

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique
Université des Frères MENTOURI Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biochimie/Biologie Cellulaire et Moléculaires



N° ordre:

N° série:

Mémoire de Master

Spécialité : Biochimie/Biochimie appliquée

Par

Boukaaba Karima et Touati Haoua imen

**Etude des caractéristiques phytochimiques de l'extrait
acétonique et méthanolique de lichen récolte de la région de
Constantine**

Soutenu le **01/08/2018** à l'Université Frères Mentouri Constantine 1

Devant le jury :

Président : ELOUAR I.	M.C.A, Université Frères Mentouri Constantine 1
Encadreur : LATRECHE A.	M.C.B, Université Frères Mentouri Constantine 1
Examineur : GHERIB A.	M.C.B, Université D'Alger1

Année Universitaire

2017/2018

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableaux

Les abréviations

Résumé

1. introduction	1
2. Revue bibliographique	3
2.1. Définition	3
2.2. Morphologie	3
2.2.1. Différents types de thalles	3
2.2.2. Structures anatomique	4
2.3. Les relations entre les partenaires	5
2.4. les métabolites des lichens	5
2.4.1. Voies de biogénèse	6
2.4.1.1. Voie de l'acétate polymalonate	6
2.4.1.2. Voie de l'acide mévalonique	9
2.4.1.3. Voie de l'acide shikimique	9
2.5. Utilisation des lichens	11
2.5.1. utilisation des métabolites secondaires lichéniques en médecine et en pharmacie	11
2.5.2. autres utilisations	11
3. matériel et méthodes	12
3.1. récolte des lichens	12
3.2. Extraction par macération	12
3.2.1. Préparation de l'extrait méthanolique	13
3.2.2. Préparation de l'extrait acétonique	15
3.2.3. Paramètres d'évaluation de l'extraction	17
3.3. Analyse par chromatographie sur couche mince CCM	17

3.4. Screening phytochimique des extraits des lichens	18
3.4.1. Test de Liebermann-Büchard	18
3.4.2. Test de mayer	19
3.4.3. Test de chlorure ferrique	19
3.4.4. Dosage des polyphénols totaux	19
3.4.5. Dosage des flavonoïdes totaux	20
3.5. Activité antibactérienne des extraits de lichens récoltés	21
3.5.1. Les souches bactériennes utilisées	21
3.5.2. Matériel utilisé	22
3.5.3. Préparation de la solution mère de l'extrait	22
3.5.4. Préparation des disques	22
3.5.5. Méthode de diffusion en milieu gélosé	22
4. Résultats et interprétation	24
4.1. Résultats d'Extraction	24
4.2. Résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM)	25
4.3. Résultats du screening phytochimique	28
4.3.1. Résultats des tests qualitatifs	29
4.3. 2. Résultats du dosage des polyphénols totaux	29
4.3. 3. Résultat de dosage des flavonoïdes totaux	30
4.4. Résultats de la recherche d'activité antimicrobienne	31

Remerciements

On remercie en premier lieu notre Dieu qui nous a donné la Force, santé et la patience pour terminer ce travail.

On tient à remercier tous les membres du jury de nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

On adresse notre reconnaissance à Mme Latreche, A maître de conférences de classe B qui a dirigé ce travail de nous avoir si bien encadré, orienté et fait bénéficier de ses précieux conseils, sa riche expérience et de ses compétences. Ce fut un immense plaisir de travailler avec vous Docteur.

Nous remercions Melle Elouar Ibtissem, maître de conférence de classe A. de présider notre jury et d'avoir accepté de donner de son temps pour examiner notre mémoire et nous la remercions d'avances pour toutes les remarques et conseils qu'elle nous apporterait

Nous tenons aussi à remercier Mme Gherib Asma, maître de conférence de classe B, d'avoir accepté d'examiner se mémoire et d'être déplacé pour nous faire part de son expérience et ses précieuses critiques.

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble du corps enseignant, depuis l'école primaire aux études supérieures pour toutes les connaissances qu'ils nous ont transmises.

On ne saura oublier tous nos proches qui nous ont soutenus durant ces années.

Un très grand merci à nos parents Merci pour tout, pour le soutien infailible dans les moments les plus compliqués, pour les encouragements depuis toujours, par ce travail, on tient à vous rendre hommage, car vous le mérites.

Au personnel du laboratoire de biochimie et de microbiologie pour leur aide en particulier Mounia, Ammar, Houssin et Nabil

Nos remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicace

Je dédie ce travail : Mes parents

À Ceux qui sont les plus chères au monde, à mon père Ammar que dieu ait pitié de lui, et que j'habiterai au lui paradis, à ma mère Rebiha que dieu protège

En témoignage de nos profondes affectations. Qu'elle sache que ce travail est en partie le fruit de son soutien tous au long mes étude

J'espère qu'elle trouvera dans ce travail toute ma reconnaissance et tout mon amour

À mon source d'amour mon mari : Mustafa

Je vous remercie pour votre patience et votre encouragement tout au long de ce travail

À mon binôme, et amie : Haoua

À mes très chères sœurs pour votre encouragement : Lillia, Souad

À mes très chers frères pour votre efforts pendant m'étude : Billal, Mohamed

À mes belles sœurs : Romaila et chahinaz

À les enfants de mes sœurs : Haidar, Dirar, Adam, Ayoub, Aroua

À les enfants de mon frère : Islam et Siradj

À toutes mes amies d'université : Safia, Houssna, Adra, Manel, Haoua, Bouchra, Assia, Sabrina...

Que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

KARIMA

Dédicace

Je dédie ce travail tout d'abord à mes parents ;

mon père CHERIF , qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

ma mère GHANIA , qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A mes sœurs KARIMA & NAOUEL & mon frère MEHDI et mon beau frère LOTFI Pour tous les bons moments passés ensemble. Pour avoir été toujours présentes à mes côtés quand j'en avais besoin.

A mon neveu WALID et ma nièce ALINE.

A toute ma famille mes grands parent, mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines.

A mes très chères amies SELMA & MERIEM

A mes amies et mes collègues AZA , ADRA ,MANEL, MERIEM & mon binôme KARIMA .

HAOUA IMEN

Liste des figures

Figure 1 : principaux types de thalles rencontrés chez les lichens	4
Figure2 : Échanges nutritionnels entre les partenaires des lichens. (VanHaluwyn <i>et al.</i> , 2009)	5
Figure 3 : structure d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique)	7
Figure 4 : Schéma de biosynthèse de l'acide usnique (adapté de Taguchi <i>et al.</i>, 1966)	7
Figure 5 : Structure de base d'une xanthone(Harck, 2015)	8
Figure 6 : Schéma de biosynthèse proposé pour les chromones (Romagni et Dayan, 2002)	8
Figure 7 : Structure de base des terpénoïdes (AISSOUS, Assia, BECHARA, 2016)	9
Figure 8 : Exemple de structure chimique de coumarine (Lacy <i>et al.</i>, 2004)	10
Figure 9 : Structure chimique de base des flavonoïdes (Krishna <i>et al.</i>, 2001)	10
Figure10 : Séchage et conservation de lichens	12
Figure 11 : étapes de préparation de l'extrait méthanolique	13
Figure 12 : schéma récapitulatif d'extraction par macération méthanolique de la poudre de lichen	14
Figure13 : Étapes de préparation de l'extrait acétonique	15
Figure14 : Schéma récapitulatif d'extraction par macération pour obtenir l'extrait acétonique des lichens	16
Figure 15 : chromatogramme de l'extrait acétonique de lichen récolté avant la révélation (a) et après la révélation (b)	25
Figure16 : chromatogramme de l'extrait méthanolique de lichen récolté avant la révélation (a) et après la révélation (b)	26
Figure 17 : courbe d'étalonnage de l'acide gallique	29
Figure 18 : courbe d'étalonnage de la quercétine	30

