjojević I., Stefanović O., Čomoć L., Đačić D., Curčić M. et Marković S. (2011). Antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of five lichen Species. *International journal of molecular Sciences*. 12 :5428-48.
- Molnár K, Farkas E (2010) Current results on biological activities of lichen secondary metabolites. *Natur for sch* 65:157–173.
- Molyneux, P. (2004). The use of stable free radical Diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*26 (2), 211-219.

N

- Nash TH (1996) *Lichen biology*. Cambridge University Press, Cambridge
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard M7-A5. Informational supplement M100 S10. NCCLS, Wayne.
- Nguyen KH, Chollet-Krugler M, Gouault N, Tomasi S (2013). UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Nat Prod Rep* 30 :1490-1508. doi: 10.1039/C3NP70064J

O

- Odabasoglu F, Cakir A, Süleyman H et al (2006). Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacine-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol* 1:59–65
- Oh JM, Kim YJ, Gang HS et al (2018). Antimicrobial activity of divaricatic acid isolated from the lichen *Evernia mesomorpha* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 23:3068.
- Okuyama, E., Umeyama, K., Yamazaki, M. et al (1995). Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Med* 61:113–115
- Ozenda P. and Clauzade G. (1970). *Les lichens: étude biologique et flore illustrée*. Masson et C 1e, Paris, 801 p.

- Ozenda P., (2000). Les végétaux : organisation et diversité biologique, Dunod, Paris, 2eme édition, pp 191-192, ISBN 2-7298-9.

P

- Paudel, B., Bhattarai, H.D., Lee, H.K. et al (2010) Antibacterial activities of ramalin, usnic acid and its three derivatives isolated from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. *Z Naturforsch C* 65:34–38
- Perry, N.B., Benn, M.H., Brennan, N.J. et al (1999). Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zeland lichens. *Lichenologist* 31:627–636
- Piovano, M., Garbarino, J.A., Giannini, F.A. et al (2002). Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Bol Soc Chil Quím* 47:235–240

R

- Ramade F. (2000). Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement, Ediscience, Paris.
- Ranković B., Kosanić, M., Manojlovic, N. et al (2014). Chemical composition of *Hypogymnia physodes* lichen and biological activities of some its major metabolites. *Med Chem Res* 23:408–416.
- Ranković, B., Mišić, M. (2008). The antimicrobial activity of the lichen substances of the lichens *Cladonia furcata*, *Ochrolechia androgyna*, *Parmelia caperata* and *Parmelia conspresa*. *Biotechnol Biotechnol* 22:1013–1016
- Ranković, B., Mišić, M., Sukdolak, S. (2008). The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World J Microbiol Biotechnol* 24:1239–1242
- Reddy, R.G., Veeraval, L., Maitra, S. et al (2016). Lichen-derived compounds show potential for central nervous system therapeutics. *Phytomedicine* 23:1527–1534.
- Řezanka, T., Dembitsky, V. (1999). Novel brominated lipidic compounds from lichens of Central Asia. *Phytochemistry* 51:963–968.
- Řezanka T, Guschina IA (1999) Brominated depsidones from *Acarospora gobiensis*, a lichen of Central Asia. *J Nat Prod* 62:1675–1677.
- Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, M., Ribéreau-Gayon, P., & Sudraud, P. (1972). Sciences et techniques du vin, analyse et contrôle des vins (Tome1 éd Dunod.). Paris.

- Ristić S, Ranković B, Kosanić M et al (2016b) Phytochemical study and antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of *Melanelia subaurifera* and *Melanelia fuliginosa* lichens. *J Food Sci Technol* 53:2804–2816
- Russo A, Piovano M, Lombardo L et al (2008) Lichen metabolites prevent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life Sci* 83:468–474

S

- Sargent, M. V. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 1987, 231-235
- Sargsyan, R. ,2, Gasparyan, A., Tadevosyan, G. & Panosyan, Hovik.(2021), Antimicrobial and antioxidant potentials of non-cytotoxic extracts of corticolous lichens sampled in Armenia, *AMB Expr* 11:110, p 01-11.
- Sharnoff S. D. 1997- Lichens : More Than meets the eye. *National Geographic*, 191(2), 59-70.
- Shukla V, Upreti DK, Rajesh B (2013) Lichens to biomonitor the environment. Springer, Delhi
- Sisodia R, Geol M, Verma S et al (2013) Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. *Nat Prod Res* 27:2235–2239
- Stocker-Wörgötter E (2008) Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Nat Prod Rep* 25:188–200. doi: 10.1039/B606983P
- Stocker-Wörgötter, E., Cordeiro, L. M. C., & Iacomini, M. (2013). Accumulation of potential pharmaceutically relevant lichen metabolites in lichens and cultured lichen symbionts. *Studies in natural products chemistry*, 39, 337-380
- Stojanoviš, G., Stojanoviš, I., & Smelceroviš, A. (2012). Lichen depsidones as potential novel pharmacologically active compounds. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 9(2):178-184.
- Studzinska-Sroka, E. & Dubino, A. (2018). Lichens as a source of chemical compounds with antiinflammatory activity. *Herba Pol* 64 : 56–64.
- Sundset, M.A., Kohn, A., Mathiesen, S.D. et al (2008). Eubacterium *rangiferina*, a novel usnic acid resistant bacterium from the reindeer rumen. *Naturwissenschaften* 95:741–749

