

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique Et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض

Faculté Des Sciences de la Nature et de la  
Vie et des Sciences de la Terre

Département : Biologie



جامعة الجيلالي بونعامة – خميس مليانة

Université Djilali Bounaama  
Khemis Miliana

قسم : البيولوجيا

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de

### MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

### THEME

**Etude de l'activité antibactérienne et antioxydante du lichen  
*Evernia prunastri***

Réalisé par :

BELLOUNES IMANE

MELLAH SARA

Soutenu le 03/07/2024 devant le jury composé de :

<b>Présidente</b>	M <sup>me</sup>	ITATAHINE A	MAB	U. Khemis Miliana
<b>Examinatrice</b>	M <sup>me</sup>	KOCHRANE R	MAB	U. Khemis Miliana
<b>Promoteur</b>	M <sup>r</sup>	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 encadrant Dr Belabed Bellal. qui nous a guidé dans notre travail, Merci pour nous avoir accordé votre temps, Merci d'avoir été très patiente avec nous, Merci d'avoir mis votre expérience à notre profil.

Nous tenons à présenter nos sincères et vifs remerciements aux membres de jury : Mme Kochrane R et Mme Itatahine A qui ont accepté de juger notre travail.

Nous remercions également toute l'équipe de laboratoire SNV de l'Université, Djilali Bounaama , particulièrement Nadjiba et Aicha.

Nous remercions également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour réaliser ce travail.

Merci

# *Dédicace*

A la lumière de mes yeux , l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui m'a apporté son apput surfant toutes mes années d'études pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sucérité

A ma chère père qui m'a appris le sens de la prévalence tout au long de mes études,pour son conciles et ses encouragements

A mes souers Nesrine et Razika qui je l'aime beaucoup et qui m'a encouragé et ma donnée l'espoir

A mon chère frère Mohamed Amine

A ma petite princesse Tasnim

**« Imane »**

Je dédie ce Modest travail : A ma chère et tendre mère Khadidja, source d'affection de courage et d'inspiration qui a autant sacrifié pour me voir atteindre ce jour.

A mon père Mohammed source de respect, en témoignage de ma profonde reconnaissance pour tout l'effort et le soutien incessant qui m'a toujours apporté.

A mes Jolies sœurs Nesrine et Imane

Et surtout A mon petit amoureux, ma joie et mon bonheur à ma nièce Manar

A mes amies Amina et Chaima

A tous mes camarades de la promotion biotechnologie microbiennes.

**« Sara »**

## Résumé

Le but de cette étude est la valorisation de l'espèce lichénique *Evernia prunastri* par l'évaluation de l'activité antibactérienne et l'activité antioxydante de ses extraits éthanolique et aqueux.

L'extraction a été réalisée par deux solvants, l'éthanol et l'eau distillée. L'évaluation de l'activité antibactérienne a été menée par la méthode de diffusion sur gélose et pour l'activité antioxydant, en utilisant la méthode FRAP. Le rendement pour l'extrait éthanolique était de l'ordre de 14,3%. Concernant l'étude de l'activité antibactérienne, les résultats ont montré une activité limitée pour l'extrait éthanolique, et il s'est révélé efficace contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* avec des zones d'inhibition comprises entre 0 et 16 mm. Alors que l'extrait aqueux n'avait aucun effet antibactérien.

Pour l'activité antioxydante, nous avons utilisé la technique FRAP ; les résultats ont montré une activité importante, notamment pour l'extrait éthanolique avec  $IC_{50} = 0,013$  mg/ml, et une faible activité pour l'extrait aqueux,  $IC_{50} = 7,7$  mg/ml.

**Mots clés :** lichens, *Evernia prunastri*, antibactérienne, antioxydante, FRAP.

## **Abstract**

The aim of this study is to valorize the local lichen species *Evernia prunastri* by the evaluation of the antibacterial antioxidant activities of both ethanolic and aqueous extracts

The extraction was carried out using two solvents, ethanol and distilled water. The evaluation of the antibacterial activity was done using gelose diffusion method and the antioxidant activity was evaluated by FRAP method. The yield for the ethanolic extract was 14.3%. For the evaluation of the antibacterial activity, the results showed a limited activity of the ethanolic extract, it was efficient against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* with inhibition zones diameter between 0 and 16 mm; but the aqueous extract was completely inefficient.

The antioxidant activity was evaluated using FRAP technique; the results showed a good activity of the ethanolic extract with  $IC_{50} = 0.013$  mg/ml, and a weak activity for the aqueous extract with an  $IC_{50} = 7.7$  mg/ml.

**Keywords** : Lichen, *Evernia prunastri*, antibacterial, antioxidant, FRAP.

## الملخص

الهدف من دراستنا هو تقييم بعض الانشطة البيولوجية (النشاط المضاد للبكتيريا و مضادات الاكسدة) للمستخلصات الإيثانولية و المائية لأحد انواع الأشنة (*Evernia prunastri*)

المستخلص تم باستعمال مذيبين، الإيثانول و الماء المقطر. تقييم النشاط الضد بكتيري تم عن طريق الإنتشار عبي الجيلوز، أما فيما يتعلق بالنشاط المضاد للأكسدة فتم تقييمه باستعمال طريقة الـ FRAP . كان مردود المستخلص 14.3 % وفيما يتعلق بدراسة النشاط المضاد للبكتيريا أظهرت النتائج نشاط محدود بالنسبة للمستخلص الأيثانولي، و كان فعالا ضد كل من *Staphylococcus aureus* ، *Escherichia coli* و *Enterococcus faecalis* بمناطق تثبيط تتراوح بين 0 و 16 ملمتر. بينما المستخلص المائي لم يكن له أي تأثير مضاد للبكتيريا .

من خلال دراستنا للنشاط المضاد للأكسدة قمنا باستخدام تقنية FRAP حيث أن النتائج أظهرت نشاط جد معتبر خاصة بالنسبة للمستخلص الإيثانولي مع  $IC_{50} = 0.013$  مع/مل و نشاط ضعيف بالنسبة للمستخلص المائي  $IC_{50} = 7.7$  مع/مل

**الكلمات المفتاحية :** مضاد للبكتيريا، مضاد الأكسدة، ايفارنيا بروناستري، مستخلص، FRAP.

## **Liste des abréviations :**

**ADN :** Acide Désoxyribonucléique

**DPPH :** 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

**FRAP :** dosage du pouvoir réducteur (Ferricreducing-antioxidant power)

**MH :** Muller Hinton

**Rdt :** rendement

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1</b> : Classes des métabolite secondaires.....	15
<b>Tableau 2</b> : La préparation des différentes concentrations des échantillons.....	35
<b>Tableau 3</b> : Effet du l'extraits éthanolique sur les souches bactériennes.....	38
<b>Tableau 4</b> : : Effet du l'extrait aqueux sur les souches bactériennes.....	40

## Liste des figures :

<b>Figure 1</b> : principaux types des thalles lichéniques.....	6
<b>Figure 2</b> : Coupe d'apothécie et photographie des apothécies .....	8
<b>Figure 3</b> : sorédies d' <i>Imshaugia aleurites</i> .....	8
<b>Figure 4</b> : Les différentes voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques.....	16
<b>Figure 5</b> : Structures de l'ergostérol. ....	17
<b>Figure 6</b> Biogénèse et la voie de l'acide shikimique, de la calycine et de l'acide pulvinique	18
<b>Figure 7</b> : Schéma de biosynthèse proposé pour les chromons. ....	19
<b>Figure 8</b> : Structure d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique).....	19
<b>Figure 9</b> : Le Schéma de biosynthèse des xanthones chez les lichens. ....	20
<b>Figure 10</b> : Photo d' <i>E.prunastri</i> sur un tronc d'arbre .....	23
<b>Figure 11</b> : Photo d' <i>E.prunastri</i> .....	23
<b>Figure 12</b> : Photo d' <i>E.prunastri</i> .....	24
<b>Figure 13</b> : Structures de l'acide usnique et l'acide évernique d' <i>Evernia prunastri</i> .....	29
<b>Figure 14</b> : Le lichen <i>Evernia prunasti</i> .....	32
<b>Figure 15</b> : Schéma général de l'extraction des métabolites secondaires. ....	34
<b>Figure 16</b> : Résultat du test de sensibilité des souches bactérienne .....	38
<b>Figure 17</b> : Résultat du test de sensibilité des souches bactérienne. ....	40
<b>Figure 18</b> : Les effets des souches bactériennes (la zone d'inhibition) sur les deux extraits ..	41
<b>Figure 19</b> : Evaluation de l'activité antioxydante des extraits par la méthode FRAP.....	42
<b>Figure 20</b> : valeurs des IC50%. ....	43



## *Table des matières*

Introduction .....	1
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Généralité sur les lichens : .....	4
I.1 Définition : .....	4
I.2. Morphologie et structure du thalle : .....	4
I.2.1 Morphologie du thalle : .....	4
I.2.2 Structure du thalle : .....	6
I.3 Reproduction des lichens : : .....	7
II. L'intérêt de l'utilisation du lichen : .....	8
II.1 Propriété médicinale et pharmacologique : .....	8
II.2 Bioindicateur de pollution : .....	9
II.3 Autres applications : .....	10
III. Répartition des lichens : .....	10
IV. Les propriétés biologiques et structurales des lichens : .....	11
V. Métabolismes lichéniques : .....	13
V.1. Métabolites primaires : .....	13
V.2. Métabolites secondaires : .....	14
V.2.1 .Voie de l'acide mévalonique : .....	16
V.2.2. Voie de l'acide shikimique : .....	17
V.2.3. Voie de l'acétate polymalonate : .....	18
V.3. Propriétés biologiques et application des métabolites lichéniques : .....	21
V.3.1 Rôles écologiques : .....	21
V.3.2 Tolérance à la pollution : .....	21
VI. <i>Evernia prunastri</i> .....	22
VI.1. Présentation .....	22
VI.2 Classification : .....	22
VI.3. Identification de l'espèce <i>Evernia prunastri</i> : .....	22
VI.4. Morphologie de l'espèce <i>Evernia prunastri</i> .....	23
VI.5. Distribution des composés d' <i>Evernia prunastri</i> : .....	23
VI.6. Propriétés des lichens du genre <i>Evernia prunastri</i> : .....	24
VII. Généralités sur les antioxydants : .....	25

VII.1. définition : .....	26
VII.2. Les principales sources d'antioxydantes : .....	26
VII.3. Quelques méthodes de mesures de l'activité antioxydantes : .....	27
<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	
Objectif d'étude .....	29
Présentation de l'espèce .....	29
I. Préparation du lichen : .....	30
II. Préparation des extraits : .....	30
II.1. Extrait éthanolique : .....	30
II.2. Extrait aqueux : .....	31
III. Activité antibactérienne : .....	31
IV. Dosage du pouvoir réducteur « FRAP » : .....	31
V. Résultat de rendement de l'extraction REt .....	33
VI. Résultat de l'activité antibactérienne de deux extraits : .....	36
VII. Résultat de rendement totale de l'extraction REt : .....	36
VIII. Résultats du pouvoir réducteur « FRAP » : .....	41
Conclusion .....	46
Références bibliographiques .....	48

# **INTRODUCTION**

---

## Introduction

Les lichens sont des organismes uniques qui produisent des métabolites biologiquement actives avec une grande variété d'effets, y compris des activités antibiotiques, antifongique, antivirales, anti-inflammatoires, analgésiques, antipyrétiques, antiprolifératives et cytotoxiques. Cependant, seuls un nombre très limité de substances de lichens ont été étudiés pour leurs activités biologiques et leur potentiel thérapeutique en médecine (**Joël et al., 2005**).

L'utilisation des lichens comme matière odorante naturelle remonte à des civilisations anciennes. Les Égyptiens utilisaient la mousse de chêne (*Evernia prunastri*) pour parfumer divers objets, fabriquer du pain et embaumer les corps. Au Moyen Âge, ce lichen était utilisé pour préparer des poudres odorantes et pour traiter les voies respiratoires (**Elix, 1996**).

Les lichens ont été utilisés par l'homme comme plantes médicinales, comme nourriture pour lui-même ou pour les animaux, comme source de colorants ou de parfums. Les lichens ont servi de nourriture à l'homme surtout en période de disette. Ils ont également été utilisés pour mesurer la pollution atmosphérique (**Collombet, 1989**).

Les lichens produisent de nombreux métabolites secondaires caractéristiques qui sont uniques dans la nature. La plupart de ces substances sont de nature phénolique et représentent parfois jusqu'à 40% du poids sec du lichen (**Molnár & Farkas, 2010**).

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

Ainsi, de nombreuses espèces font l'objet d'études phytochimiques approfondies pour découvrir et identifier de nouveaux composés possédant des propriétés biologiques, notamment l'activité antibactérienne et antioxydante qui représente actuellement un domaine de recherche grandissant (**Yamamoto et al., 2015**).

Malheureusement peu d'études qui s'intéressent aux propriétés thérapeutiques des lichens en Algérie malgré la diversité des espèces et des écosystèmes. Ce travail vise à valoriser les espèces lichéniques locales et plus précisément *Evernia prunastri*, dont l'objectif est d'évaluer l'activité antibactérienne et antioxydante.

---

Afin d'atteindre l'objectif, ce mémoire a été divisé en deux parties, la première est bibliographique où on présente les lichens, leurs métabolites secondaires et l'espèce *Evernia prunastri* ; alors que la deuxième partie présente l'étude expérimentale, dans laquelle on décrit les méthodes utilisées afin d'évaluer l'activité antibactérienne et antioxydante de l'espèce.

**Remarque** : Parmi les obstacles rencontrés lors de la réalisation de ce mémoire est le manque des produits au niveau des laboratoires et la difficulté d'avoir des souches de référence.

---

# **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **I. Généralité sur les lichens :**

### **I.1 Définition**

Les lichens sont probablement les premiers colonisateurs d'habitats terrestres sur terre, avec des archives fossiles remontant à 400 à 600 millions d'années. Ces fossiles indiquent que les champignons ont développée des partenariats symbiotiques avec des photo- autotrophes. Il existe environ 300 genres et 18000 espèces de lichen célèbre. Ils produisent plus de 800métabolites secondaires (**Asplund & Wardles, 2016**).

Le terme de lichen est une association symbiotique intime entre un champignon (mycobionte) et un partenaire chlorophyllien, cyanophycée ou chlorophycée (photobiont) (**Boullard, 1997**).

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

### **I.2 Morphologie et structure du thalle :**

#### **I.2.1 Morphologie du thalle :**

Les thalles lichéniques sont classés en 7 types fondamentaux, selon leur morphologie :

##### **a) Les thalles lépreux :**

Ce sont des associations cohérentes de granules (0,1-0,2 mm) constitués chacun d'un peloton d'hyphes associés à quelques cellules algales. Les thalles lépreux, considérés comme primitifs, parviennent à constituer de grandes surfaces farineuses (**Gavériaux, 2008**).