Liste des tableaux

Tableau 1 :Résultat du rendement d'extraction par le solvant acétone et méthanol de la poudre de lichen récolté	24
Tableau 2 : les résultats des Rapport frontaux des spots obtenus par CCM des extraits acétonique et méthanolique de lichens	26
Tableau 3 : résultats des tests screening chimique de deux extrait de lichen (acétonique et méthanolique)	28
Tableau 4 :Teneur en phénols totaux dans l'extrait acetonique et methanolique des lichens récoltés	29
Tableau 5 :Teneur en flavonoïdes totaux dans l'extrait acétonique et méthanolique des lichens récoltés	30
Tableau 6 :résultats du test antimicrobien de l'extrait acétoniques et méthanolique par les deux bactéries E.coli et Pseudomonase	31

Liste des abréviations

Ac	Extrait acétonique
AF	acide formique
AlCl ₃	chlorure d'aluminium
CCM	Chromatographie sur couche mince
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
E.colis	Escherichia coli
Ec	<i>Escherichia coli</i>
E	Équivalent
EAg	Equivalent d'acide gallique
EQ	Equivalent de quercétine
FeCl ₃	chlorure ferrique
h	Heure
Meh	Extrait méthanolique
MeOh	méthanol
Min	Minutes
PS	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RE _T	Rendement d'extraction totale
RF.	Rapport frontale
T-	témoin négatif (Disque imprègne d'eau physiologique stérile)
T-1	témoin négatif 1 (Disque imprégné de mélange d'eau physiologique

Résumé

Les lichens, Organismes symbiotiques possèdent différentes activités biologiques grâce à ses divers métabolites secondaires. Notre objectif est de caractériser et de détecter la présence des produits naturels. **Méthodologie** : on a procédé à une extraction par macération, analyse par CCM, tests phytochimiques (qualitatifs et quantitatifs) et évaluation de l'activité antimicrobienne sur deux souches de bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*. **Résultats** : le rendement d'extraction est plus élevé avec le solvant méthanol (6,5) ; la CCM révèle divers spots variant entre cinq et six selon leur Rf et couleurs ; Les tests phytochimiques qualitatifs mettent en évidence la présence de stérols et les polyterpènes, les tanins et les polyphénols et l'absence des alcaloïdes, Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin ciocalteu donne (2,147 mgEAg/g) pour l'extrait acétonique et (3,533 mgEAg/g) pour l'extrait méthanolique et la teneur des flavonoïdes totaux est de (8,347 mgEQ/g) pour l'extrait acétonique et (11,023 mgEQ/g) pour l'extrait méthanolique .Aucune activité anti-microbiennes enregistrée sur les deux souches testées. **Conclusion** : le lichen récolté semblerait être un lichen riche en métabolites très divers et à intérêt prometteurs.

Les mots clés

Lichens, métabolites secondaires, activité anti microbienne, extraction par macération, teneur en polyphénol totaux, teneur en flavonoïde totaux

Abstract

Lichens, symbiotic organisms possess different biological activities thanks to its various secondary metabolites. Our goal is to characterize and detect the presence of natural products. **Methodology:** maceration extraction, TLC analysis, phytochemical (qualitative and quantitative) assays, and antimicrobial activity evaluation were performed on two strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **Results:** the extraction yield is higher with the solvent methanol (6.5); the CCM reveals various spots varying between five and six according to their R_f and colors; Qualitative phytochemical tests highlight the presence of sterols and polyterpenes, tannins and polyphenols and the absence of alkaloids, Determination of total polyphenols by the method of Folin ciocalteu gives (2.147 mgEAg/g) for the acetone extract and (3.533 mgEAg/g) for methanolic extract and the content of total flavonoids is (8.347 mgEQ/g) for the acetone extract and (11.023 mgEQ/g) for the methanolic extract No anti-microbial activity recorded on the two strains tested. **Conclusion:** lichen appears to be a lichen rich in a variety of metabolites of promising interes

ملخص

الأشنة هي كائنات حية تكافلية لها أنشطة بيولوجية مختلفة وذلك من خلال إنتاجها للأيضات الثانوية، هدفنا هو توصيف واكتشاف وجود المنتجات الطبيعية. المنهجية: شرعنا في الاستخراج عن طريق النقع، تحليل ccm، اختبارات المواد الكيميائية النباتية النوعية والكمية وتقييم النشاط البكتيري لنوعين من البكتيريا الزائفة الزنجارية والقولونية

النتائج : كفاءة الاستخراج أعلى مع مذيب الميثانول 6،5 يكشف ccm عن بقع مختلفة تتراوح بين خمسة وستة ألوان وفقا للألوان ونسبة الحدود ، اختبارات الكيميائي النباتي النوعية تكشف عن وجود الجامدة ، polyterpènes ، والعفص والبوليفينول وغياب فلويدات ، تحديد إجمالي البوليفينول التي كتبها فولين cicalteu يعطي mgEAg/g 2،147 لمستخلص الأسيون و mgEAg/g 3،533 لمستخلص الميثانول والمحتوى من إجمالي الفلافونويدات 8،387 mgEQ/g لمستخلص الأسيون و 11،023 mgEQ/g لمستخلص الميثانول ، عدم وجود نشاط مضاد البكتيريا المسجلة على كل من السلالات المختبرة. الخلاصة: يبدو أن الأشنة المدروسة أشنة غنية بنواتجها الثانوية المختلفة وذات أهمية واعدة .

Introduction

Introduction générale

L'introduction des antibiotiques en thérapeutique a révolutionné le traitement des maladies infectieuses car ils ont permis de sauver de nombreuses vies. Malheureusement, depuis ces trente dernières années, l'antibiorésistance est apparue et elle est devenue la préoccupation majeure de bon nombre de cliniciens (**Aboya., 2013 ; INSPQ., 2015**).

La diminution de l'efficacité des antibiotiques actuels et des médicaments anticancéreux, la recherche de nouveaux médicaments est toujours un objectif prioritaire pour lutter contre les infections bactériennes et le cancer. De plus, l'émergence de nouveaux pathogènes augmente les besoins de trouver de nouveaux composés bioactifs. (**Silver, 2011**)

La recherche des composés bioactifs naturels (NBCs) avec le potentiel pour le traitement et la prévention des maladies humaines et pour répondre à d'autres besoins est actuellement un sujet principal dans beaucoup de laboratoires et industriel.

De nos jours, les produits naturels sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. Les lichens sont également une source de composés originaux, et plus particulièrement de métabolites secondaires bioactifs. Les civilisations anciennes leurs connaissaient déjà des propriétés remarquables ; plus récemment de nombreuses espèces de lichen font l'objet d'études phyto chimiques approfondies afin de mettre à jour des composés nouveaux, qui pourraient trouver des applications dans des domaines tels que l'industrie pharmaceutique ou encore cosmétique. En effet Parmi eux, l'acide usnique est proposé comme possible alternative aux parabènes. Il possède en effet de nombreuses propriétés biologiques, et notamment une activité antimicrobienne, qui en font un candidat de choix en tant que conservateur.

Lichen sont les organismes uniques, produisant les métabolites biologiquement actifs avec une grande variété d'effets, y compris les activités d'antibiotique, anti mycobacterial, antivirales, anti-inflammatoires, analgésiques, antipyrétiques, anti proliférative et cytotoxiques. Cependant, seulement des nombres très limités de substances de lichen ont été examinés pour leurs activités biologiques et leur potentiel thérapeutique dans la médecine. (**J. Boustie and M. Grube, 2005**).

Introduction générale

Parmi les 1050 substances lichéniques décrites (**Stocker-Wörgötter, 2008**), seules quelques-unes sont disponibles commercialement, et le potentiel d'une grande partie d'entre elles reste peu voire pas étudié. En effet, la principale difficulté est d'extraire et d'isoler ces composés en quantité suffisante, avec une pureté convenable, pour en préciser les structures et en évaluer l'activité biologique (**Muggia et al., 2009**).