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 *Nigellasativa L. Mater. Environ. Sci.* 6 (4), 1111-1117.
- Tay, T., Türk, A.O., Yılmaz, M. et al (2004) Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Z Naturforsch* 59: 384–388.
- Thadhani VM, Karunaratne V (2017) Potential of lichen compounds as antidiabetic agents with antioxidative properties: a review. *Oxid Med Cell Longev*:20 : 79-69.
- Torres-Benítez, Alfredo, José Erick Ortega-Valencia, Nicolás Jara-Pinuer, Marta Sanchez, Gabriel Vargas-Arana, María Pilar Gómez-Serranillos, et Mario J. Simirgiotis. « Antioxidant and antidiabetic activity and phytoconstituents of lichen extracts with temperate and polar distribution ». *Frontiers in Pharmacology* 14 (2023). <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1251856>.
- TOUTOU P, 2005 - biochimie - structure des glucides et lipides PCEMI 2005-2006. Université paris-VI faculte de médecine pierre et marie curie.
- Turk, A.O., Yilmaz, M., Kivanc, M. et al (2003) The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cetraria aculeata* and its protolichesterinic acid constituent. *Z Naturforsch* 58:850–854.
- Turk H, Yilmaz M, Tay T et al (2006) Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin, and olivetoric acid constituents. *Z Naturforsch C* 61:499–507.

V

- Van Haluwyn Ch. (2009). Quelle place et Quelles perspectives pour la biosurveillance végétale dans les études de la qualité de l'air en France. *Air Pur*, 77: 5-10.
- Van Haluwyn Ch., Asta J., Boissière J.C., Clerc P., Gaveriaux J.P. (2012). Guide des lichens de France : lichens des sols. Belin, France, 223 p.
- Verma N, Behera BC, Sharma BO (2012) Glucosidase inhibitory and radical scavenging properties of lichen metabolites salazinic acid, sekikaic acid and usnic acid. *Hacettepe J Biol Chem* 40:7–21
- Verma N, Behera BC, Sonone A et al (2008) Cell aggregates derived from natural lichen thallus fragments: antioxidant activities of lichen metabolites developed. *Nat Prod Commun* 3(11):1911–1918

- Vijayakumar CS, Viswanathan S, Reddy MK et al (2000) Anti-inflammatory activity of (+) usnic acid. *Fitoterapia* 71:564–566.

W

- Weinman Set Méhul, 2004-Toute la biochimie, Ed., Dunod, Paris P159 – 200.

Y

- Yoshimura I, Kurokawa T, Kinoshita Yet al (1994)Lichen substances incultured lichens. *J Hattori Bot Lab* 7:249–261

Annexe

Préparation de Mc Farland :

Préparer deux solutions A et B :

Solution A	}	Chlorure de Baryum	0.05g
		Eau distillée	20ml
Solution B	}	Acide Sulfurique (0.36 N)	0.204ml
		Eau distillée	20ml

Ajouter 0,5 ml de la solution A à 99,5 ml de solution B et bien mélanger la mixture avec agitation à la main ou en utilisant le vortex, ensuite réparti dans des tubes à essai munis d'un bouchon à vis de même taille que ceux contenant les l'inoculum bactérien dont la turbidité doit être évaluée

Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton (M.H) préparé comme suit :

Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boites de Pétri.

L'eau distillée, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et les Disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été Stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Activité antioxydante :

Préparation de l'Acide Ascorbique :

- Préparer 0.003g de l'acide ascorbique dans un tube essai contant 3ml d'éthanol ;
- Dans les tubes préparer de solution déférent concentration (20, 40, 60, 80, 100, 200, 250) de l'acide ascorbique dilué (Courbe d'étalonnage) ;
- Mettre dans chaque tube 1ml et 1ml de DPPH ;
- Incuber pendant 30 minute à température ambiante ;
- Lire l'absorbance à 517nm.

Calcul du rendement

Le rendement de l'extraction est calculé selon la formule suivante :

1- Rendement de l'extrait éthanolique :

$$\text{Ret\%} = \frac{M - M_0}{MT} \times 100$$

$$\text{R\%} = \frac{195,634g - 140,652g}{10g} \times 100$$

$$\text{R\%} = 19.82 \%$$

R % : le rendement

M : masse du ballon avec l'extrait (g) = **195,634 g**

M₀ : masse du ballon vide (g) = **140,652 g**

MT : masse végétale totale utilisée (g) = **10 g**