##### **b) Les thalles crustacés :**

Ils forment une croûte fortement adhérente au substrat dans lequel pénètrent les hyphes de la médulle (pas de cortex inférieur). Plus de 4/5 des lichens ont des thalles crustacés. La plupart d'entre eux sont souvent appelés les micro lichens (**Gavériaux, 2008**).

**c)Le thalle squamuleux :**

Ils sont formés de petites écailles qui se chevauchent partiellement. Thalle épisubstratique fortement appliqué sur le substrat ; le bord du thalle est généralement redressé et de ce fait non adhérent. Souvent une petite partie de la surface inférieure adhère au substrat. Par exemple : Psoradeciens, petites squamules ou écailles rapprochées ou imbriquées à la manière des tuiles d'un toit. On peut déjà différencier une face supérieure d'une face inférieure, notamment sur le bord des squamules (**Hassani & Djeddi, 2013**).

**d)Les thalles foliacés :**

Ce sont formés de lames ayant l'apparence de feuilles constituées de lobes diversement orientés ; ces thalles sont facilement détachables du substrat auquel ils sont fixés par des rhizines. Certains thalles foliacés n'adhèrent au substrat que par une petite zone (crampon) souvent située au centre de la face inférieure, et la face supérieure présente une légère dépression (ombilic) ; ce sont les thalles foliacés ombiliqués. Par exemple : les *Umbilicaria* (**Gavériaux, 2008**).

**e) Les thalles fruticuleux :**

Thalle adhérent uniquement au substrat par extrémité, pendant, étalé ou dressé ; exemple *Usnea subfloridana*. En forme de tiges ou lanières ramifiées ou non, dans la majorité des cas la longueur est supérieure à la largeur, section du thalle ronde à plate, couleur uniforme du thalle ; rarement différenciation entre face supérieure et face inférieure (**Hassani et al., 2013**).

**f)Les Thalles gélatineux :**

Ayant la consistance et l'apparence de la gélatine, ce qui est le cas, à l'état humide, des thalles homéomères à cyanobactéries, uniformément réparties dans toute l'épaisseur du thalle. À l'état sec, ces thalles sont noirâtres, rigides, cassants et friables. Ex. : les thalles d'*Ephebe*, *Collema*, *Leptogium*, *Lichina*... Cette consistance gélatineuse est due à l'existence d'une gaine mucilagineuse (**Gavériaux, 2008**).

**g) Les thalles composites :**

Comportant plusieurs composantes distinctes ++ au niveau du substrat, un thalle ± foliacé-squamuleux (thalle primaire), ++ un thalle dressé, ± ramifié (thalle secondaire), qui se développe secondairement à partir du thalle primaire, le thalle secondaire produisant les

structures sporogènes. Ex : le thalle composite des *Cladonia*, des *Stereocaulon* (Gavériaux, 2008).



FIGURE 1 : PRINCIPAUX TYPES DES THALLES LICHENIQUES.

A : *Rhizocarpon oederi* Körb. ; B : *Punctelia borrieri* (Sm.) Krog. ; C : *Usnea dasypoga* Stirton ; D : *Cladonia macilenta* Hoffm. ; E : *Normandina pulchella* (Borrer.) Nyl. ; F : *Collema polycarpon* Hoffm. ; G : *Lepraria membranacea* (Dicks.) Vain.

(source : [http://www2.ac-lille.fr/myconord/photos\\_afl/Photos\\_AFL\\_C.htm](http://www2.ac-lille.fr/myconord/photos_afl/Photos_AFL_C.htm)). (Nom, année)

### I.2.2 Structure du thalle :

Bien que la morphologie des lichens soit très variée, leur structure anatomique est très uniforme et assure leur unité. Il existe deux grands types de structures (April *et al.*, 2011) :

a) **Structure homéomère** : les cellules algales sont réparties de façon homogène parmi les hyphes par exemple chez les *Collema* ;

b) **Structure hétéromère stratifiée** : de la face supérieure à la face inférieure, les zones suivantes se superposent :

- ❖ Le cortex supérieur formé de cellules jointives de champignon ;
- ❖ La couche algale ou couche assimilatrice, mélange de cellules algales et d'hyphes lâches mycéliens ;
- ❖ La couche médullaire (médulle) formée par des hyphes lâches de champignon ;
- ❖ Le cortex inférieur, cellules de champignon d'où s'échappent parfois des rhizines servant à la fixation du thalle.

Chez certains lichens (stéréocaulons et usnées), la structure hétéromère est dite radiée car le thalle cylindrique montre une symétrie axiale. De la périphérie au centre, il présente les mêmes couches que celles citées précédemment mais le cortex inférieur est absent et le centre du cylindre est occupé par le cordon axial (**April et al., 2011**).

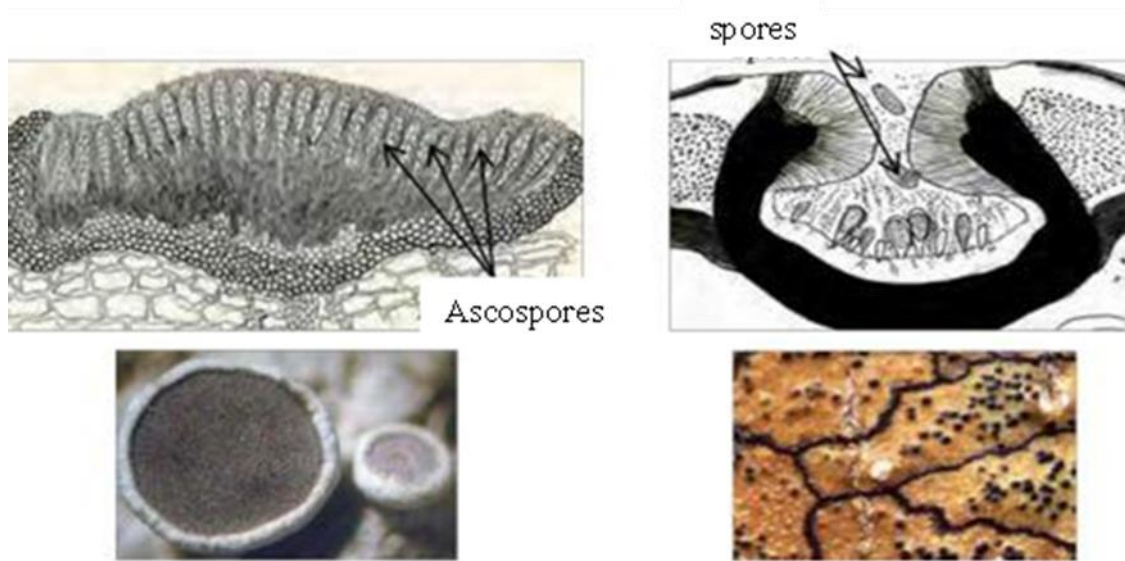
### **I.3 Reproduction des lichens :**

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

Il existe deux modes de reproduction des lichens peuvent être adoptés sont sexuée et asexuée.

#### ***a) Reproduction sexuée :***

La reproduction sexuée (rencontre des spores fongiques avec un photobionte). Chez la majorité des lichens, la reproduction sexuée est très largement prédominante ; par exemple, 90 % des lichens de Grande Bretagne et d'Irlande produisent des organes reproducteurs, alors que seuls 29 % se reproduisent par fragmentation (**Murtagh et al., 2000**).



**FIGURE 2** : COUPE D'APOTHECIE ET PHOTOGRAPHIE DES APOTHECIES DE *PHYSICIA LEPTALEA* (A GAUCHE) ; COUPE DE PERITHECE ET PHOTOGRAPHIE DES PERITHECES DE *PYRENULA CHLOROSPILA* (A DROITE)

(source : [file:///C:/Users/J206/Downloads/ENS\\_2011\\_Lichens\\_web.pdf](file:///C:/Users/J206/Downloads/ENS_2011_Lichens_web.pdf)).

### ***b) Reproduction asexuée :***

La reproduction asexuée ou végétative est effectuée par dispersion de fragments de thalles ou d'organes spécialisés comme les isidies ou les sorédies (**Büdel & Scheidegger, 1996**)

- ❖ Les isidies sont de petites excroissances formées d'algues et de champignons, protégées par le cortex (par exemple, chez *Pseudevernia furfuracea*).
- ❖ Les sorédies : chez certaines espèces (*Imshaugia aleurites*), le bord des lanières du thalle est parsemé de tâches farineuses ou soralies. Au niveau de chacune, le cortex du thalle est interrompu et laisse échapper de petits amas, les sorédies, formées d'algues et de filaments mycéliens légers, les isidies et les sorédies sont facilement transportées par le vent, la pluie ou de petits animaux. Une fois fixées sur le substrat adéquat par les hyphes fongiques, elles continuent de croître et se développent. (**Van Haluwyn et al., 2009**).



Figure 3 : sorédies d'*Imshaugia aleurites* S.).L.F. Meyer (à gauche) et Isidies de *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf (à droite)

(source : [http://www2.ac-lille.fr/myconord/photos\\_afl/Photos\\_AFL\\_C.htm](http://www2.ac-lille.fr/myconord/photos_afl/Photos_AFL_C.htm))

## II. L'intérêt de l'utilisation du lichen :

### II.1 Propriété médicinale et pharmacologique :

Les lichens ont été consommés en temps de famine, par exemple lors du siège de Leningrad (1941-1944) (**Karagöz et al., 2009**), et ils sont utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle, soit dans leur intégralité, soit sous forme d'extraits. Les indiens d'Amérique, les égyptiens, les indiens et les chinois employaient les lichens pour traiter les maux, et en premier lieu comme expectorants (**Elix, 1996**).

Le lichen *Peltigera canina*, un lichen foliacé à cyanobactérie et riche en méthionine, était utilisé en Inde comme remède contre les maux hépatiques. Dans différentes pharmacopées, de nombreuses espèces de lichens possédant une activité thérapeutique sont recensées telles que *Cetraria islandica*, *Cladonia coccifera*, *Usnea plicata*, *Peltigera canina*, *Lobaria pulmonaria*, *Xanthoria parietina* et *Evernia prunastri* (**Saklani et Upreti, 1992**).

En Espagne, certaines espèces de lichens étaient utilisées comme diurétiques (*Ramalina bourgeana*), analgésiques (*Xanthoria parietina*), pour traiter les douleurs menstruelles, les problèmes rénaux, ou encore respiratoires (*Pseudevernia furfuracea*) (**González et al. 1995**). En Inde, des mélanges d'au moins deux espèces de *Parmelia*, *Usnea longissima*, *Ramalina subcomplanata* et *Heterodermia tremulans* sont vendus sous le nom de « Chharila » et sont utilisés comme astringent, laxatif et carminatif (**Shukla et al., 2010**).

Le lichen *Cetraria islandica*, ou « mousse d'Islande », trouve de nombreuses applications médicales. Il a été longtemps utilisé contre la tuberculose, les bronchites chroniques, les diarrhées et permet également de traiter les inflammations de la gorge et de la cavité buccale, les maladies d'estomac, gastriques ou encore la grippe. Des études en Islande et en Allemagne

ont conduit au développement de capsules et de tablettes à base d'extraits de ce lichen, utilisées en cas d'obstruction intestinale, d'ulcère gastrique, d'arthrite et d'asthme (**Podterob, 2008**).

Voilà quelque exemple décrivant quelques utilisations médicinales traditionnelles des lichens :

•***Cladonia fruticulosa*** : en Chine, il est utilisé pour traiter les infections bactériennes de la peau (**Wang et al., 2001**)

•***Bryoria asiatica*** : utilisé comme traitement des insuffisances rénales et des états de faiblesse générale, des palpitations cardiaques, sueurs nocturnes, difficulté à uriner, œdème (**Wang et al., 2001**).

•***Flavoparmelia caperata*** : utilisé pour traiter la fièvre (**Wang et al., 2001**).

•***Ramalina spp .Ach .*** : en Grèce il appliqué comme un cataplasme, il arrête les saignements, soulage l'inflammation et guérit les maladies de la peau (**Vavuz, 2013**).

## **II.2 Bioindicateur de pollution :**

Les espèces de lichens sensibles à la pollution sont utilisées comme bio indicateurs. Leur présence ou leur disparition étant un signe de bonne ou de mauvaise qualité de l'air, des sols ou des rivières. Les lichens les plus résistants sont capables d'accumuler les polluants ; ce sont des bio accumulateurs. Cette capacité accumulatrice des lichens est utilisée en diagnostic et concerne en particulier le dioxyde de soufre, le fluor, les éléments-traces métalliques, les radioéléments et les polluants organiques (**Van, 1999 ; Parvis, 2014**).

## **II.3 Autres applications :**

Dans l'anciennes Egypte, les lichens étaient utilisés également comme parfums ou pigments. Aussi, les romains teignaient leurs toges avec des lichens tels que *Rocella*, *Parmelia*, *Ochrolechia* et *Evernia sp*. L'origine d'une industrie concernant l'utilisation des lichens à des fins tinctoriales remonte au début du XIV<sup>ème</sup> siècle. L'orseille, une substance colorante de couleur violette extraite de certains lichens (de *Rocella fuciformis* notamment), a été utilisée jusque vers la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle. Ce jour-là encore, des bandelettes de papier imprégnées de litmus, un colorant extrait par l'eau à partir de *Rocella sp.*, sont utilisées comme indicateurs de pH en laboratoire (**Mitrovic et al., 2011**).

A ce moment, les extraits des lichens *Evernia prunastri* (ou « mousse de chêne ») et *Pseudevernia furfuracea* (ou « mousse d'arbre ») sont largement utilisés en parfumerie (**Joulain & Tabacchi, 2009**), pour leur note marine et boisée respective, en particulier dans les eaux de toilette masculines. Cependant, la présence dans ces extraits de composés allergènes, notamment l'atranorine, impose aux fabricants le respect de la directive européenne 2003/15/CE qui oblige à faire figurer clairement la présence de tels extraits dans la liste des ingrédients, lorsque la concentration est supérieure à 0,001 % dans les produits non rincés (crèmes...) et à 0,01 % dans les produits rincés (shampooings...) (**Mitrovic et al., 2011**).

### **III. Répartition des lichens :**

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

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

On distingue 03 grandes groupes selon leur nature de substrat,

#### **•Lichens épiphytes**

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

#### **•Lichens saxicoles**

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

#### **•Lichens terricoles**

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

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

#### **IV. Les propriétés biologiques et structurales des lichens :**

Les espèces lichénique apporte des propriétés différentes à celles des autres partenaires végétales. On peut distinguer les propriétés suivantes

- Accumulation de fortes quantités de plomb des véhicules à moteur. Le dosage du plomb accumulé dans les thalles d'espèces communes, de large répartition géographique et à forte affinité pour ce métal (*Lecanora conizaeoides*, *Evernia prunastri*, *Hypogymnia physodes*) (**Lachat et al., 2011**).