Nôtres travail s'inscrit dans le cadre d'extraction adéquat pour optimiser l'isolation des molécules bioactive.

Notre document est partagé en deux partie, la première réunis les généralités sur les lichen et leurs propriétés, la deuxième partie, décrit notre démarche expérimentale qui vise à extraire les composés secondaires de lichens récoltés, au hasard, par l'acétone ensuite procéder a une identification préliminaire morphologique, suivie d'une séparation et purification par CCM, après un éventuel screening phytochimique qualitatifs pour caractériser les extraits de lichens étudiés, enfin on réalise un test biologique par l'évaluation de l'activité antibactériennes des extraits de étudiés.

Revue bibliographique

2.1. Définition

Les lichens résultent de symbiose spécifique entre un mycète (champignon) et une algue (le plus souvent unicellulaire) ou une cyanobactérie, parfois entre les trois. Dans cette symbiose, l'algue unicellulaire et/ou la cyanobactérie fournit au mycète des matières organiques (sucre) issues de sa photosynthèse et, en retour, le mycète protège son partenaire du dessèchement et de prédateurs en l'entourant de son mycélium. Cette symbiose est durable et reproductible et a pour résultat l'apparition de nouvelle espèce. C'est le mycète (90% du lichen) qui permet de caractériser chaque espèce de lichen (20000 espèces répertoriées). (Lydie Suty, 2015)

2.2. Morphologie des lichens

A la différence des plantes supérieures, les lichens ne possèdent ni racine, ni tige, ni feuille mais un appareil végétatif rudimentaire : le thalle (Parrot, 2014).

2. 2. 1. Différents types de thalles

Le mycobionte (champignon) joue le rôle le plus déterminant dans la morphologie et la structure du lichen. Le thalle porte les éléments nécessaires à la reproduction et est caractérisé par une grande diversité de formes et de couleurs qui définit 7 principaux types de lichens :

- Les **thalles gélatineux** : sont noirs et cassants à l'état sec, ont une consistance gélatineuse à l'état humide. (Figure 1a).
- Les **thalles fruticuleux** : sont des thalles en lanières ou tiges plus ou moins ramifiées, dressés ou Vain (figure1b).
- Les **thalles foliacés** : se présentent sous forme de lames ou de feuilles, plus ou moins lobées ou découpées, se détachant facilement du substrat (Figure 1c).
- Les **thalles squamuleux** : se présentent sous forme de petites squamules ou écailles pouvant se chevaucher partiellement (Figure 1d).
- Les **thalles crustacés** : sont les plus communs (90 %). Sous forme de croûte, ils adhèrent au substrat dans lequel ils peuvent pénétrer plus ou moins profondément (Figure 1e).
- Les **thalles lépreux** : ressemblent à de la poudre se détachant facilement du substrat (Figure 1f)
- Les **thalles complexes** : ou thalles composites sont formés d'un thalle primaire plus ou moins foliacé et adhérent au substrat, sur lequel se développe un thalle secondaire dressé plus ou moins ramifié ou en forme de trompette (podétion) (Figure 1g) (Harck, 2015).



(a)

(b)

(c)



(d)

(e)

(f)

(g)

Figure 1 : Principaux types de thalles rencontrés chez les lichens.

- (a) Thalle gélatineux de *Collema auriforme* ; (b) Thalle fruticuleux de *Usnea* sp. ;
(c) Thalle foliacé de *Lobaria pulmonaria* ; (d) Thalle squamuleux de *Squamarina cartilaginea* ; (e) Thalle crustacé de *Caloplaca biatorina* (f) Thalle lépreux de *Chrysothrix chlorina* ; (g) Thalle complexe de *Stereocaulon corticatulum*

2.2.2. Structures anatomiques

Contrairement à leur morphologie qui peut être variée, la structure des lichens est relativement homogène et assure leur unité. On en distingue tout de même deux types :

- **Structure de type homéomère** : champignons et algues ou cyanobactéries sont entremêlés de façon homogène.
- **Structure de type hétéromère** : on observe une disposition par couches. La structure est donc stratifiée et on observe de la face supérieure à la face inférieure :
 - Un cortex supérieur formé par des cellules jointives de champignons
 - Une couche algale, mélange d'algues et de champignons lichéniques telles que pour

Cladonia rangiferina (Parrot, 2014).

2.3. Les relations entre les deux partenaires

Les lichens sont donc des organismes symbiotiques associant un champignon (mycosymbiote) et au moins un photosymbiote (algue). Le premier assure la protection physique à l'ensemble, tandis que le second par la photosynthèse apporte la matière organique carbonée et fait du lichen un organisme autotrophe. Les algues vertes fabriquent de nombreuses substances nécessaires au champignon, notamment de la vitamine B et des polyols, substances dérivées des sucres. Chez les cyanobactéries, le carbone fixé est plutôt cédé au champignon sous forme de glucose. Polyols et glucose sont ensuite transformés par le champignon en polysaccharides et toute une série de métabolites secondaires. Les cyanobactéries sont aussi capables de fixer l'azote atmosphérique, cédé au champignon sous forme d'ammonium (**Van-Haluwyn, Asta et al. 2009**).

De son côté, le champignon a un rôle de fixation sur le substrat grâce aux rhizines, et un rôle de protection. Il fournit au photosymbiote l'eau et les sels minéraux, des vitamines comme la vitamine C. De plus dans certains cas, il peut vivre en saprophyte en extrayant du milieu des substances organiques, ou en parasite sur un autre lichen. (**Van-Haluwyn, Asta et al., 2009**) (**Figure 2**).

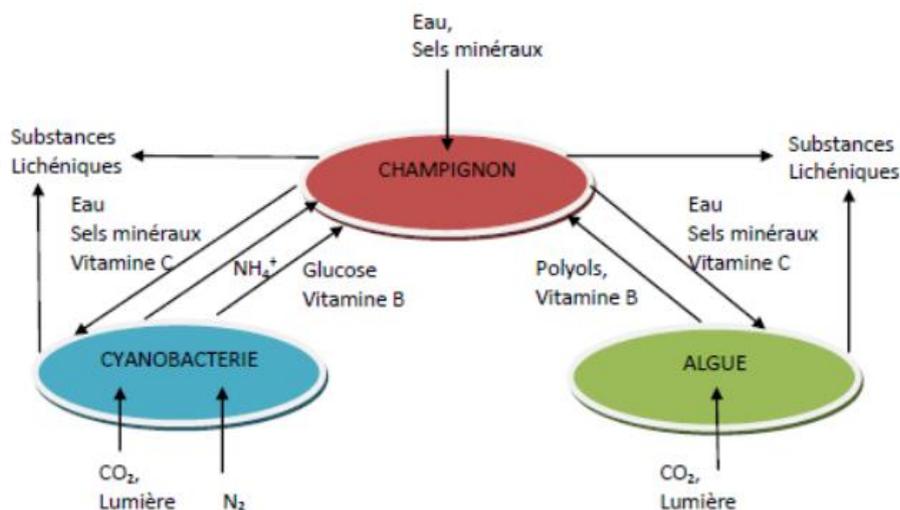


Figure 2 : Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens (d'après **Van-Haluwyn, astra et al.2009**)

2.4. Métabolites des lichens

Il existe deux grands groupes de métabolites : les métabolites primaires (indispensables au développement et à la reproduction de l'organisme) et les métabolites spécialisés (non essentiels à la croissance mais ayant un rôle dans la fonction écologique). Ces composés, en particulier les métabolites spécialisés résultent de différentes voies de biogenèse et présentent des structures spécifiques par rapport à celles observées chez les champignons ou chez les plantes (Parrot, 2014).

2.4.1. Voies de biogenèse des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires lichéniques peuvent être obtenus *via* trois voies de biogenèse proposées dans la littérature : la majorité de ces composés est dérivée de la voie de l'acétate polymalonate ou polycétide synthase ; les autres métabolites secondaires sont issus des voies de l'acide shikimique et de l'acide mévalonique (Stocker-Wörgötter *et al.*, 2013).