- Phénomène d'exsorption, observé naturellement en zone contaminée ou à la faveur de retransplantations, est à rapprocher de celui obtenu au cours des expériences de lessivage acide des thalles. Dans le cas des lichens retransplants, l'exsorption peut s'expliquer par une augmentation de l'acidité des pluies (**Nash, 2008**).

- Sont des organismes particuliers issus de la symbiose. Ils ne puisent leur nourriture que dans l'eau de pluie, qu'ils absorbent par toute la surface de leur thalle. Cette biologie particulière explique leur grande sensibilité à la pollution atmosphérique. Ils concentrent les polluants, ceci jusqu'à un certain seuil (**Ozenda, 2000**).

- Leur grande longévité renforce encore l'effet cumulatif des polluants absorbés (**Suty, 2015**).

- Chez les lichens, l'algue induit la synthèse de métabolites secondaires par le champignon « substances lichéniques », qui ont un rôle protecteur contre les forts éclaircissements et contre les herbivores (**Suty, 2015**).

#### **IV. Métabolismes lichéniques :**

Le métabolisme joue un rôle essentiel dans l'échange d'énergie et de la matière. Les lichens produisent plein de substances biologiquement actives, comme des métabolites primaires (intracellulaires) et secondaires (extracellulaires) (**Andersson *et al.*, 1998 ; Zambare & Christopher, 2012**).

Certains de ces métabolites ont un impact sur le développement et la croissance des lichens, des champignons, des mousses, des micro-organismes et des plantes voisines. C'est ce qui influence la structure des communautés lichéniques et la répartition des différentes espèces (**Armstrong & Welch, 2007**).

L'étude phytochimique des lichens se concentre principalement sur les métabolites secondaires. Ces métabolites sont principalement d'origine fongique, mais l'algue peut également participer à leur biosynthèse (**Culberson *et al.*, 1989**). On distingue deux types de métabolites :

##### **IV.1. Métabolites primaires :**

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

##### ***Classes de métabolisme primaire :***

###### **➤ Glucides**

D'un point de vue nutritif, les lichens sont riches en polysaccharides 3 (D-galactose, de D-mannose, de D-glucose), cellulose et hémicellulose sont utilisées dans la nourriture des animaux et de l'homme : utilisé dans l'alimentation se forme des poudres ajoutées au blé ou aux pommes de terre pour compenser la pénurie d'autres farine, utilisé aussi pour la fermentation de la bière (**Dalpé, 2019**).

###### **➤ Protéines**

Les protéines de lichen sont considérées comme des substances biologiquement actives potentielles avec des propriétés biochimiques uniques, la glutéine, la globuline, l'albumine et la prolamine sont des protéines solubles de lichen à 53,4 % des protéines totales). Les protéines de lichen sont utilisées comme des antigels pour les aliments surgelés (**Culberson, 1969**).

###### **➤ Lipides**

Les lipides présents dans les lichens sont composés de différents acides gras, dont trois sont présents en quantité importante : l'acide linoléique, l'acide linoléique et l'acide oléique. Il y a également un acide gras saturé, l'acide palmitique, mais en quantité moindre. Ces lipides jouent un rôle essentiel en tant que réserve nutritive pour les lichens (**Collombet, 1989 ; Cost, 2008**).

➤ **Vitamines**

Les lichens possèdent également un équipement enzymatique et vitaminique :

La vitamine C (acide ascorbique) : est souvent produite en quantité appréciable. D'autres vitamines sont également retrouvées : précurseurs de la vitamine A, D et surtout celles du groupe B (biotine, riboflavine, acide folique ...etc.) (**Coste, 2008**).

La vitamine C : est considérée comme le plus important antioxydant hydrophile étant efficace dans le piégeage des anions superoxydes, le peroxyde d'hydrogène, les radicaux hydroxyles et l'oxygène singulet. Elle intervient également dans la régénération de la vitamine E et protège également les phospholipides membranaires des dommages peroxydantes (**Gardès et al., 2003 ; Pisoschi & Pop, 2015**).

La vitamine E : qui regroupe les tocophérols ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ), est un antioxydant liposoluble essentiel pour les lipides. Elle protège les structures moléculaires sensibles à l'oxydation (en réagissant avec les radicaux peroxydes, ce qui inhibe la peroxydation lipidique). Les formes  $\alpha$  et  $\delta$  tocophérols sont particulièrement intéressantes en tant qu'antioxydants. (**Vertuani et al., 2004 ; Duncan & Suzuki, 2018**).

➤ Les sels minéraux :

Dans les lichens sont présents en faible pourcentage, généralement de 1 à 2% du poids sec. Leur importance est similaire à celle que l'on retrouve dans les végétaux (**Collombet, 1989**).

## **V.2. Métabolite secondaire :**

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

Les métabolites des lichens sont classés selon leur voie biosynthétique. Cette classification a été proposée par Asahina et Shibata en 1971, puis améliorée par Culberson et Elix en 1996 (**Carpentier, 2016**). Les lichens produisent une grande variété de métabolites phénoliques qui sont principalement issus de la voie biosynthétique de l'acétate Polymalonate. Les voies de

l'acide shikimique et de l'acide mévalonique sont aussi des voies biosynthétiques par lesquelles les grands groupes de produits lichénique sont produits. Les différents types de composés lichéniques qui dérivent ces trois voies métaboliques sont présentés au tableau 1 (Carpentier, 2016).

**TABLEAU 1 : CLASSES DES METABOLITE SECONDAIRES**

<b>Voie de biosynthèse</b>	<b>Type de composé</b>	<b>Nombre de composé</b>
	-Acides aliphatiques, esters et dérivés	56
	-Monoaromatique phénoliques	32
	-Depsides, tridepsides et esters -benzyliques	207
	-Depsidones et diphényléthers	131
<b>Voie des acétates polymalonates</b>	-Depsones	08
	-Dibenzofuranes, acide usnique et dérivés	29
	-Anthraquinones et dérivés	52
	-Chromones et chromanes	13
	-Naphtoquinones et bis-naphtoquinones	10
	-Xanthones et bis-xanthones	78
<b>Voie de l'acide mévalonique</b>	-Di-, sesquiter-, et tri-terpènes	88
	-Stéroïdes	33
<b>Voie de l'acide shikimique</b>	-Terphénylquinones	02
	-Dérivés de l'acide pulvinique	13

La diversité des métabolites secondaires des lichens est influencée par trois voies de biosynthèse, qui sont plus ou moins représentées :

- Voie de l'acide mévalonique.
- Voie de l'acide shikimique.
- Voie des acétates-polymalonates.

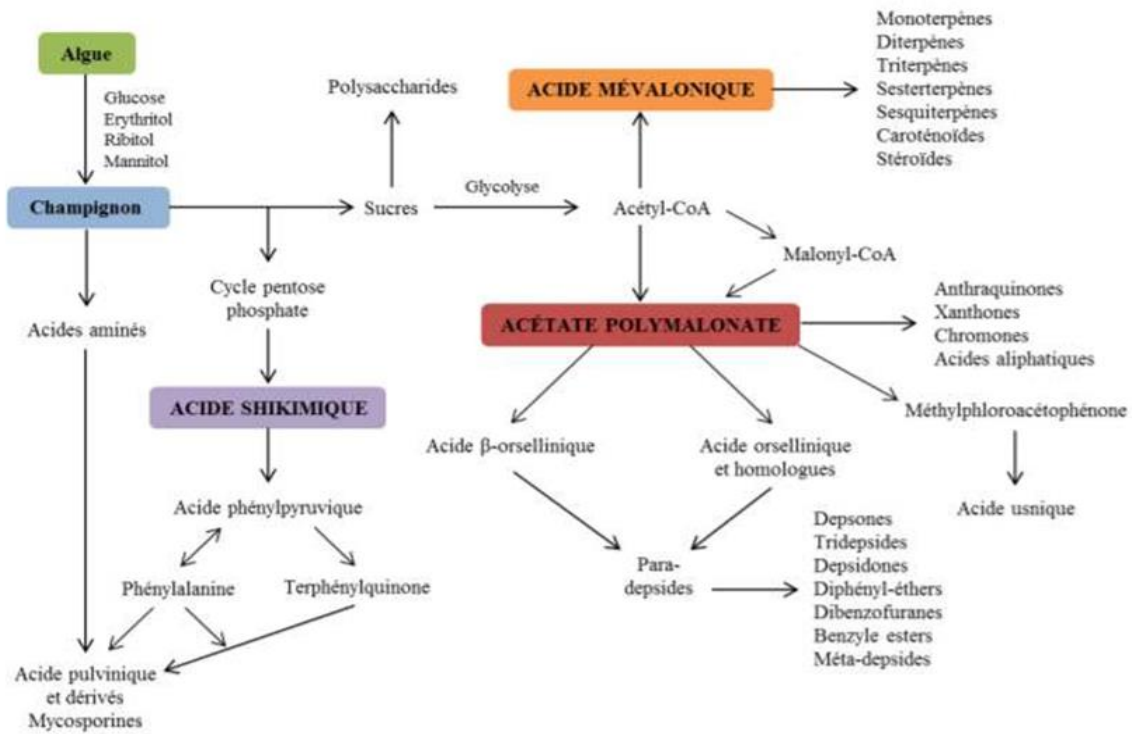
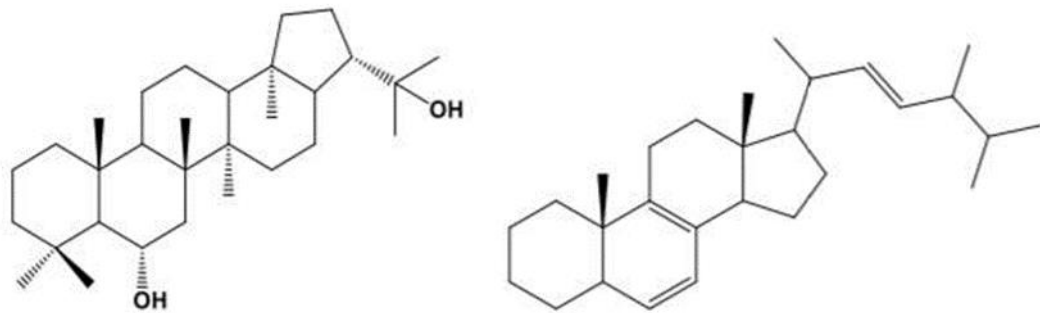


FIGURE 4: LES DIFFÉRENTES VOIES DE BIOSYNTHESE DES MÉTABOLITES SECONDAIRES LICHÉNIQUES (ADAPTE DE ELIX, 1996 ET HUNECK, 1999)

### V.2.1. Voie de l'acide mévalonique :

Cette voie est principalement responsable de la production de mono-, di-, tri-, s'ester et sesquiterpènes, stéroïdes et de caroténoïdes (Huneck, 1999). Tous ces composés dérivent de l'assemblage d'unités isopréniques formées à partir de l'acétyl-CoA. L'isopentényl-pyrophosphate (unité en C5), obtenu à partir de l'acide mévalonique, conduit soit au géranyl-pyrophosphate (unité en C20), précurseur des diterpènes et des caroténoïdes, soit au squalène (unité en C30), précurseur des stéroïdes et triterpènes. Ces composés ne sont pas spécifiques des lichens et sont très souvent présents dans la nature (Romagni & Dayan, 2002).

Parmi les stéroïdes et caroténoïdes trouvés dans les lichens, on peut mentionner l'ergostérol et la zéaxanthine respectivement (Figure05).



**FIGURE 5 : STRUCTURES DE L'ERGOSTEROL (A DROITE) ET DE LA ZEORINE (A GAUCHE) (ROMAGNI ET DAYAN, 2002)**

### **V.2.2. Voie de l'acide shikimique :**

Cette voie (Figure06) permet la synthèse d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) qui, chez les plantes, sont les précurseurs des coumarines, des flavonoïdes, ou encore des alcaloïdes. En revanche, chez les lichens, des composés atypiques, tels que la calycine et l'acide vulpinique sont formés respectivement chez *Lethraria vulpina* et *Pseudocyphellaria crocata* (Stocker, 2008). La phénylalanine peut être le point de départ de la formation de L'acide polyporique, dilactone, lui-même à l'origine de la calycine (Dieu , 2015).

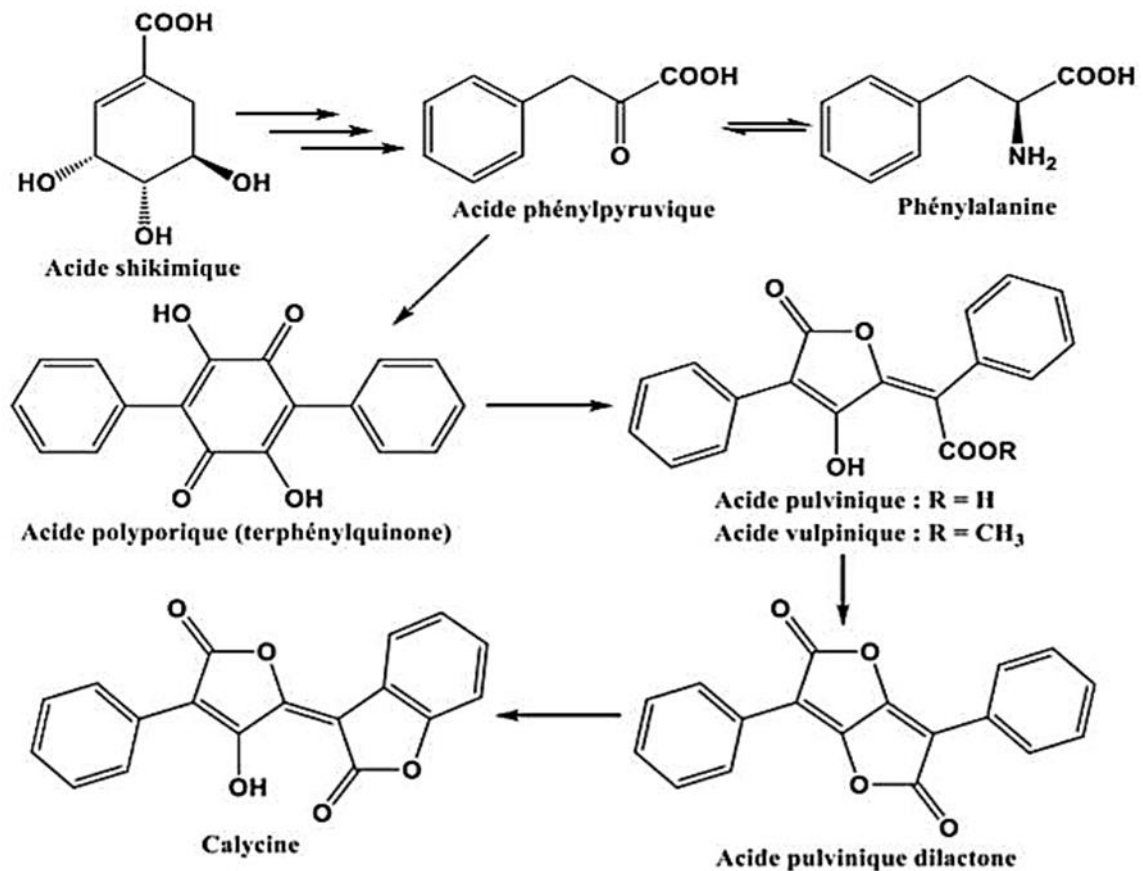


FIGURE 6 : BIOGENESE ET LA VOIE DE L'ACIDE SHIKIMIQUE, DE LA CALYCINE ET DE L'ACIDE PULVINIQUE (DIEU, 2015).

### V.2.3. Voie de l'acétate polymalonate :

Cette voie permet la biogénèse des depsones, depsides, depsidones, des anthraquinones, dibenzofuran, xanthones et chromones, des acides aliphatiques et des dérivés de l'acide orsellinique (Huneck, 1999). Cette voie de biosynthèse donne des métabolites originaux propres aux lichens, on trouve :

#### •Les chromones :

Sont formées par la cyclisation de pentacétides linéaires. Elles ne se trouvent pas uniquement dans les lichens, mais peuvent également être présentes dans certains microorganismes endophytes (Figure 7) (Andrioli *et al.*, 2012 ; Dieu A., 2015).

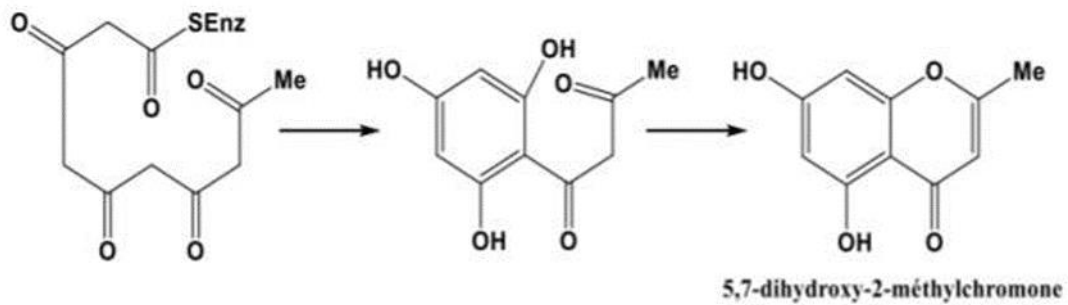


Figure 7 : Schéma de biosynthèse proposé pour les chromons (Dieu , 2015).

### •Les depsides :

Parmi les depsides, on trouve les didepsides (comme l'atranorine) et les tridepsides (comme l'acide lasallique). 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 (Figure08) (Dieu A., 2015).

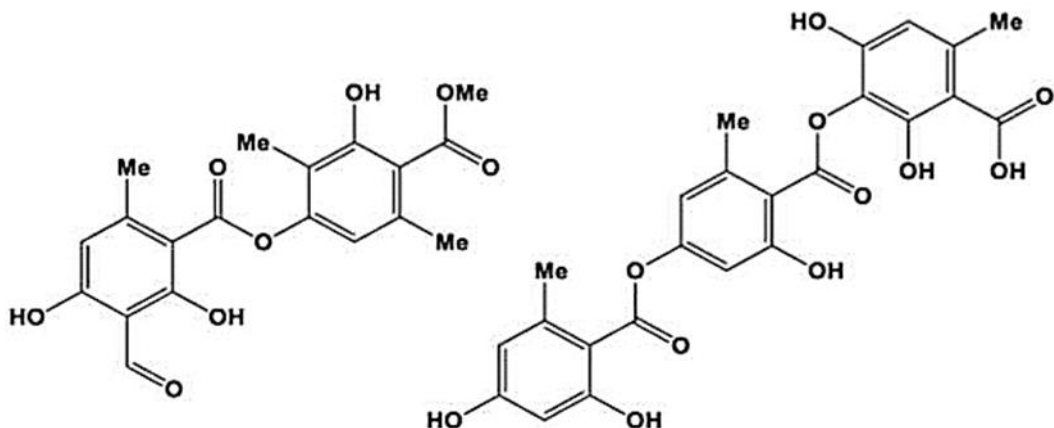


Figure 8 : Structure d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique) (Dieu , 2015).

### •Les xanthones :

La voie de biosynthèse proposée pour ces métabolites (Figure09) implique la formation de la xanthone à partir de la cyclisation d'une chaîne linéaire appelée octacétide. Il est également possible qu'une benzophénone soit un intermédiaire (Masters & Bräse, 2012). Certaines xanthones plus inhabituelles, comme la raveneline du champignon *Helminthosporium ravenelii*

(Raistrick *et al.*, 1936 ; Birch *et al.*, 1976), où la thioméline du lichen *Rinodena thiomela* (Elix *et al.*, 1987), possèdent un groupement méthyle en position 3. Dans ces cas, la cyclisation du polycétide pourrait impliquer un intermédiaire anthrone ou anthraquinone, qui se clive oxydativement pour former une benzophénone. Cette benzophénone peut ensuite conduire directement à la formation de la xanthone ou à un réarrangement pour former une xanthone poly hydrogénée (tétrahydroxanthone) qui se transforme ensuite en xanthone (Masters & Bräse, 2012).

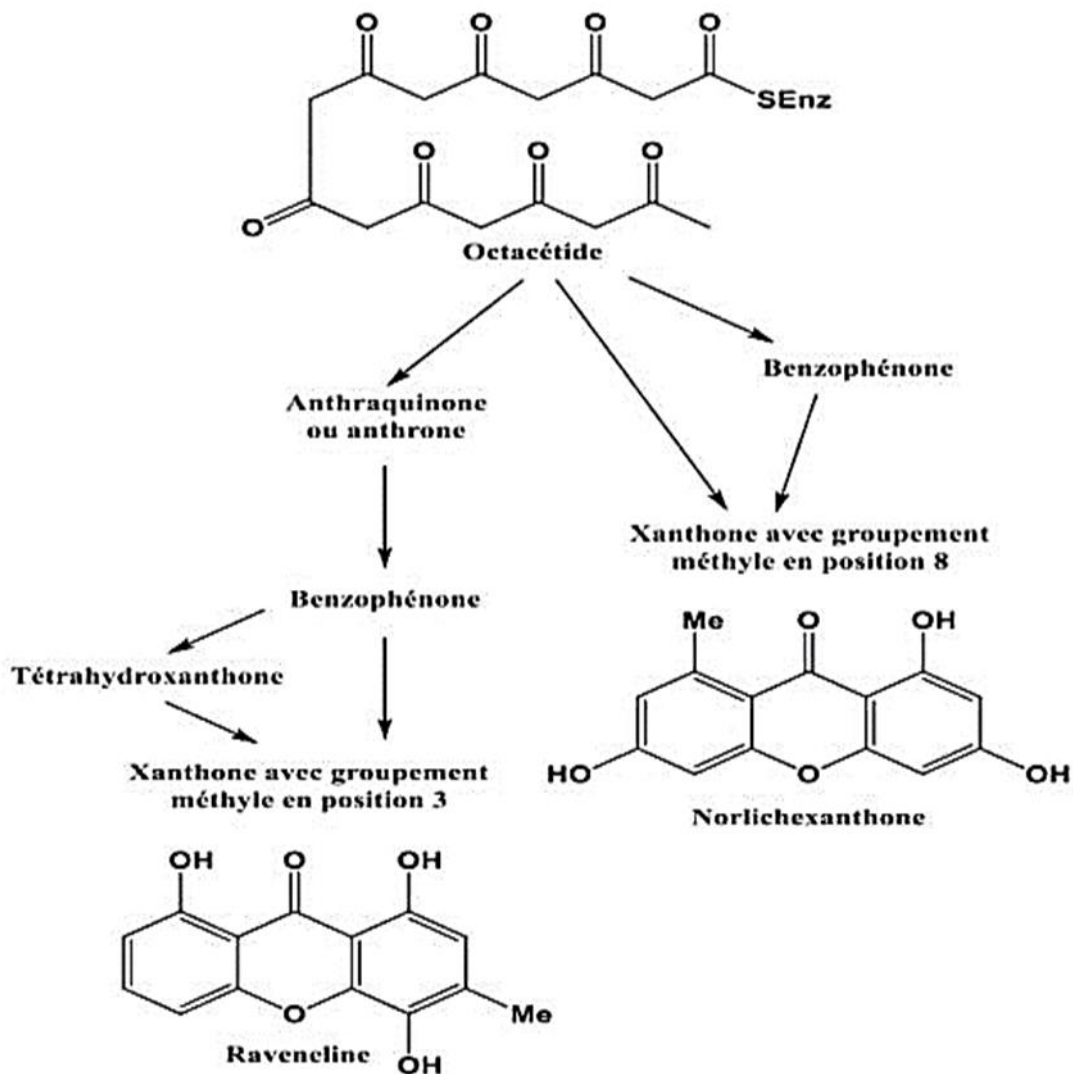


FIGURE 9 : LE SCHEMA DE BIOSYNTHESE DES XANTHONES CHEZ LES LICHENS (DIEU , 2015)

Le lichen *Peltigera canina* était utilisé en Inde comme remède contre les maux hépatiques. Dans différentes pharmacopées, de nombreuses espèces de lichens possédant une activité thérapeutique sont recensées telles que *Usnea plicata*, *Xanthoria parietina*, *Lobaria pulmonaria*, *Cladonia coccifera* et *Evernia prunastri* (Saklani & Upreti, 1992).

### **V.3. Propriétés biologique et application des métabolites lichéniques :**

#### **V.3.1. Rôles écologiques :**

Les métabolites secondaires présents dans les lichens jouent un rôle crucial dans leur défense contre les agressions de l'environnement, qu'il s'agisse de rayonnements ultraviolets intenses, d'herbivores ou de compétition pour l'habitat. De plus, ces composés contribuent à l'altération des roches, facilitant ainsi l'adhésion du lichen (Seaward, 1997).

#### **V.3.2. Tolérance à la pollution :**

Les métabolites secondaires des lichens peuvent en effet jouer un rôle important dans leur capacité à résister à la pollution. Certains composés ont la capacité d'inhiber ou de favoriser l'absorption de différents ions métalliques, ainsi que de former des complexes en les chélatant (Purvis, 2014).

## **VI. *Evernia prunastri***

### **VI.1. Présentation**

C'est un type de lichen qui pousse sur les écorces d'arbres et parfois sur les murs. Il est courant dans les zones humides et peu polluées. Bien qu'il reste rare, il est facilement reconnaissable grâce à son apparence (**Boullard, 2006**). Son thalle fruticuleux, qui appartient à la famille des Usnéacées, est reconnaissable grâce à sa couleur gris-vert, (teint liée à l'appartenance de son photobionte au genre *Trebouxia*) (**Boullard, 1997**).

### **VI.2. Classification :**

L'espèce *Evernia prunastri* est classifiée selon la classification suivante :

**Règne :** Fungi

**Division :** Ascomycota

**Classe :** Lecanoromycetes

**Ordre :** Lecanorales

**Famille :** Parmeliaceae

**Genre :** *Evernia*

**Espèces :** *Evernia prunastri* (**Solak, 2016**).

### **VI.3. Identification de l'espèce *Evernia prunastri* :**

*Evernia prunastri* est également connue sous le nom de "Oakmoss" ou "mousse de chêne" en raison de sa présence sur l'écorce des chênes. Cependant, on peut également la trouver dans une certaine mesure sur des arbres de pin dans des environnements humides à très humides (**Loppi & Frati, 2006 ; Senol et al., 2019**). En plus des arbres, ce lichen peut pousser sur des piquets de clôture, dans des landes, sur des sables en arrière-dune et parfois sur des roches siliceuses riches en nutriments (**Smith et al., 2009**).

Cette espèce peut subir des altérations lorsqu'elle est exposée à des conditions sèches et à la pleine lumière du soleil. De plus, ce lichen est également sensible à la pollution de l'air. (**Munzi, 2013 ; Alpsoy et al., 2013**).

#### VI.4. Morphologie de l'espèce *Evernia prunastri* :

Le thalle de cette espèce a une apparence buissonnante et est composé de lanières plates. Il mesure entre 3 et 10 cm de hauteur et a une structure arbustive avec des rameaux en lanières (Bellenfant *et al.*, 2010). La face supérieure du thalle est de couleur gris verdâtre à vert pâle-jaune, tandis que la face inférieure est grisâtre à blanchâtre (Karabulut et Osturk, 2015). La couleur de *l'Evernai prunastri* varie du vert au blanc verdâtre lorsqu'il est sec, et de l'olive vert foncé au jaune-vert lorsqu'il est frais. Le thalle de cette espèce est foliacé, mais attaché à un point et a une apparence fruticuleuse. La texture des thalles est caoutchouteuse lorsqu'elle est fraîche et rugueuse lorsqu'elle est sèche. (Kosanic *et al.*, 2013 ; Kolly-Ray et Mangin-Gonze, 2016).



Figure 10 : photo d'*E.prunastri* sur un tronc d'arbre (Kolly-ray & mangin-gonze, 2016)



FIGURE 11 : PHOTO D'*E.PRUNASTRI* (DOUBI ET AL., 2016) (DOUBI ET AL., 2016)

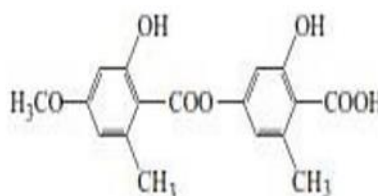
#### VI.5. Distribution des composés d'*Evernia prunastri* :

Parmi les métabolismes secondaires les plus importants de *l'Evernai prunastri*, ont trouvé l'acide évernique et l'acide usnique atranorine et chloratranorine qui se déposent principalement dans le cortex. De même, l'acide évernique se dépose également dans la zone médullaire du thalle (figure 12) (Lackovicova *et al.*, 2013).

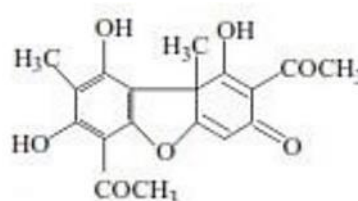
- Acide usnique : est l'une des substances les plus courantes du lichen, c'est l'acide le plus utilisé en médecine. Il s'agit d'une substance cristalline de couleur jaune qui se dissout bien

dans le benzène, le chloroforme, l'alcool amylique et l'acide acétique glacial, peu soluble dans l'éther de pétrole et l'éther diéthylique et insoluble dans l'eau. La teneur en acide usnique des lichens varie de 0,2 % à 4 % (Podterob, 2008 ; Joulain & Tabacchi, 2009).