2.4.1.1. Voie de l'acétate polymalonate

La voie de l'acétate polymalonate conduit à la synthèse des depsides, depsidones, depsones, dibenzofuranes, anthraquinones, xanthones, chromones, acides aliphatiques et dérivés de l'acide orsellinique.

❖ 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 (Mohamed *et al.*, 2015).

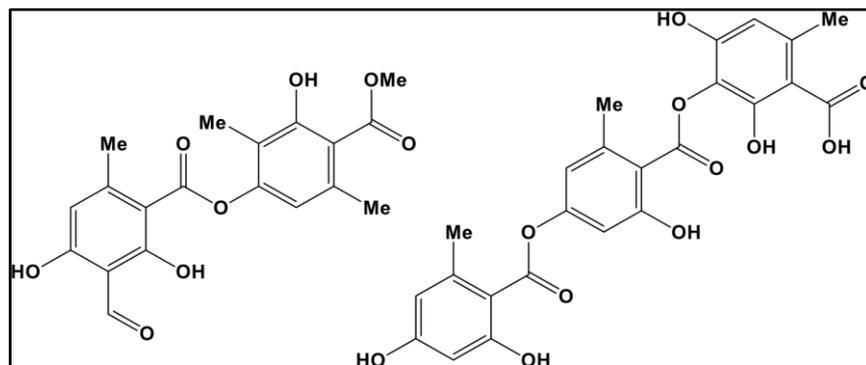


Figure 3 : structure d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique) (Mohamed *et al.*, 2015).

❖ L'acide usnique :

Les produits des lichens les plus connus sont les acides usniques ils sont des pigments jaunes produisent dans le cortex supérieur de nombreuses espèces provenant de la famille phylogénétiquement séparées ces pigments ne sont connus que chez les lichens. Les acides usniques semblent donc être parmi les composés les plus caractéristiques des lichens, ils ne sont apparemment pas synthétisés dans les cultures des composants fongiques isolés et sont formés par des réactions unissant deux ou trois unités phénolique (Ranković, 2015).

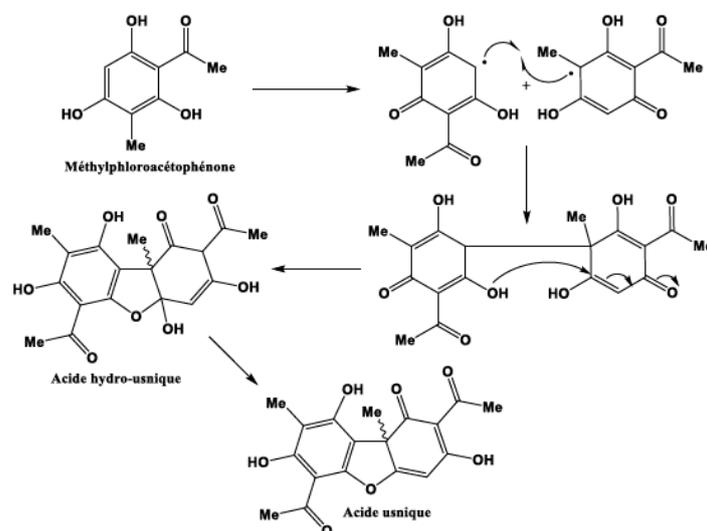


Figure 4 : Schéma de biosynthèse de l'acide usnique (adapté de Taguchi *et al.*, 1966).

❖ Les xanthones

Les xanthones sont connues dans les champignons à vie libre, et des études récentes indiquent qu'elles sont assez communes dans les lichens aussi. Contrairement aux xanthones fongiques, de nombreux lichen xanthones ont un ou plusieurs substituants chlorés nucléaires. La structure fondamentale des xanthones lichen connues pourraient être dérivées directement par condensation linéaire de sept unités d'acétate et de malonate avec une cyclisation de type acide orsellinique (Ranković, 2015).

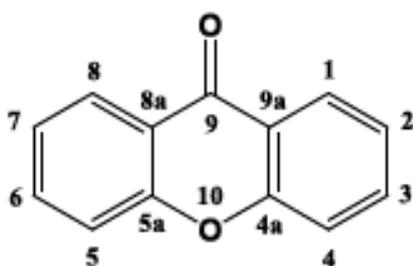


Figure 5 : Structure de base d'une xanthone (Harck, 2015)

❖ Les chromones

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

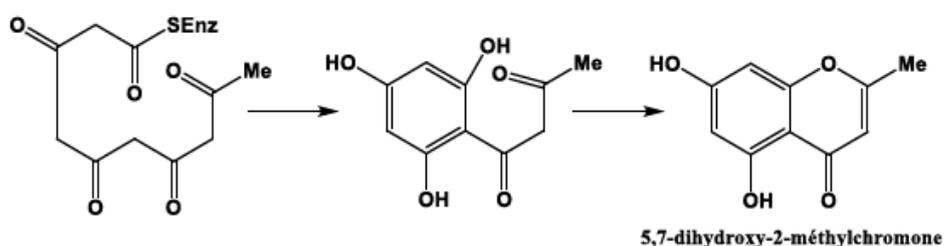


Figure 6 : Schéma de biosynthèse proposé pour les chromones (Romagni et Dayan, 2002).

2.4.1.2. Voie de l'acide mévalonique

La voie de l'acide mévalonique conduit essentiellement à la synthèse de mono-, di-, tris ester et ses quiterpènes, stéroïdes et caroténoïdes (**Huneck, 1999**). Pour la plupart, ils ne sont pas spécifiques des lichens.

L'isopentenylpyrophosphate (unité en C5), obtenu à partir de l'acide mévalonique, conduit soit au géranylgeranylpyrophosphate (unité en C20), précurseur des diterpènes et des caroténoïdes, soit aux sesterterpènes (unités en C25), soit au squalène (unité en C30), précurseur des stéroïdes et des triterpènes. (**Ismed, 2012**).

❖ Les terpènes

Ce sont des substances du métabolisme secondaire qui dérivent des Isoprénoides dont certains interviennent dans la photosynthèse, ainsi que plusieurs hormones végétales sont de structure Terpénique. Ce sont des produits hydrocarbonés naturels, de structure soit cyclique soit à chaînes ouverte formées de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta-carbonées ramifiées dérivées du 2-Méthyle butadiène, appelées unités isopréniques (**Hopkins, 2003**).

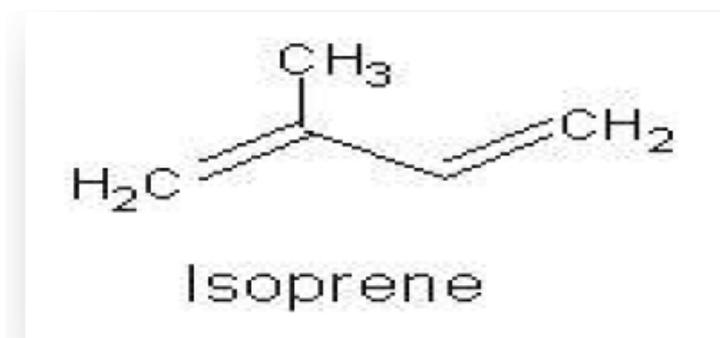


Figure 7 : Structure de base des terpénoïdes (**AISSOUS, Assia, BECHARA, 2016**)

2.4.1.3. Voie de l'acide shikimique

Cette voie permet la synthèse d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) qui, chez les plantes, sont les précurseurs des flavonoïdes, des coumarines, ou encore des alcaloïdes. (**Stocker- Wörgötter, 2008**).

❖ Coumarines C6-C3

Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ils ont été isolés pour la première fois par Vogel en 1820 dans le *Coumarouna odorata* (Lacy et al., 2004). Ce sont des composés phénoliques cyclisés qui dérivent des acides t-cinnamique et p-coumarique pour la majorité d'entre eux.