- L'acide évernique : se présente sous forme de cristaux qui ressemblent à ceux de l'acide benzoïque. Il n'a pas d'odeur ni de goût, et il est peu soluble dans l'eau froide mais plus soluble dans l'eau bouillante. Il est très soluble dans l'alcool et l'éther. On trouve principalement l'acide évernique dans le thalle, à des concentrations nettement plus élevées que l'acide usnique. (Pelouze & Fremy, 1854 ; Ramaut, 1965).



Acide évernique



Acide usnique

**Figure12:** Structures de l'acide usnique et l'acide évernique d'*Evernia prunastri*

(Podterob, 2008)

## VI.6. Propriétés des lichens du genre *Evernia prunastri* :

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

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

*Evernia prunastri*, à la propriété singulière d'absorber et de conserver les odeurs, ce qui en fait une source particulière de principe actif d'un grand nombre de parfums (Sell *et al.*, 2001).

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

Confrontés à l'évolution des formes résistantes de bactéries aux traitements antibactériens classiques, les métabolites lichéniques sont explorés comme solutions de rechange. En effet, plus de 50 % des lichens détiendraient une activité antibiotique, ce qui en fait une source significative de nouveaux composés bioactifs **(Zambare & Christopher., 2012)**. Historiquement, l'activité antibactérienne des extraits de lichens a été mentionnée pour la première fois par Burkholder ; sur 42 espèces de lichens testées, notamment des *Cladonia*, 27 se sont avérées actives contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* **(Burkholder et al., 1944)**. En général, dans la littérature, les activités antibactériennes des extraits de lichens varient en fonction des solvants utilisés pour les extractions ainsi que des bactéries testées, en particulier en raison de la composition de leur membrane, différente chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les premières sont généralement plus sensibles à l'activité antibiotique des métabolites lichéniques que les secondes **(Rowe et al., 1989)**.

Les bactéries à Gram positif des genres *Bacillus* et *Staphylococcus*, et les bactéries à Gram négatif des genres *Escherichia*, *Pseudomonas* et *Klebsiella* sont les plus communément étudiées. Des tests sont également effectués sur les bactéries du genre *Mycobacterium*. L'acide usnique est le composé lichénique le plus largement étudié et, en général, l'activité antibactérienne de ses deux isomères (+) et (-) est similaire sur les bactéries à Gram positif et sur les mycobactéries **(Lauterwein et al., 1995 ; Ingólfssdóttir, 2002)**. Ces espèces constituent une famille bactérienne particulière ; elles se différencient des bactéries à Gram positif et à Gram négatif par la présence d'une paroi riche en acides gras. Les arabinogalactanes liés de façon covalente au peptidoglycane (aussi appelé muréine) sont estérifiés par des acides mycoliques (acides gras à longues chaînes) pour former des cires **(Hett & Rubin, 2008)**.

## **VII. Généralités sur les antioxydants :**

Un antioxydant est une substance qui protège les tissus biologiques contre les dommages des radicaux libres, qui peut être recyclé ou régénéré par des agents réducteurs biologiques, il est constitué d'une série de substances et de protéines qui fournissent ces connexions **(Packer et al., 2000)**. Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont: l'oxygène singulet  $O_2$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , le radical superoxyde  $O_2$ , les peroxydes alkyles  $ROOH$ , les radicaux hydroxyles  $HO$ , peroxydes  $ROO$ , koxyles  $RO$ . L'oxygène est la source de vie pour les

organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes. En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition (**Ekoumou, 2003**).

Les effets sur l'organisme se manifestent au niveau de l'ADN, des lipides et des protéines. (**Ahamet, 2003**)

### **VII.1. Définition :**

Un antioxydant est une molécule qui ralentit ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques à leur contact. L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant.

### **VII.2. Les principales sources d'antioxydantes :**

- Les médicaments :

Certains médicaments fait diminuer le taux du cholestérol dans le sang et la N- acétylcystéine agit dans la régénération du glutathion en pénétrant les cellules (**Le Perchec, 1994**).

- Les vitamines :

- Acide ascorbique : Vitamine C

Contient une forme énediol qui produit la forme dicétonique par transferts successifs de ses deux atomes d'H. Elle joue un rôle important dans la régénération du vit E. (**Bossokpi, 2002**).

- La vitamine E :

Elle semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle. On la retrouve dans les huiles végétales.

- Les antioxydants naturels :

Ils sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont des composés phénoliques (flavonoïdes, xanthonnes, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines, ...). (**Bossokpi, 2002**).

#### **8.4. Quelques méthodes de mesures de l'activité antioxydantes :**

Ils existent plusieurs méthodes pour mesurer l'activité antioxydante *in vitro*.

- **Test de la réduction du fer FRAP (Ferricreducing-antioxidant power) :**

Cette méthode repose sur le changement de couleur lors de la réduction du fer après un transfert d'électrons, marquant ainsi la conversion de l'ion ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en ion ferreux ( $Fe^{2+}$ ). Les données obtenues peuvent être exprimées en équivalents micromolaires de  $Fe^{2+}$  ou par rapport à un standard antioxydant. (Antolovich *et al.*, 2001).

- **Test de Piégeage du radical libre DPPH(ScavengingActivity) :**

Le DPPH (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) est couramment utilisé comme substrat pour évaluer rapidement et directement l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en tant que radical libre et de la simplicité de l'analyse. Cette méthode repose sur le transfert d'électrons qui provoque une solution violette dans l'éthanol. Ce radical libre, de couleur violette caractéristique et stable à température ambiante, est réduit en présence d'une molécule antioxydante, ce qui donne une solution d'éthanol incolore. L'utilisation du test DPPH permet une évaluation simple et rapide des antioxydants par spectrophotométrie, ce qui peut être utile pour évaluer différents produits simultanément (Garcia *et al.*, 2012).

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## **Objectif d'étude**

L'objectif de ce travail est l'évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante de l'espèce *Evernia prunastri*.

La plante que nous avons utilisée pour prélever les extraits, est récoltée à partir d'une boutique de l'apothicaire de la wilaya d'Ain Defla (Khmiss Miliana) qu'elle s'appelle traditionnellement "Barbe Shaybah", dont l'usage principal est d'ordre médicinale (la médecine traditionnelle) sous forme de décoction pour soigner les affections respiratoires et les maux intestinaux aussi dans ma teinture, la momification et dans les recettes cuisines comme des épices.

L'ensemble du travail de cette étude a été réalisé dans le Laboratoire de biochimie, de La Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Khmise Miliana .

## **I. Présentation de l'espèce**

*Evernia prunastri* (Oakmoss, Mousse du chêne) vit sur toutes les espèces d'arbres (feuillus et résineux) et se développe principalement sur l'écorce des arbres de chêne (**Loppi & Frati, 2001**). Lichen fruticuleux en forme de lanières, verdâtre pale à jaune verdâtre avec des soralies. Thalle fruticuleux à lanières peu divisées, souvent ridées. Il présente une face supérieure verte grise à verte jaune cortiquée. La face inférieure est blanchâtre, un peu canaliculée, non cortiquée. La face supérieure apothécies est très rare (**Alouache & Slimane, 2021**).



**FIGURE 13 : CLASSIFICATION D'E. PRUNASTRI (GOMEZ-SERRANILLOS, 2014)**

---

**Domain :** *Biota*

**Régne :** *Fungi*

**Phylum :** *Ascomycota*

**Sous-Phylum :** *Pezizomycotina*

**Classe :** *Lecanoromycete*

**Sous-Classe :** *Lecanoromycetidae*

**Ordre :** *Lecanorale*

---

## **I. Préparation du lichen :**

L'espèce *Evernia prunastri*. cette espèce présente une face supérieure de couleur gris verdâtre pour l'espèce de provenance wilaya d'Ain Defla (figure 13). Des thalles intacts *d'Evernia prunastri* ont été soigneusement nettoyés, débarrassés de tous contaminants (poussière, débris végétaux, etc.), puis séchés pendant une semaine à température ambiante.

Les thalles séchés sont broyés en poudre très fine à l'aide d'un mixeur électrique, puis passés à travers des tamis à porosité très fine. Les broyats obtenus ont été mis dans des récipients en verre et stockés pour une utilisation ultérieure (détermination de la l'activité antibactérienne et antioxydante).

## **II. Préparation des extraits :**

### **Principe de macération :**

La macération est une méthode consiste à laisser la poudre de la plante (souvent) ou du lichen en contact prolongé avec un solvant (**Lagnica, 2005**). Le choix du solvant est orienté par les caractéristiques chimiques spécifiques pour chaque famille de métabolites secondaires (**Rispail et al., 2005, Khebbaz et al., 2014**).

L'éthanol est classiquement utilisé pour l'extraction des métabolites secondaires lichéneuse, l'extraction s'effectue à température ambiante pendant plusieurs heures (**Vila et al., 2011**). Le choix de réaliser les extractions à température ambiante a été fait, dans le but d'éviter la dégradation potentielle de certains composés (notamment des depsides, sensibles à la chaleur) (**Vila et al., 2011**).

### **II.1. Extrait éthanolique :**

Pour apprécier le contenu en métabolites secondaires d'espèce de lichen, une extraction par macération a été réalisée dont son principe consiste à faire imprégner une quantité de poudre de lichens dans un volume du solvant (éthanol) sous agitation manuel et pendant 48h.

#### **Mode opératoire :**

Les extraits éthanoliques de lichens ont été préparés comme décrit par (**Aoussar et al., 2021**). Environ 10 g de poudre de lichen ont été soumis à une extraction avec 100 ml d'éthanol (96%) pendant 48 h à température ambiante, puis les extraits ont été filtrés (papier filtre) et concentrés en évaporant le solvant à travers un évaporateur rotatif à 78 °C. Les extraits éthanoliques obtenus ont été stockés dans un réfrigérateur jusqu'à l'analyse (détermination de l'activité antibactérienne).

### **II.2. Extrait aqueux :**

Pour apprécier le contenu en métabolites secondaires d'espèce de lichen, une extraction par macération a été réalisée dont son principe consiste à faire imprégner une quantité de poudre de lichens dans un volume du solvant (eau distillé) sous agitation manuel et pendant 48h.

#### **Mode opératoire :**

Environ 10 g de poudre de lichen ont été soumis à une extraction avec 100 ml de l'eau distillé pendant 48 h à température ambiante, puis les extraits ont été filtrés (papier filtre). Les extraits

aqueux obtenus ont été stockés dans un réfrigérateur jusqu'aux analyses (l'activité antibactérienne et antioxydante)

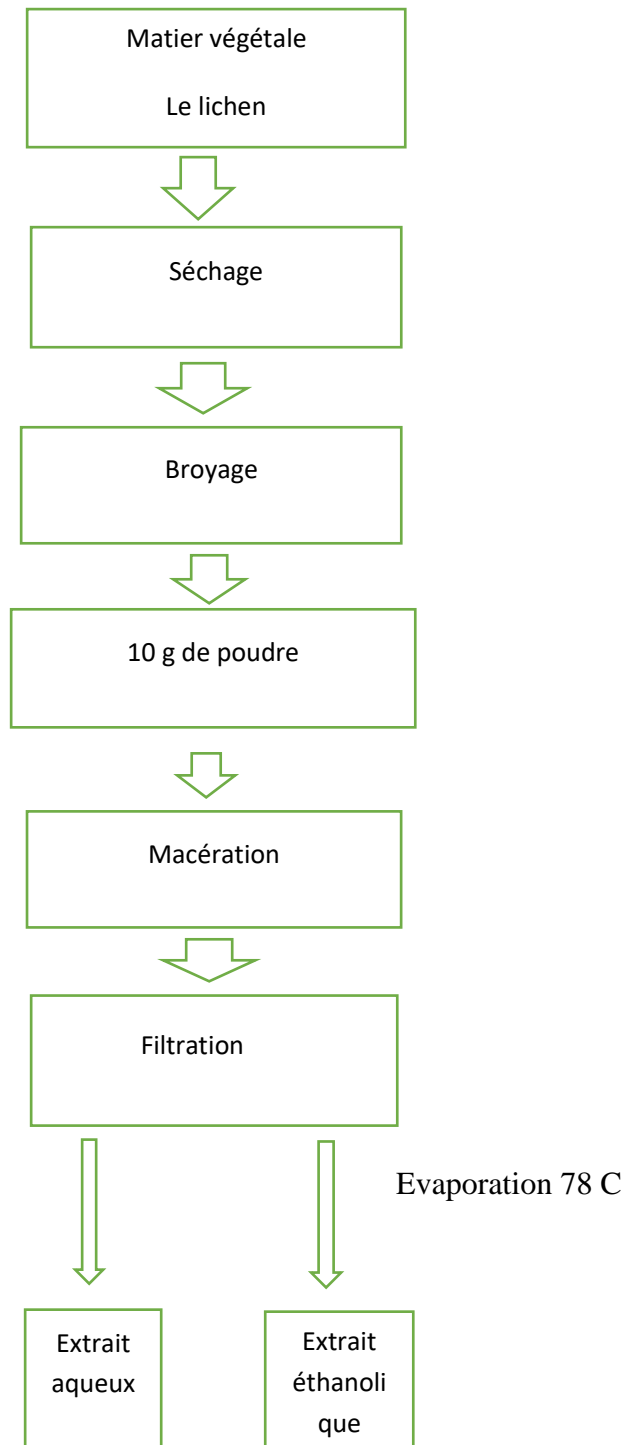


Figure 14 : schème générale de l'extraction des métabolites secondaires

### III. Activité antibactérienne :

Les activités antibactériennes des différentes molécules testées varient en fonction des solvants utilisés pour les extractions ainsi que des bactéries testées et notamment de la composition de leur membrane. Les bactéries à Gram positif sont généralement plus sensibles à l'activité antibiotique des métabolites lichéniques que les bactéries à Gram négatif. (**Burkholder et al., 1944**)

**Les souches bactériennes testées :** on a obtenu au niveau de laboratoire médicale Houtti

•***Escherichia coli*** : C'est une bactérie à Gram négatif, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles.

•***Pseudomonas aeruginosa*** : Ce sont des bacilles à Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à 1 à 2 flagelles

•***Staphylococcus aureus*** : est une espèce à Gram positif et non mobile, non sporulé. Il se développe rapidement et abondamment dans des conditions aérobies.

•***Enterococcus faecalis*** : c'est une bactérie gram positif, de forme des chainettes, de type aéro anaérobie.

•***Klebsiella pneumonia*** : ce sont des bactérie gram négatif n forme bâtonnet, non mobiles et généralement encapsulée.

#### III.1. Principe :

La méthode de diffusion, est exclusivement réalisée sur un milieu solide, consiste à déposer un disque de papier absorbant préalablement imprégné de l'échantillon sur une gélose ensemencée avec l'inoculum microbien. Les molécules actives diffusent à partir des disques et la présence d'une zone d'inhibition, dans laquelle il n'y a pas eu de croissance, indique la présence de molécules actives à l'égard du micro-organisme testé. (**Burkholder et al., 1944**)

#### Mode opératoire :

Actuellement, cette méthode est la plus connue et la plus utilisée, elle consiste en l'ensemencement sur un milieu gélosé ( dans chaque boîte 25ml de MH) dans une boîte de Pétri, d'une suspension bactérienne. La substance à tester est ensuite imprégnée sur un disque de cellulose, lui-même déposé sur la boîte de Pétri. Durant l'incubation, la substance est alors

censée diffuser dans la gélose (à la surface et/ou dans la masse) ce qui crée un gradient de concentration dépendant de la substance. (Stéphane et al., 2015)

**Extrait éthanolique :**

- [1] 10 µl
- [2] 15 µl
- [3] 20 µl
- [4] 25 µl

**Extrait aqueux :**

- [1] 15 µl
- [2] 30 µl
- [3] 40 µl
- [4] 50 µl

**Dosage du pouvoir réducteur « FRAP »**

**•Principe**

Le principe de la méthode FRAP est basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe<sup>3+</sup>) en ion ferreux (Fe<sup>2+</sup>). Afin d'évaluer le pouvoir réducteur des composés testés. La présence des réducteurs (AH) dans les extraits des plantes ou des lichens provoque la réduction de Fe<sup>3+</sup>/complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le Fe<sup>2+</sup> peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 593 nm (Chung et al., 2002). Ce système FeCl<sub>3</sub>/K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi-quantitative » des concentrations des antioxydants, qui participent à la réaction redox (Amarowicz et al., 2004).

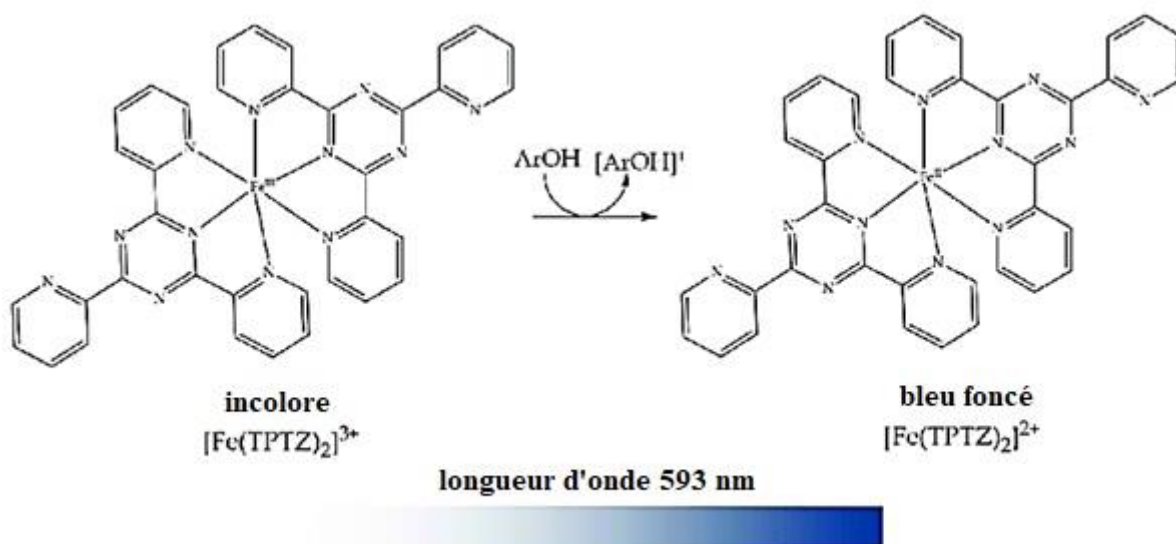


FIGURE 15 : MECANISME REACTIONNEL INTERVENANT LORS DU TEST FRAP (SADEER ET AL., 2020)

**•Mode opératoire :**

Le protocole utilisé au laboratoire est basé sur celui décrit par Oyaizu, (1986).

Dans un tube à essai en verre :

- 200 µl de solution d'échantillon à différentes concentrations (selon le tableau ..)
- 500 µl de tampon phosphate (0,2M : pH 7,2)
- 500 µl de potassium hexacyanoferrate [K<sub>3</sub>Fe (CN) 6] 1% dans l'eau distillée.
- L'ensemble est chauffé à 50°C au bain marie pendant 20 minutes.
- Après un volume de 500 µl d'acide trichloracétique (10%) est ensuite ajouté.
- Le mélange est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes
- Un aliquote de 500 µL de surnageant est transféré dans un autre tube auquel ont été ajoutés 500 µl d'eau distillée et 100 µl de FeCl<sub>3</sub> 1% fraîchement préparé dans de l'eau distillée.

Un blanc sans échantillon est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par méthanol.

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 593 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

**TABLEAU 2 : LA PREPARATION DES DIFFERENTES CONCENTRATIONS DES ECHANTILLON**

<b>Éthanol / Eau distillé (µl)</b>	<b>Extrait (µl)</b>
50	250
150	150
100	200
200	100

**Résultat de rendement totale de l'extraction REt :**

Le rendement de l'extraction éthanolique est exprimé en pourcentage (%), il est calculé à partir du poids du résidu sec obtenu après évaporation sous vide et la prise d'essai initiale (10g)

$$REt = \frac{\text{masse de la matière sèche (extrait)}}{\text{masse de la matière végétale (poudre)}} \times 100$$

$$REt = 14,3\%$$

On enregistre après le calcul un rendement de 14,3% pour l'extraction éthanolique effectuée sur une quantité de matière sèche égale à 10g.

Le rendement d'extraction selon l'étude de Brakni & Ali (2018) était entre 25 % et 30,5 % en utilisant le méthanol, l'acétone, le chloroforme et l'eau distillée comme solvants, ces résultats sont nettement supérieurs aux résultats obtenus dans cette étude.

Une étude de Nugraha *et al.* (2019), sur des espèces de la famille des *Parmeliaceae* dont *Evernia prunastri* fait partie, montre que les rendements de l'extraction des espèces *Parmelia aurulenta* Tuck, *Parmelia caroliniana* Nyl, *Parmelia cetrata* Ach, *Parmelia dilatata* Vain et *Parmelia tinctorum* Nyl varient de 13.93% à 22.25%. Le rendement d'*Evernia prunastri* dans cette étude est dans l'intervalle mentionné.

Une autre étude, celle de Aoussar *et al.* (2021), le rendement de l'extraction d'*Evernia prunasri* isolée et collectée du Maroc, le rendement de l'extraction avec le méthanol était de l'ordre de 9%, qui est plus faible que celui de cette étude. Ces mêmes chercheurs dans une autre étude (Assouar *et al.*, 2017), ont trouvé que *Evernia prunastri* avait un rendement d'extraction égale à 8% pour l'extraction avec le méthanol.

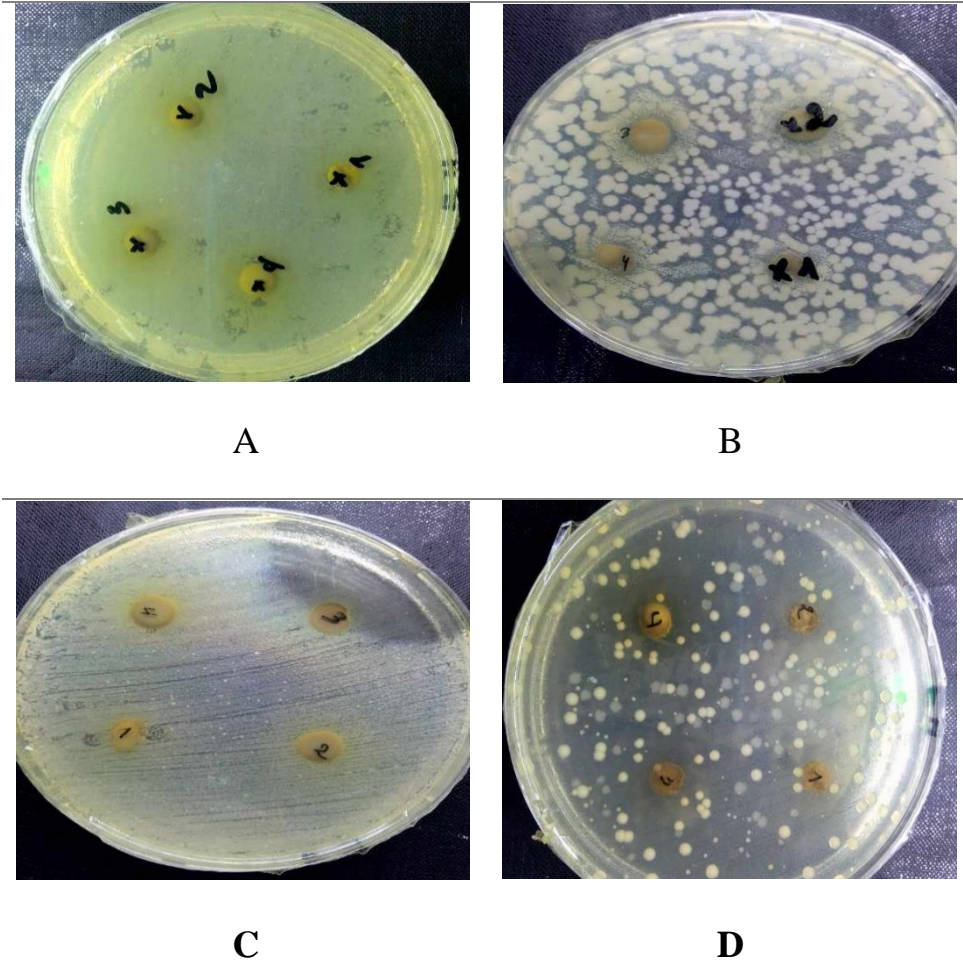
**2. Résultat de l'activité antibactérienne de deux extraits :**

- **Extrait éthanolique :**

Aucune zone d'inhibition autour des disques imprégnés avec l'extrait du lichen vaient constatées pour les espèces *P. aerogenosa* et *K. penumonea*. Alors que pour les souches *E. feacalis*, *E. coli* et *S. aureus*, les zones d'inhibition varient de 0 mm à 16 millimètres de diamètre. La meilleure activité a été obtenue contre la souche de *S. aureus* avec un diamètre de 16 mm.

**Discussion**

L'étude de Douibi *et al.*, (2016) qui a évaluée l'effet an antimicrobien d'*Evernia prunastri* sur différentes espèces bactérienne s'est montrée active contre les souches *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, où les zones d'inhibition varient de 7 à 12 mm de diamètre pour l'extrait pure, il est à signaler que l'extrait a été obtenu par hydrodistillation en utilisant l'appareil Clevenger.





E

**FIGURE 16 :** RESULTAT DU TEST DE SENSIBILITE DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE AUX LES CINQ SOUSHE BACTERIENNES. A (PSEUDOMONAS AERUGINOSA), B (STAPHYLOCOCCUS AUREUS), C (ENTEROCOCCUS FEACALIS), D (KLEBSIELLA PNEUMONEA) , E (ESCHERICHIA COLI)

**TABLEAU 3 : EFFET DU L'EXTRAITS ETHANOLIQUE SUR LES SOUCHES BACTERIENNES**

Souches bactériennes	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. feacalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
Effet	Faible	Fort	Modéré	Faible	Faible

Diamètre de la zone  $\leq 10$  mm : effet faible; 10–15 mm modéré ;  $\geq 15$  mm fort .

Contrairement aux résultats obtenu, selon l'étude de Aslan (2006), l'extrait éthanolique n'avait aucun effet inhibiteur sur les souches (*Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) mais Il avait un effet sur la bactérie (*Escherichia coli*) par contre dans notre étude l'effet sur *P.aeruginosa* était faible.

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

- **Extrait aqueux :**

Aucune zone d'inhibition au tour des disques imprégnés de l'extrait de lichen sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. feacalis* et *K. pneumoniae*.

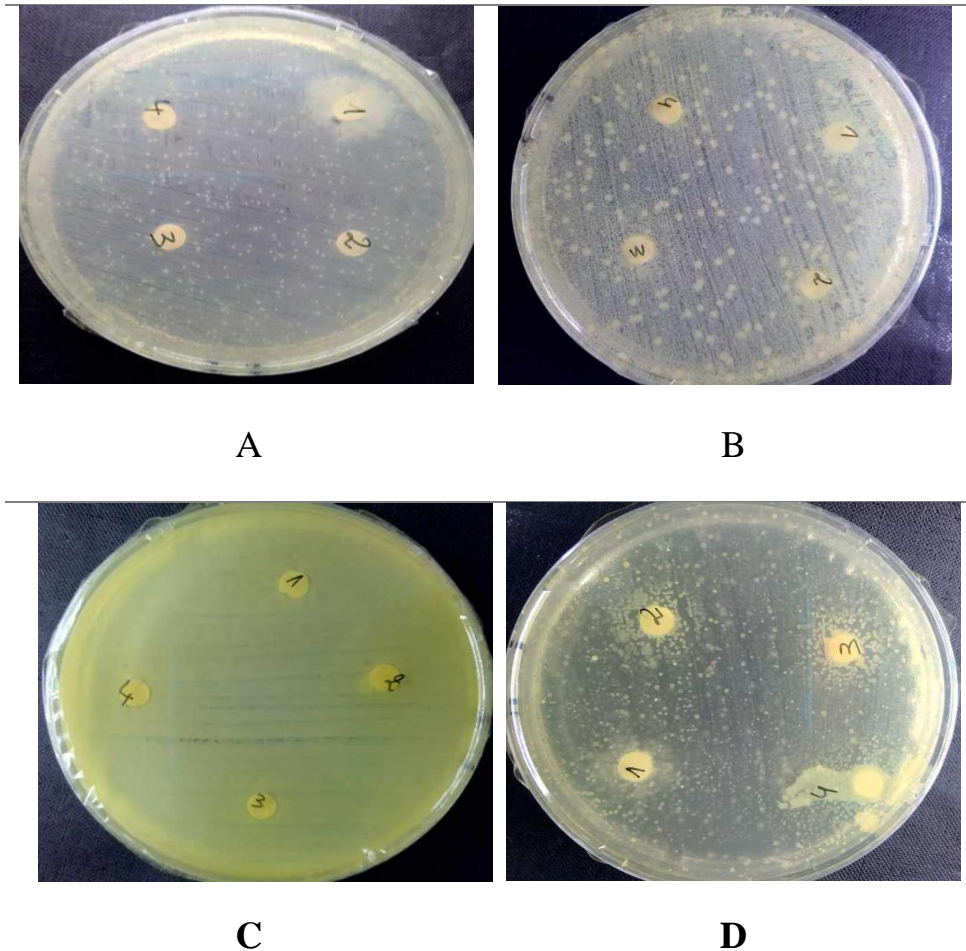
L'étude de Brakni & Ali Ahmed (2018), a constaté l'inefficacité de l'extrait aqueux contre les souches bactériennes testées à savoir *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus*

**Discussion**

*mirabilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, ce qui est similaire à celui de la présente étude et à celui de l'étude de Naama *et al.* (2023).