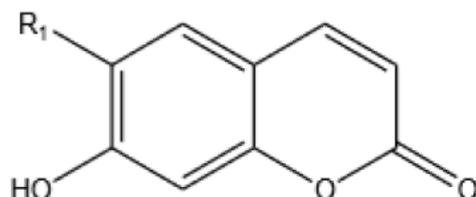


Figure 8 : Exemple de structure chimique de coumarine (Lacy et al., 2004).

❖ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe de plus de 6000 composés naturels, qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires. Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange, et rouge de différents organes végétaux (Ghedira, 2005).

La structure de base des flavonoïdes est le noyau du flavone (2-phenyl-benzo- γ -pyrane). Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune, et de ce fait, possèdent le même élément structural de base, à savoir l'enchaînement phenyl-2 chromane. (Figure 12) Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon le degré d'oxydation de noyau pyranique central (Krishna et al., 2001).

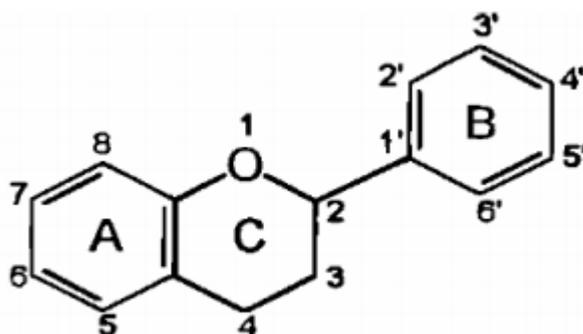


Figure 9 : Structure chimique de base des flavonoïdes (Krishna et al., 2001).

2.5. L'utilisation des lichens

2.5.1. Utilisation des métabolites secondaires lichéniques en médecine et en pharmacie

Les métabolites secondaires des lichens présentent des propriétés antimicrobiennes, anti oxydantes, anti-inflammatoires, cytotoxiques, analgésiques, antipyrétiques et antivirales et pourraient constituer des sources potentielles de produits chimiques utiles sur le plan pharmaceutique. Quelques exemples sont décrits ci-dessous :

Les depsidones, les acides physodique et physodalique, empêchent la formation de métabolites réactifs en bloquant les systèmes d'oxydation présent dans la fraction microsomale hépatique (**Osawa et al., 1991**).

L'acide ursolique a inhibé la croissance des cellules de carcinome épidermoïde humain en influant sur l'activité de la tyrosine kinase (**Hollosoy et al., 2000**). L'utilisation de l'acide ursolique pour la fabrication d'un agent cancéreux pour supprimer les métastases a été brevetée (**Ishikawa et al., 1997**).

L'acide usnique est le métabolite secondaire des lichens le plus étudié. La molécule possède une forte activité antimicrobienne et ces effets antimitotiques sont bien connus sur des cellules tumorales humaines.

2.5.2. Autres utilisations

De nos jours, les lichens sont très recherchés dans la parfumerie pour la fabrication d'essences concrètes. Ils possèdent une odeur fraîche de verdure et sont couramment employés dans la composition de parfums genre fougère, Chypre et de fantaisie, lesquels sont utilisés dans des produits cosmétiques comme eau de Cologne, lotion, savon de toilette, détergent ou encore comme fixatif (**Bassin, 1960; Adachi, 1983; Arctander, 1960; D'Astous, 1989**).

Matériel et méthodes

3.1. Récolte des lichens

Les lichens étudiés ont été récoltés des arbres de l'université des frères Mentouri Constantine le 07 mars 2018, ils ont été rincés avec l'eau de robinet, séchés a l'aire libre pendant 48h, broyés et réduits en poudre dans un mortier en verre , la poudre a été conservés dans des boites de pétri (**Figure 10**).



Figure 10 : séchage et conservation de liche

3.2. Extraction par macération

La macération c'est un procédé qui consiste à laisser séjourner un corps solide dans un liquide ou dans un milieu humide, pour extraire certains principes actifs de ce corps.(**larousse,1989**).

Les métabolites secondaires sont des molécules aliphatiques ou aromatiques de faible poids moléculaire présentant un caractère hydrophobe. Lorsqu'ils sont extraits, ils sont donc retrouvés principalement dans les fractions apolaires ou moyennement polaires.

L'extraction des métabolites secondaires est réalisée en tenant compte de La nature du solvant, du temps et de la température d'extraction. L'éther d'éthylique (**Culberson et al.,1982**), le dichlorométhane, le chloroforme (**Carlos et al., 2008 ; Polovinka et al., 2012**) Peuvent être employés.

Nous avons optés pour la méthode d'extraction utilisée est la macération par le méthanol et par l'acétone. En raison de des moyens disponibles.

3.2.1. Préparation de l'extrait Méthanolique :

- 10g de matière végétale sont dissouts dans 100ml de méthanol, le mélange est mis sous agitation magnétique pendant 4h, et laisser toute une nuit à macérer, ensuite le mélange a été filtré.
- 100ml de même solvant d'extraction (MeOh) est rajouté à la matière végétale restante (marc) de la filtration précédente, les mêmes étapes sont effectuées pour la deuxième macération. Le filtrat a été ensuite évaporé à 40°C pendant 10 min a l'aide d'un rota évaporateur.
- L'extrait obtenu est conservé au frais dans un flacon en verre en attendant d'être analysé. (Figure11)