Une autre étude qui est celle de Tas *et al.* (2019), qui a évaluée l'activité antibactérienne de plusieurs espèces lichénique incluant *Evernia prunastri* et en utilisant 3 solvants pour l'extraction, à savoir l'acétone, le méthanol et l'eau distillée. L'extrait aqueux n'avait aucun effet antibactérien sur les souches testés Gram(-) (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* and *Yersinia ruckeri*) et Gram (+) (*Enterococcus faecalis*, *Lactococcus garvieae* and *Streptococcus agalactiae*).

L'éthanol est le meilleur solvant en comparaison avec l'eau distillée pour extraire les antibactériennes (Snn *et al.*, 2007).





E

FIGURE 17: RESULTAT DU TEST DE SENSIBILITE DE L'EXTRAIT AQUEU SUR LES CINQ SOUSHES BACTERIENNES A (PSEUDOMONAS AERUGENOSA) B (STAPHYLOCOCCUS AUREUS), C (ENTEROCOCCUS FEACALIS), D (KLEBSIELLA PNEUMONEA), E (ESCHERICHIA COLI)

**Tableau 4 :** Effet du l'extrait aqueux sur les souches bactériennes :

Souches bactériennes	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. feacalis</i>	<i>K. pneumonea</i>	<i>E. coli</i>
<b>Effet</b>	Faible	Faible	Faible	Faible	Faible

Diamètre de la zone  $\leq 10$  mm : effet faible; 10–15 mm modéré ;  $\geq 15$  mm fort .

## Discussion

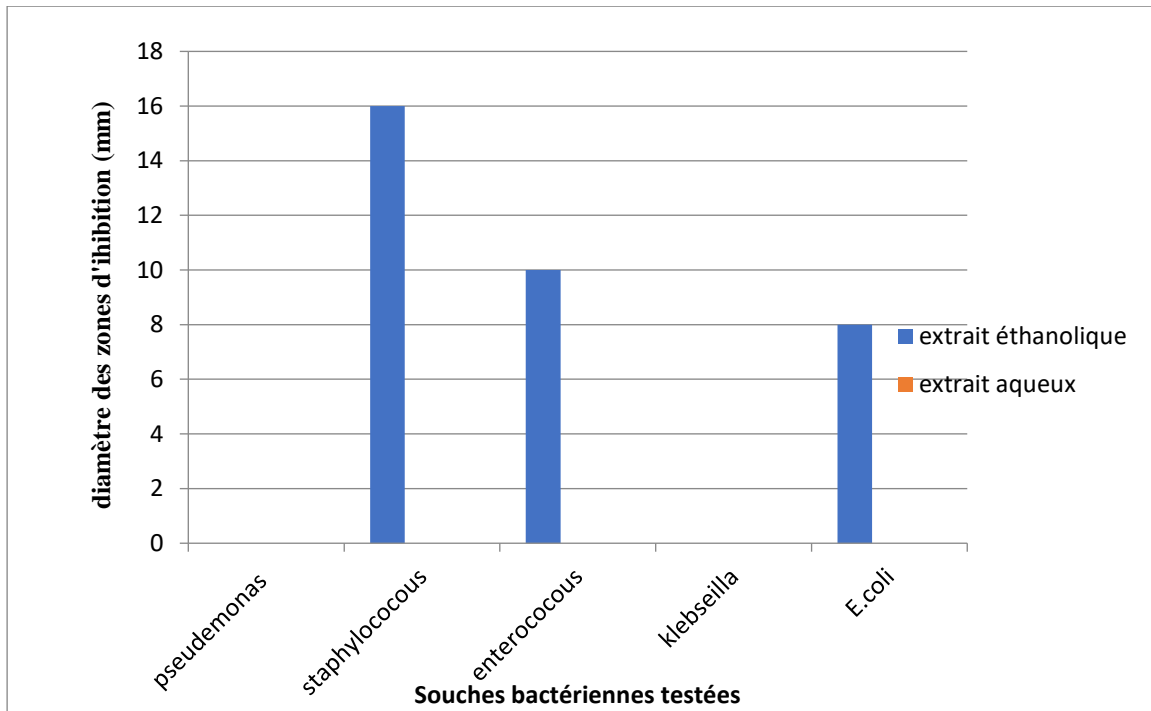
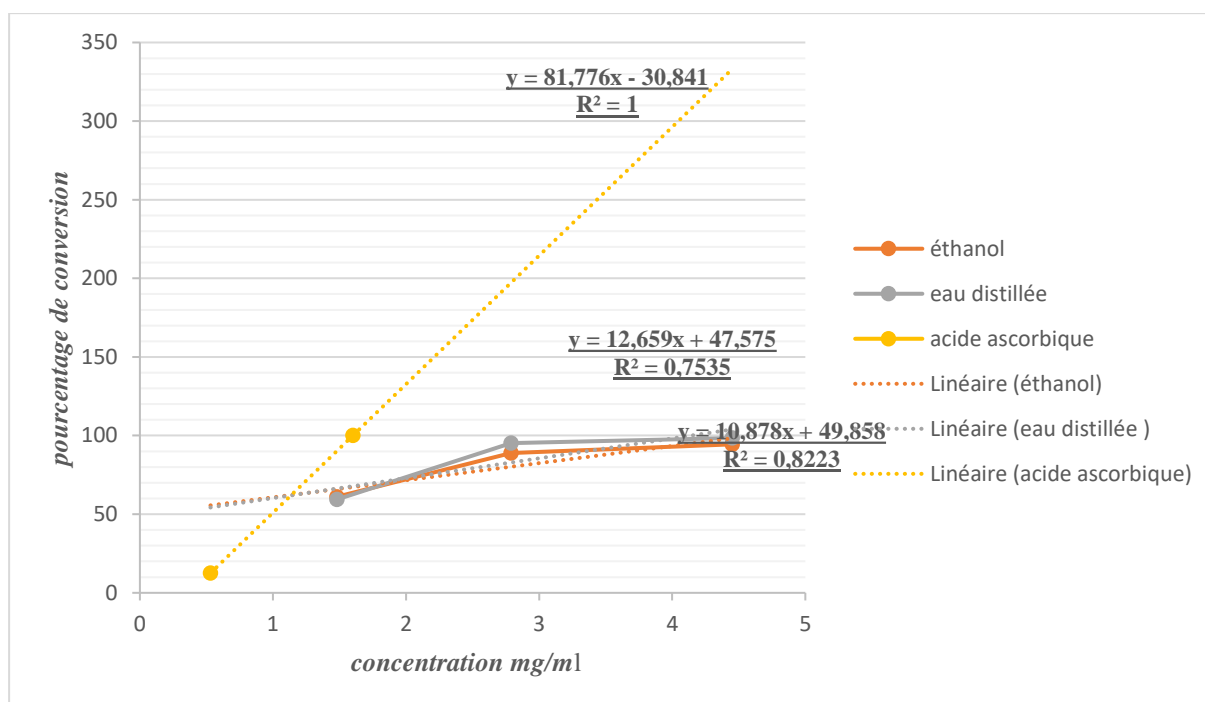


FIGURE 18 : LES EFFETS LES EXTRAIT (DIAMETRE DE LA ZONE D'INHIBITION) SUR LES SOUCHE BACTERIENNE.

### Résultats du pouvoir réducteur (Méthode de FRAP) :

C'est une méthode qui vise à mesurer la capacité des substances des extraits à faire réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$  ; la réduction est l'un des mécanismes antioxydants qu'on trouve chez les plantes (Karagözler *et al.*, 2008) . Le pouvoir réducteur d'un composé peut être un indicateur significatif d'un potentiel antioxydant. La littérature indique une relation directe entre les activités antioxydantes et le pouvoir réducteur des composants naturels des plantes (Bentabet *et al.*, 2014).

Le pouvoir réducteur des extraits du lichen *Evarnia prunastri* est testé à différentes concentrations. Les résultats obtenus des valeurs des absorbances nous ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait avec l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif (figure 19).



**FIGURE 19 : EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS PAR LA METHODE FRAP.**

A partir des résultats ci-dessus, on remarque que le pouvoir réducteur des extraits dépend de la dose, c'est-à-dire que le pouvoir réducteur du fer est proportionnel aux concentrations des d'extraits.

Les résultats montrent que les deux extraits, l'eau distillé et l'éthanol exercent une bonne activité réductrice par rapport à celle de l'extrait méthanolique, mais inférieures à celle du standard (l'acide ascorbique), donc la capacité des extraits à réduire le Fe<sup>+3</sup> est largement inférieure à celle de l'acide ascorbique qui est connu comme un antioxydant de choix.

#### •Calcul de l'IC 50 :

Dans le but de comparer l'activité antioxydant de l'extrait et de l'acide ascorbique, on a introduit le paramètre de IC<sub>50</sub> qui est la concentration du substrat pour laquelle le produit de la réduction donne une absorbance à 593 nm et qui représente la réduction de 50 % du fer. Il est déterminé graphiquement à partir de la droite de la régression linéaire établie entre les absorbances et les différentes concentrations de l'extrait testé et de l'acide ascorbique (figure 19)

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 20 :

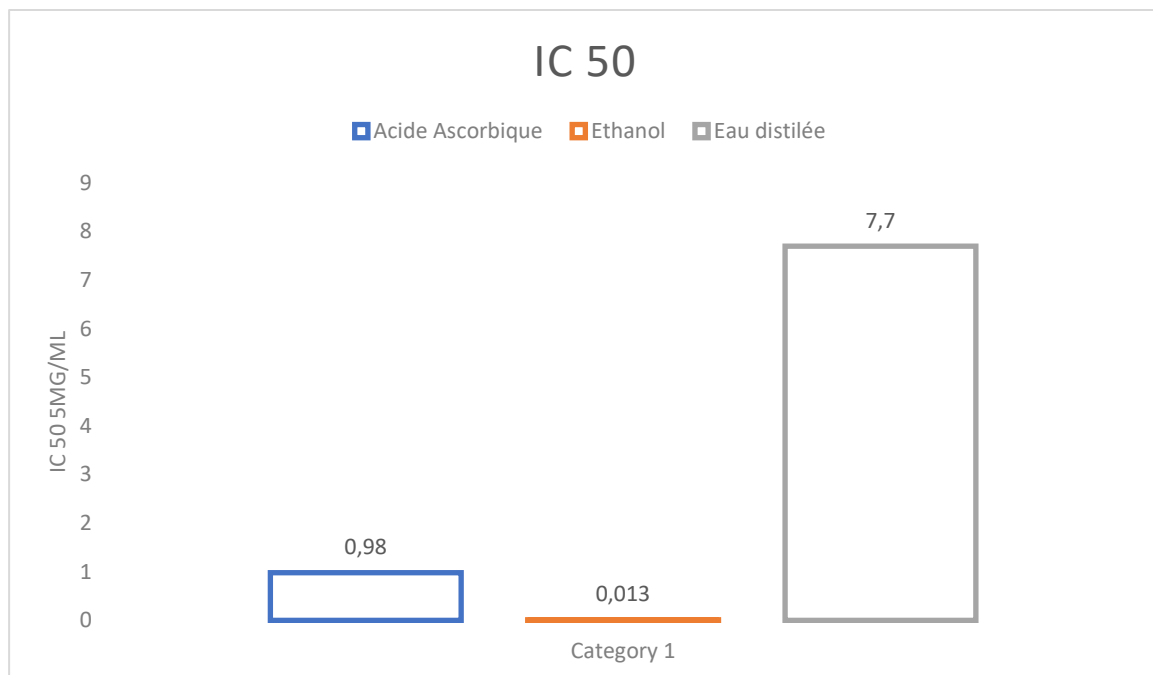


FIGURE 20 : VALEURS DES IC50%.

Les résultats obtenus montrent que le pouvoir réducteur du fer est variable, il est très important pour l'éthanol (0.013mg/ml), suivi par l'acide ascorbique (0.098g/ml), puis l'extrait aqueux (7.70mg/ml).

A l'issue des résultats obtenus on constate la nette puissance réductrice de l'extrait éthanolique par rapport aux témoins et l'extrait aqueux, il présente une importante activité de réduction.

Les propriétés réductrices sont généralement associées à la présence de réducteur dans le milieu réactionnel dont leur action antioxydante est basée sur la rupture de la chaîne des radicaux libres par le don d'un atome d'hydrogène (**Gordon, 1990**).

Le résultat présenté indique ici que la puissance réductrice du fer ferrique marquée l'activité des extraits est due à la présence de polyphénols qui peut agir de la même manière que les réducteurs afin de donner les électrons et convertir radicaux libres en produits plus stables (**Sasikumar et al., 2010**).

D'après plusieurs études sur le genre de "*Parmelia*", comme celles de (**Manojlovic et al., 2012**), (**Sharma et al., 2012**), qui ont montré que les extraits lichéniques de *Parmelia caperata*, sont riches en composés phénoliques, notamment l'acide usnique qui sont responsables de nombreuses activités biologiques *in vitro* ou *in vivo* notamment l'activité antiradicalaire. Il est

*Discussion*

---

possible donc projeter ces résultats sur ce qui a été obtenu en ce qui concerne l'espèce *Evernia prunastri*.

Donc en totale les variations de l'activité réductrice des radicaux libres, sont, en général, directement liées aux taux des composés phénoliques présents dans la plante.

# CONCLUSION

## **Conclusion**

Dans le cadre de la détermination de quelques composés lichéniques à intérêt économiques et écologiques, notre travail a visé l'évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante de l'extrait brut du lichen *Evernia prunastri*.

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

Les résultats obtenus indiquent que les deux extraits possèdent des activités antibactériennes plus au moins prononcées avec une activité plus importante contre *Staphylococcus aureus* et *kleibsiela pneumonea* pour l'extrait éthanolique, alors que l'extrait aqueux n'avait aucun effet antibactérien sur les souches testées.

L'efficacité antioxydante de nos extraits éthanoliques de lichens (*Evernia prunastri*) été déterminée in vitro par la méthode FRAP. Les résultats obtenus montrent que les activités antioxydantes de l'extrait éthanolique du lichen était très importante et nécessite plus d'attention dans le futur.

Il sera souhaitable de diversifier les solvants d'extraction ainsi que les méthodes d'extraction afin de pouvoir valoriser ce lichen d'une manière correcte, identifier les espèces chimiques qui le compose et évaluer d'autres activités qui peuvent être plus intéressantes.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

***Références bibliographiques***

Aslan, A., Güllüce, M., Sökmen, M., Adıgüzel, A., Sahin, F. & Özkan, H. (2006) Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Lichens *Cladonia foliacea.*, *Dermatocarpon miniatum.*, *Everinia divaricata.*, *Evernia prunastri.*, and *Neofuscella pulla.*, *Pharmaceutical Biology*, Vol. 44, No. 4, pp. 247–252.