Figure 11: étapes de préparation de l'extrait méthanolique

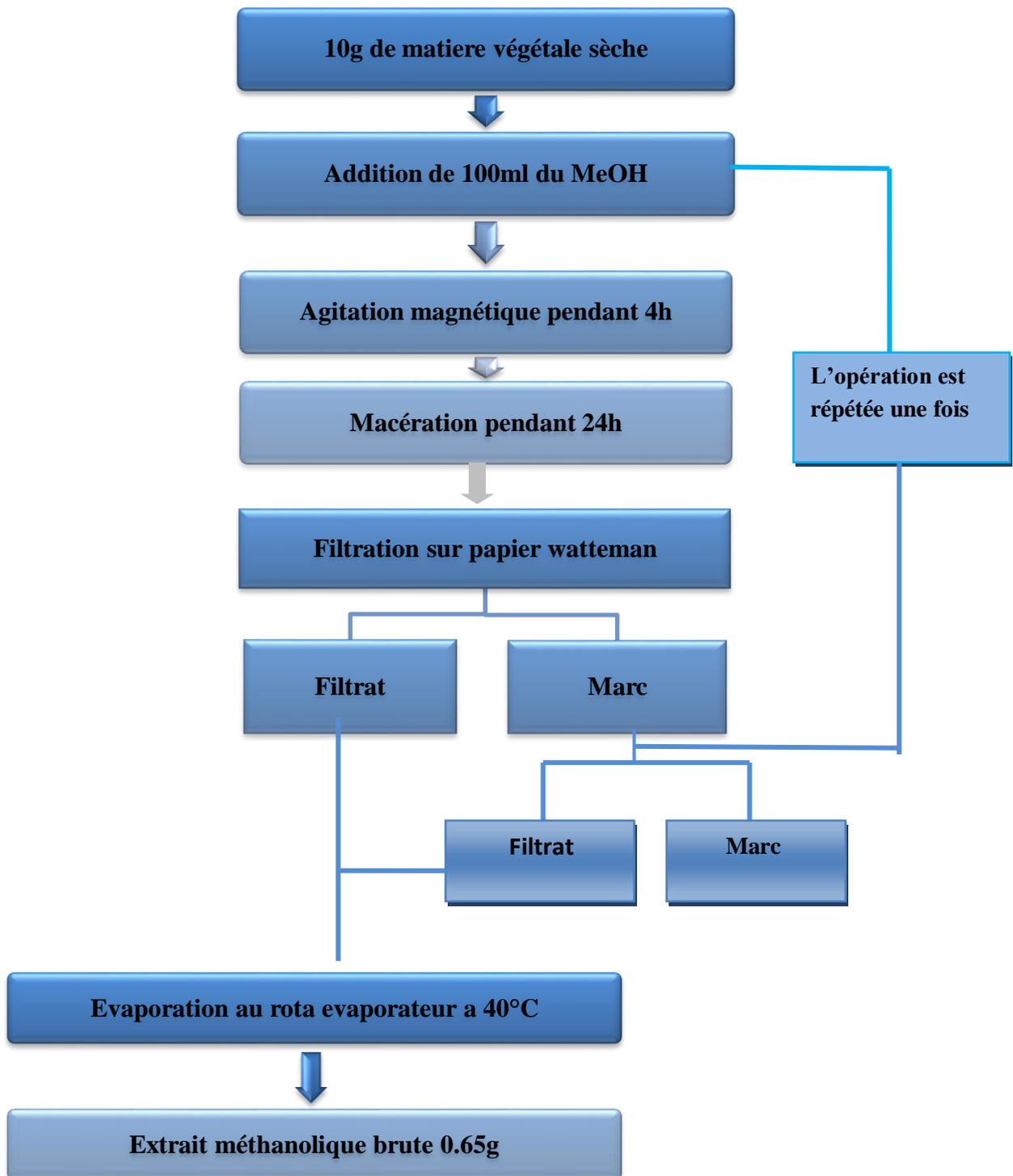


Figure 12 : schéma récapitulatif d'extraction par macération pour obtenir l'extrait méthanolique des lichens

3.2.2. Préparation de l'extrait acétonique

- on a macéré 10g de lichens (poudre) avec 100ml d'acétone,
- agitation magnétique pendant 4h,
- après 24h le mélange a été filtré, on a répété les mêmes étapes en utilisant la matière végétale restante (marc) de macération précédente,
- enfin le filtrat a été évaporé au rota évaporateur a 40°C pendant 10 min.
- L'extrait obtenu est conservé au frais dans un flacon en verre (**Figure 17**).



Figure 13: étapes de préparation de l'extrait acétonique

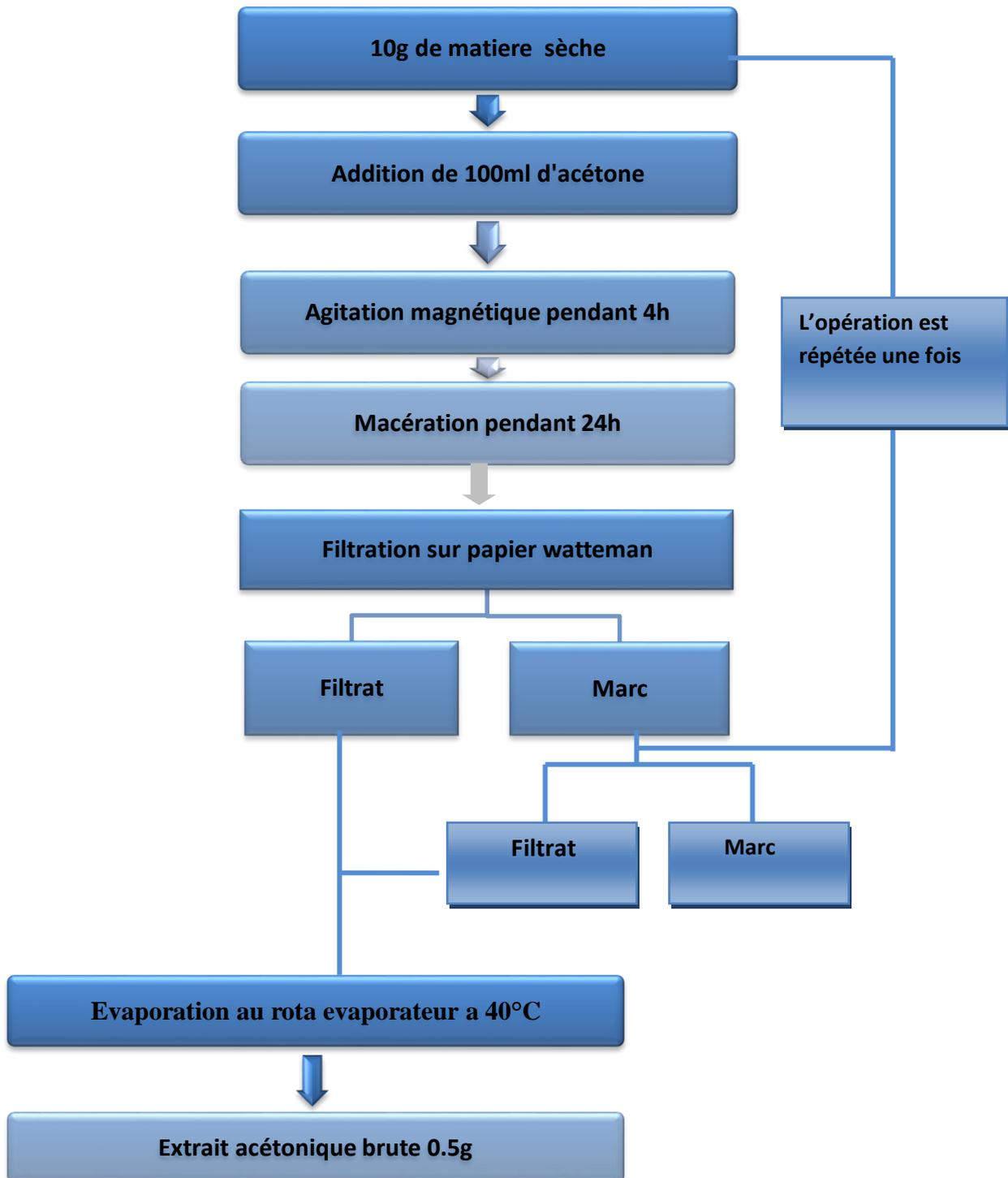


Figure 14 : schéma récapitulatif d'extraction par macération acétonique de la poudre de lichen.

3.2.3. paramètres d'évaluation de l'extraction

Au terme des deux extractions le rendement d'extraction total $RE_T\%$ est calculé afin de permettre de comparer entre les deux méthodes.

Le rendement d'extraction $RE_T\%$

$$RE_T\% = \frac{\text{masse de la matière sèche}}{\text{masse de la matière végétale}} \times 100$$

Sachant que :

- Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation)
- la masse de la matière végétale (lichen) est de 10g

3.3. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM)

❖ Principe :

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires (**Mechernene Bekhta, 2014**).

❖ Mode opératoire

- Préparation de la phase mobile (l'éluant) : le système des solvants est constitué d'acétate d'éthyle 20ml du toluène 70ml et d'acide formique (AF) 5ml .On a rempli la cuve avec l'élution à environ 0.5 cm d'hauteur d'éluant et on a fermé la cuve.
- préparation de la phase stationnaire : On a utilisé la plaque en aluminium recouvertes de gel de silice sur celle-ci on a tracé au crayon un trait à 1 cm du bas de la plaque (ligne de dépôt), Sur ce trait on a tracé 2 petits points où seront déposés 20µl des extraits acétonique et méthanolique, de lichens récoltés, sur chaque point à l'aide d'une micropipette.

- la plaque est ensuite déposée verticalement dans la cuve et refermée puis on laisse l'éluant diffuser.
- Lorsque le solvant a atteint les $\frac{3}{4}$ environ de la hauteur de la plaque (1 cm du bord supérieur), on a enlevé cette dernière de la cuve et marqué le front du solvant.
- Le résultat de séparation de la CCM est identifié à l'aide d'un révélateur à base de vanilline (1g de vanilline dissout dans l'éthanol mélangé avec 2 ml d'acide sulfurique concentré).
- Les spots (tâches) sont observés au visible.