Alpsoy, L., Orhan, F., Nardemir, G., Agar, G., Gulluce, M., Aslan, A. (2013.) Antigenotoxic potencies of a lichen species, *Evernia prunastri*. *Toxicology and Industrial Health*, 31(2) :1-9.

Naama, A., Aghoutane, B., El Monfalouti, H., Kartah, B.E. (2023), *Ecological Engineering and Environmental Technology* 24(9), 183–190.

Andersson, S.G.E., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C.M., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A., Winkler, H.H., Kurland, C.G. (1998), The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, 396 :133-140p.

Aoussar, N., Manzali, R., Nattah, I., Rhallabi, N., Vasiljevic, P., Bouksaim, M., ... and Mellouki, F. (2017). Chemical composition and antioxidant activity of two lichens species (*Pseudevernia furfuracea* L and *Evernia prunastri* L) collected from Morocco. *JMES*, 8(6), 1968-1976.

Aoussar, N., Achmit, M., Es-sadeqy, Y., Vasiljević, P., Rhallabi, N., Ait-Mhand, R., Zerouali, K., Manojlović, N., & Mellouki, F. (2021), « Phytochemical Constituents, Antioxidant and Antistaphylococcal Activities of *Evernia Prunastri* (L.) Ach., *Pseudevernia Furfuracea* (L.) Zopf. and *Ramalina Farinacea* (L.) Ach. from Morocco ». *Archives of Microbiology* 203, no 6 (août 2021): 2887-94. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02288-5>.

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, Ed. 2011, 227-244.

- Armstrong, R.A., Welch, A.R. (2007), Competition in lichen communities. *Symbiosis*, 43 : 1-12.
- Asplund, J., Wardle, D.A. (2016), How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biological Reviews*, 1-19.
- Bellenfant S., Beguinot J., Vallade J., Sirugue D., Lemmel C., (2010). Le groupe lichen de Bourgonne (GLIB). Les lichens une symbiose exemplaire. *Rev. Sei. Bourgogne-Nature*. 45p.
- Bentabet, N., Boucherit-Otmani, Z., & Boucherit, K. (2014). Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 12(6), 364-371.
- Birch, A. J.; Baldas, J.; Hlubucek, J. R.; Simpson, T. J.; Westerman, P. W. (1976). *Journal of the Chemical Society*, Perkin Transactions 1 1976, 898-904.
- Bossokpi I.P .L., (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Université de Bamako, 133 p.
- Boullard B., (1997). Dictionnaire Plantes et Champignons, ESTEM, Paris. 465p.
- Boullard B.,(2006). Plantes et Arbres : Remarquable des ruex, squares et jardins de Round.PTC. 119p.
- Brakni, R. & Ali Ahmed, M. (2018), Antibacterial Activity of the Chloroform, Acetone, Methanol and queous Extracts of Algerian Lichens, *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 11, No. 2 : 55-67.
- Büdel, B. & Scheidegger, C. (1996), Thallus morphology and anatomy. In Lichen biology, Nash T. H. III, Ed. 1996. Cambridge University Press, Cambridge, pp 37-64.
- Burkholder, P.R., Evans, A.W., Mcveigh, I., Thornton, H.K. (1994). Antibiotic activity of lichens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 30 (9): 250 - 255.
- Burkin A.A., Kononenko G.P., (2011). Mycotoxin contamination of cup moss. *Dokl. Ross. Akad. S.-Kh. Nauk*, N° 2. 54-56p.
- Burkin, A. A., & Kononenko, G. P. (2015). Metabolites of toxigenic fungi in lichens of genera *Alectoria*, *Bryoria*, *Evernia*, *Pseudevernia*, and *Usnea*. *Biology Bulletin*, 42(4), 296-301.

Chahra, D., Ramdani, M., Lograda, T., Chalard, P., & Figueredo, G. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea* from Algeria. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 4(5), 35-42.

Claudia Carpentier., (2016), Investigations phytochimiques de lichens soumis au stress de la nordicité.5-6p.

Collombet, C. (1989). Lichen d'islande et lichen pulmonaire. Thèse de doctorat en science pharmaceutique. Université Joseph Fourier Grenoble I. 120 p.

Coste, C.(2008). Introduction à l'étude des lichens.1-7.

Culberson C.F., Elix J.A., Dey P.M., Harborne J.B., (1989). Lichen substances. In *Methods in Plant Biochemistry, Plant Phenolics*. Academic Press. London. Vol. 1: 509-535.

Culberson, C.F. (1969). Chemical and botanical guide of lichen products. Nouvelle édition. North Carolina : Chapel Hill (NC) : Presses de l'Université de Caroline du Nord. 628p.

Culberson, C. F. (1963). The lichen substances of the genus *Evernia*. *Phytochemistry*, 2(4), 335-340.

Dalbé, Y. (2019). Les lichens, une manne méconnue. *La corne d'abondance*, 35(1) : 9-1.

Dieu Amandine (2015)., Thèse de Doctorat Chimie des Substances Naturelles | Université de Limoges, [pdf]Etude phytochimique de trois lichens & approche synthét.12-18p .

Douibi, C., Ramdani, M., Lograda, T., Pierre, C., Gilles, F. (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea* from Algeria. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research* 4(5):35-42.

Du, J., Cullen, J.J., Buettner, G.R. (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, (2) : 443- 457.

Duncan, K.R., Suzuki, Y.J. (2018). Vitamin E Nicotinate. *Antioxidant*, 7(5): 1-14.

Ekoumou C., (2003). Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie. Bamako. 145p.

- Elix, J. A. (1996). Biochemistry and secondary metabolites. In :LichenBiology. Nash,T.H. Cambridge University Press, Cambridge : 154-180.
- Elix, J. A.; Gaul, K. L.; Sterns, M.; Samsudin, M. W (1987). *Australian Journal of Chemistry*, 10, 1169-1178.
- Gardes, A. M., Bonnefont, R.D., Abedinzadeh, Z., Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, N°270, 91-96.
- Gavériaux J.-P, (2008), - Lexique des principaux termes de lichénologie, Lettres A,B,C, bull. AFL 33-1, 28 p. / lettres D,E, bull. AFL 33-2, 20 p.
- Gómez-Serranillos, M. P., Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E., Divakar, P. K., & Crespo, A. (2014). Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. *Rsc Advances*, 4(103), 59017-59047.
- González-Tejero, M. R., Martínez-Lirola, M. J., Casares-Porcel, M., & Molero-Mesa, J. (1995). Three lichens used in popular medicine in Eastern Andalusia (Spain). *Economic Botany*, 96-98.
- Gordon, M. H. (1990). The Mechanism of Antioxidant Action in Vitro. *Food Antioxidants* 1-18.
- Hassani, L et Djeddi, K (2013), Les lichens de Béjaia : témoins de la qualité de l'environnement.6-7p
- Joël Boustie, Martin Grube, (2005), Lichens: a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2) 273–287p.
- Joulain, D., Tabacchi, R. (2009). Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: oakmoss. *Flavour and fragrance journal*. 24(2) :49-61.
- Karabulut, G. & Ozturk, S. (2015). Antifungal Activity of Evernia Prunastri, Parmelia sulcata, Pseudevernia Furfuracea Var.Furfuracea. *Pakistan Journal of Botany*. 47 (4), 1575 - 1579.
- Karagöz, A.; Doğruöz, N.; Zeybek, Z.; Aslan, A (2009). *Journal of Medicinal Plants Research*, 3 (12), 1034-1039.
- Khebbaz, W. & Gobbi, R. (2014), traçabilité de l'identification des métabolites secondaires végétaux, 5p.

Kolly-Ray, M., Magnin-Gonze, J. (2016). Mousses, lichens et hépatiques du Bois de Versoix. *Bulletin du Cercle vaudois de botanique*, 45: 7-14.

Kosanic, M., Manojlovic, N., Jankovic, S., Stanojkovic, T., Rankovic, B. (2013). Evernia prunastri and Pseudoevernia furfuraceae lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food and Chemical Toxicology*, 53 : 112- 118.

Kosanic, M., Ranković , B., Vukonevic, J. (2010). Antioxidant properties of some lichen species. *Association of Food Scientists & Technologists*, 48 :584-590.

Lackovicova, A., Guttova, A., Bakor, M., Pisut, I. (2013). Response of Evernia prunastri to urban environmental conditions in Central Europe after the decrease of air pollution. *The Lichenologist*, 45 (01): 89-100.

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

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

Loppi, S., Frati, L. (2006). Lichen diversity and lichen transplants as monitors of air pollution in a rural area of central Italy. *Environmental Monitoring and Assessment*, 114 : 361- 375p.

Manojlović, N., Ranković, B., Kosanić, M., Vasiljević, P., and Stanojković, T. (2012). Chemical composition of three Parmelia lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. *Phytomedicine*, 19(13), 1166-1172.

Masters, K. S., & Bräse, S. (2012). Xanthones from fungi, lichens, and bacteria: the natural products and their synthesis. *Chemical reviews*, 112(7), 3717-3776.

Mitrovic, T., Stamenkovic, V., Tomic, S., Stankovic, M., Radojevic, I., Stefanovic, O., Comic, L., Curcic, M., Markovic, S. (2011). Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. *International Journal Of Molecular Sciences*, 12 : 5428-5448.

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

- Molnar, K., Farkas, E. (2010). Résultats actuels sur les activités biologiques des métabolites secondaires du lichen. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 65: 157-173.
- Munzi, S., Pisani, T., Renzi, M., Loppi, S., Paoli, L. (2013). Effect of nitrogen supply on the C/N balance in the lichen *Evernia prunastri* (L.) Ach. *Turkish Journal of Biology*, 37: 165 - 170.
- Murtagh, G. J., Dyer, P. S., & Crittenden, P. D. (2000). Sex and the single lichen. *Nature*, 404(6778), 564-564.
- Nugraha, A. S., Pratoko, D. K., Damayanti, Y. D., Lestari, N. D., Laksono, T. A., Addy, H. S., ... and Wangchuk, P. (2019). Antibacterial and anticancer activities of nine lichens of Indonesian Java Island. *Journal of Biologically Active Products*, 9(1), 39-46.
- packer R., Packer L., Rosen P., Tritschler H.J., King G.L., Azzi A., (2000). Oxidative and antioxidants: The antioxidant Network,  $\alpha$ -lipoic acid, and diabetes. In: *Antioxidants in diabetes management*. INC Marcel Dekker. 110 p.
- Pelouze, J. & Fremy, E. (1854). Picroérythrine. In : *Traité de chimie générale, analytique, industrielle et agricole*. Tome 6. 3ème édition. Paris : Victor Masson Et Fils. p : 193-307.
- Pisoschi, A. M. & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97 : 55-74.
- Podterob, A.P. (2008). Chemical composition of lichen and their medical application. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42 (10) : 582 -588.
- Purvis, O.W. (2014). Adaptation and interaction of saxicolous crustose lichens with metals. *Botanical Studies*. 55(1):1
- Raistrick, H., Robinson, R., & White, D. E. (1936). Studies in the biochemistry of microorganisms: Ravenelin (3-methyl-1: 4: 8-trihydroxyxanthone), a new metabolic product of *Helminthosporium Ravenelii* Curtis and of *H. turcicum* Passerini. *Biochemical Journal*, 30(8), 1303.
- Ramaut, J.L. (1965). Réflexions sur la valeur chimiotaxonomique des substances lichéniques à basses concentrations: le cas de l'acide usnique chez *Evernia prunastri* (L.) ACH. *Phytochemistry*. 4(1) : 199- 202.

- Rankovic B., (2015). Lichen secondary metabolites bioactive properties and pharmaceutical potential. Springer. India 202 p.
- Romagni, J. G. Dayan, F. E. (2002). Advances in Microbial Toxin Research and Its Biotechnological Exploitation R.K. Upadhyay (Ed.), 151-169.
- Saklani, A., & Upreti, D. K. (1992). Folk uses of some lichens in Sikkim. *Journal of ethnopharmacology*, 37(3), 229-233.
- Sasikumar, J. M., Gincy, M. M., and Teepica, P. D. (2010). Comparative studies on antioxidant activity of methanol extract and flavonoid fraction of *Nyctanthes arbortristis* leaves. 9(1), 227-233.
- Seaward, M. R. D., & Edwards, H. G. M. (1997). Biological origin of major chemical disturbances on ecclesiastical architecture studied by Fourier transform Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 28(9), 691-696.
- Sadeer, Nabeelah, Domenico Montesano, Stefania Albrizio, Gokhan Zengin, & Fawzi Mahomoodally (2020) « The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety-Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations ». *Antioxidants* 9 (août 2020): 709.
- Sell Y., Benezra C., Guegin B., (2001). *Plantes et réactions cutanées*. JL. Bruxelles. 42-43p.
- Senol, Z.M., Gul, U.D., Simsek, S. (2019). Assessment Of Pb<sup>2+</sup> Removal capacity Of Lichen (*Evernia prunastrie*) : Application Of Absorption Kinetic, Isotherm Models, and Thermodynamics. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12p.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., and Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, (1), 217037. promising natural antibacterial agent against fish pathogens. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*, 39, 41-48.
- Shukla, V., Joshi, G. P., & Rawat, M. S. M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry reviews*, 9, 303-314.
- Smith, C.W., Aptroot, A., Coppins, B.J., Fletcher, A., Gilbert, O.L., James, P.W., Wolseley, P.A. 2009. The Lichens of Greta Britain and Ireland. *The British Lichen Society*. 1046 p.

Solak, S. (2016). Fatihormanlarının (Şişli, İstanbul) likenleri (Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).74p.

Stocker-Wörgötter E., (2008), Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports*, 25, 188–200p.

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

Tas, I., Yildirim, A., Ozyigitoglu, G. Ü. L. Ş. A. H., Turker, H., & Turker, A. U. (2019). Lichens as a promising natural antibacterial agent against fish pathogens. *Bull. Eur. Assoc. F Karagözler, A. A., Erdag, B., Çalmaz Emek, Y., and Aktas Uygun, D. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from Dorystoechas hastata.* 111(2), 400-407.

Van Haluwyn, C. (1999). Les lichens : des organismes symbiotiques originaux. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 57, No. 6, pp. 448-454). Masson.

Van Haluwyn, C.; Asta, J.; Gavériaux J.-P. (2009), *Guide des lichens de France : lichens des arbres.*, Belin (Ed.) 231 p.

Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S. (2004). The Antioxidants and Pro-Antioxidants Network: An Overvie. *Current Pharmaceutical Design*, 10(14):1677-1694.

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

Yavuz, M., Şobanoğlu, G. (2010). Ethnological uses and etymology of the word Usnea in Ebubekir Razi"s "Liber Almansoris". *Br Lichen Soc Bull.* 106:3–12

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