❖ Paramètres mesurés

Les spots sont repérés et les distances parcourues sont mesurées, les rapports frontaux (Rf) sont calculés par l'équation suivante :

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par l'eluant}}$$

3.4. Screening phytochimique des extraits de lichen

Ce terme screening, correspond à une technique de « criblage » c'est-à-dire la recherche systématique des produits naturels. Les essais chimiques de caractérisation sont porté sur la recherche dans les différents extraits des principaux groupes chimiques. Ces essais permettent d'avoir des informations préliminaires sur la composition chimique, ces caractérisations ont été faites en utilisant principalement les réactions en tube, les résultats sont classés en : (+): test positif. (-): test négatif (Aissous , Bechara, 2016) .

Ce test qualitatif permet de mettre en évidence les composés chimiques se trouvant dans les extraits lichéniques. La présence de ces composés est attestée par la formation d'un précipité et le changement de coloration du milieu.

3.4.1. Test de Liebermann-Büchard

L'objectif de ce test est de rechercher les stéroïdes et les polyterpènes ; 5 ml de chacun des deux extraits ont été évaporés sur bain de sable. Le résidu est dissout à chaud dans 1 ml d'anhydride acétique puis on a ajouté 0,5 ml d'acide sulfurique concentré au triturât. L'apparition, à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, a indiqué une réaction positive.

3.4.2. Test de Mayer

Ce test est réalisé pour mettre en évidence les alcaloïdes, 1ml de chaque extrait (séparément) est ajouté a 3ml de l'acide sulfurique (1%) (**annexe 1**), le mélange est placé au bain marie a 100°C pendant 5 minutes, on a ajouté ensuite 5 gouttes de réactif de Mayer (**annexe 6**) la formation d'un précipite blanc a indiqué une réaction positive (**ALILOU et al., 2014**).

3.4.3. Test du FeCl₃

Ce test a été appliqué pour identifier la présence de tanins et/ou poly phénols: 2 ml de chaque extrait (acetonique, méthanolique) est mélangé à une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2% (**annexe 2**). L'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence de polyphénols et/ou les tanins (**A.M.Rizk, 1982**).

3.4.4. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux, nous donne une estimation globale de la teneur en composés phénoliques contenus au niveau de l'extrait acétoniques et méthanolique des lichens.

❖ Principe

Le dosage des polyphénols est réalisé selon la méthode décrite par **Vermerris et Nicholson, 2006** en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et l'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxyde bleus de tungstène et de molybdène(**Mechernene Bekhta, 2014**).

❖ Mode opératoire

- On introduit 200µl des extraits acétonique et méthanolique dilué a 1ml de Folin ciocalteu a 2% (**annexe 3**) et 800µl de carbonate de sodium NA₂CO₃à 7,5% (**annexe 4**).
- On complète avec l'eau distillé jusqu'à atteint 3ml .on prépare dans les mêmes conditions le blanc avec de l'eau distillée a la place de la solution des lichens puis on porte les tubes a l'étuve a 37°C pendant 2h et à l'abri de la lumière. . L'absorbance de l'extrait est mesuré à 760 nm contre le blanc.

- Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.

❖ Expression des résultats

- Les concentrations des poly phénols totaux contenu dans les extraits de lichen sont calculées en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique à 10% à différentes concentrations, dans les mêmes conditions que l'échantillon.
- Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de poudre

3.4.5. Dosage des flavonoïdes totaux

❖ Principe

Le dosage des flavonoïdes est réalisé en utilisant une méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et la soude ($NaOH$). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm (**Mechernene Bekhta, 2014**).

❖ Mode opératoire

- 1 ml de chaque extrait de lichen, dilué, ou standard (quercétine) est mélangé avec 1 ml de la solution d' $AlCl_3$ (2% dans le méthanol) (**annexe 5**) ;
- dans les mêmes conditions un témoin est préparé avec de l'eau distillée à la place des extraits de lichens ;
- Après 10 minutes d'incubation à température ambiante,
- l'absorbance est lue à 415 nm contre un blanc dans un spectrophotomètre ;
- Toutes les mesures sont réalisées en triplicata.
- la courbe d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la quercétine à différentes concentration (**Talbi et al., 2015**).

❖ Expression des résultats

- Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé en utilisant la quercétine comme un standard. Cette dernière nous a permet de réaliser une courbe d'étalonnage, d'où on a calculé la teneur en flavonoïdes de l'extrait methanolique et acetonique des lichens.
- La concentration est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg d'extrait).

3.5. Activité antibactérienne des extraits de lichens récoltés

L'activité antimicrobienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé cité par (Doughari *et al.*, 2007).

Pour évaluer l'activité antimicrobienne d'une substance naturelle ou d'un extrait végétal les méthodes communément employées sont réalisées par dilution ou par diffusion (Setzer *et al.*, 2006).

❖ Principe

La méthode de dilution, qui peut être effectuée en milieu liquide ou en milieu solide, consiste à mettre un inoculum microbien au contact de concentrations croissantes de l'échantillon. Le degré d'inhibition de la croissance microbienne détermine le pouvoir antimicrobien des substances testées.

La méthode de diffusion, exclusivement réalisée sur 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.

3.5.1. Les souches bactériennes utilisées

Escherichia coli

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, (Kaper *et al.*, 2004).

de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm , *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (Percival, 2004)

Pseudomonas aeruginosa

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments

pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (**Percival, 2004**).

3.5.2. Matériel utilisés

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

3.5.3. Préparation de la solution mère de l'extrait

Les extraits acétoniques et méthanolique sont solubilisés dans 0,5 ml de DMSO puis compléter par 0,5 ml d'eau distillée pure. Afin de préparer une solution mère de 200mg /ml. Ensuite cette solution est stérilisée à l'autoclave (121°C pendant 15min).

3.5.4. Préparation des disques

Appliquer la méthode décrite par (**Bolou G.E.K et al., 2011**).

- Préparer des disques de 6 mm de diamètre de papier wattman n° ;
- imprégner les disques avec 20µl d'extrait de lichens ;
- Préparer des disques témoins négatifs:
 - Disque imprègne d'eau physiologique stérile ;
 - Disque imprégné de mélange d'eau physiologique et DMSO (V/V) ;
 - Disque avec un antibiotique de référence (control) (obtenus du laboratoire privé) ;
- Sécher les disques dans l'étuve a 37°C.

3.5.5. Méthode de diffusion en milieu gélosé

L'activité antibactérienne des différents extraits végétaux est évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé telle que décrite par (**Bauer et al., 1966**) et reprise par (**BARRY et al., 1985**).

- Avoir des colonies de bactéries jeunes de 18h à 24h : un ensemencement solide/solide de colonies de bactérie dans une gélose LB (compose d'agar, NaCl, extrait de levure, tryptone) 24h au préalable ;

3. Matériel et méthodes

- Une suspension bactérienne est réalisée dans l'eau physiologique stérile, la turbidité de cette suspension est ajusté à 0,5 Mc Farland (une suspension de 0,1 a 0,12 nm lue a une longueur d'onde de 600 a 620nm) puis dilué au 1/100 pour obtenir un inoculum à 10^6 ufc/ml ;
- Des bactéries sontensemencées sur des boites de pétrie contenant la gélose Muller Hinton (milieu MH) : mètre quelque gouttes de la suspension de bactéries et a l'aide d'un râteau étaler sur toute la surface ;
- Les disques imprègnes de l'extrait sont ensuite délicatement déposé à la surface de la gélose a l'aide d'un pince stérile ;
- Les boites sont laissées pendant 1h a température ambiante pour une diffusion des substances ;
- Incubées à 37°C dans l'étuve pendant 24h ;
- L'activité bactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'incubation autour de chaque disque (en mm) à l'aide d'un pied a coulisse ;
- Le diamètre d'inhibition est mesuré contre le diamètre d'antibiotique de référence.

Résultats et interprétation

4.1. Résultats d'Extraction

Les rendements totaux des deux solvants d'extractions utilisés pour extraire les métabolites secondaires de lichens ont représentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Résultat du rendement d'extraction par le solvant acétone et méthanol de la poudre de lichen récolté

	Extrait acétonique	Extraits méthanolique
Poids sec (g)	0.5	0.65
RE%	5	6.5

On constate que le rendement d'extraction par le méthanol est plus au moins élevé compare à la méthode avec l'acétone avec un rendement de 6,5% et 5% respectivement.

Le méthanol est le solvant d'extraction le plus utilisé par excellence dans les extraits végétaux. selon (**Mahmoudi S et al.,2013**)

les résultats des rendements obtenus par macération de différentes partie de la fleur d'artichaut montrent que l'acétone est le meilleur solvant d'extraction suivi par l'eau et le méthanol. Le méthanol 60% présente le meilleur pouvoir extractant comparé à l'acétone, selon (**Bettaieb r et al., 2016**)

une étude récente a montré que le rendement d'extraction total en métabolites secondaires ainsi que celui des deux composés étudiés (acide léprarique et érythrine) sont fortement dépendants de la méthode de broyage, du type d'extraction, du ratio solide/liquide et de l'intensité de l'agitation (**Parrot et al.,2014**) .

4.2. Résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM)

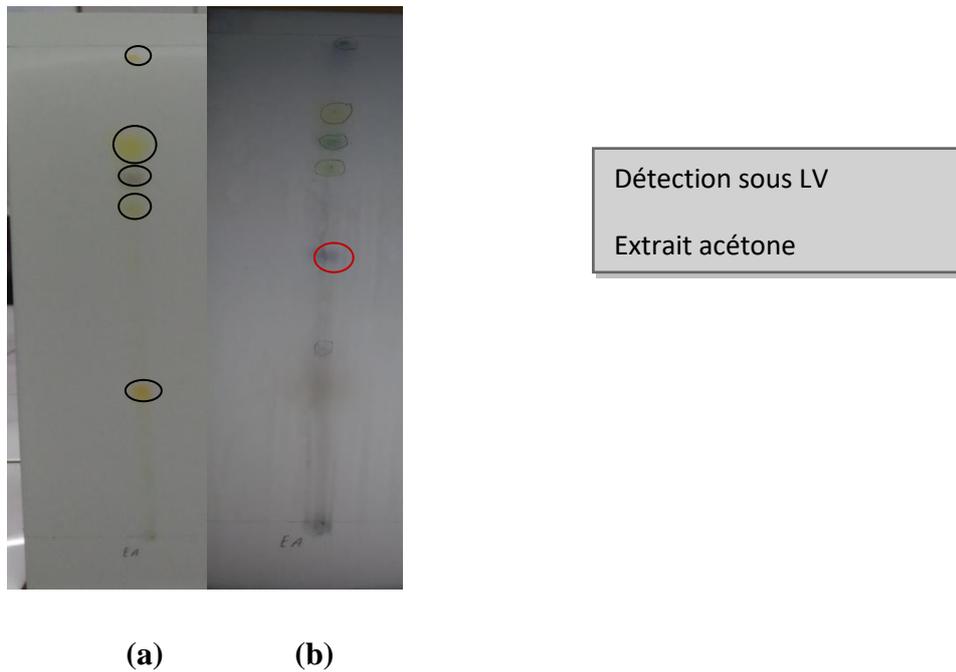
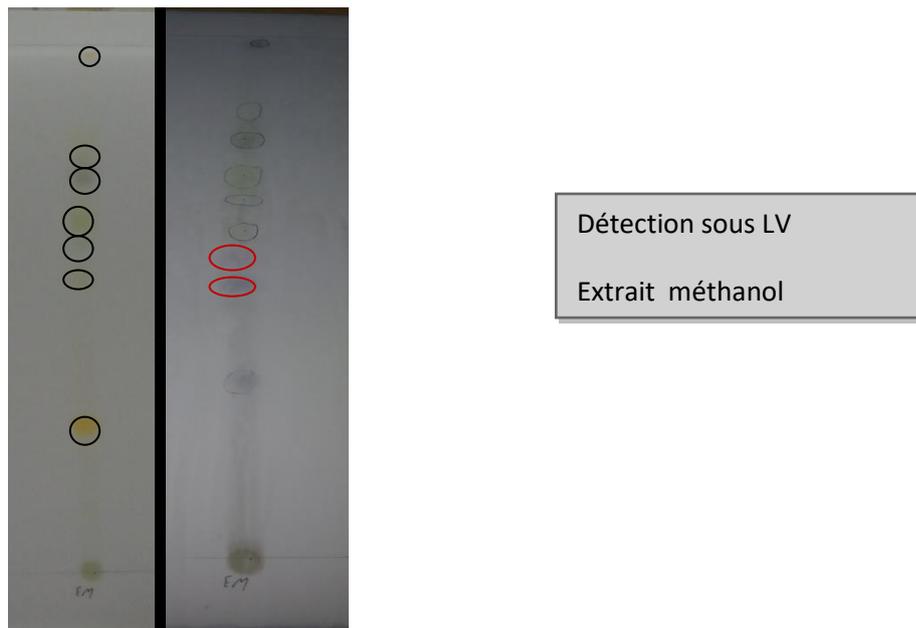


Figure 16 : Chromatogrammes de l'extrait acétonique de lichen récolté avant la révélation (a) et après la révélation (b) sous la lumière visible (LV).

L'analyse par chromatographie sur couche mince de l'extrait acétonique de lichens révèle cinq spots avant révélation et six après révélation par le vanilline (ac phosphomolybdique)

4. Résultats et interprétation



(a) (b)

Figure 17 : Chromatogramme de l'extrait méthanolique de lichen récolté avant la révélation (a) et après la révélation (b)

L'analyse du chromatogramme de CCM de l'extrait méthanolique de lichens montre l'apparition de six spots avant la révélation et huit spots après l'ajout du révélateur Vanilline.

Tableau 2 : Résultats des rapports frontaux des spots obtenus par CCM des extraits acétonique et méthanolique de lichens

	Les rapports frontaux		
	N°	E. Acétonique	E. Méthanolique
Avant la révélation	1	0.31	0.29
	2	0.69	0.58
	3	0.75	0.64
	4	0.81	0.69
	5	0.98	0.77
	6	/	0.83
	7	/	0.99
Après la révélation	8	0.49	0.48
	9	/	0.53

4. Résultats et interprétation

Le profil chimique des deux extraits acétonique et méthanolique de lichens étudiés montre une différence dans la quantité (représenté par le nombre de spots) et la nature même des molécules isolées (signalé par le Rf). En effet trois spots inédits dans l'extrait méthanolique avec Rf de 0.53, 0.58 et 0.64. Cette diversité de profil chimique de l'extrait de lichens semblerait être en fonction du solvant d'extraction. L'acétone et le méthanol sont des solvants polaires mais de polarité croissante.

4.3. Résultats du screening phytochimique

4.3.1. Résultats des tests qualitatifs

Les résultats du screening phytochimique par les tests qualitatifs sont regroupés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Résultats du screening chimique de deux extraits (acétonique et méthanolique) de lichens étudiés

Tests phytochimique	Présence/Absence dans le lichen		Observation	
	Extrait acétonique	Extrait méthanolique	Extrait acétonique	Extrait méthanolique
Test de Liebermann-Büchard	Présence de stérols et polyterpènes	Présence de stérols et polyterpènes	 Coloration violette	 Coloration violette
Test de mayer	Absence D'alcaloïde	Absence D'alcaloïde	 Pas de précipite blanc	 Pas de précipite blanc
Test du FeCl ₃	Présence des tanins et polyphénols	Présence des tanins et polyphénols	 Coloration verte plus foncée	 Coloration verte plus foncée

4. Résultats et interprétation

Le screening phytochimique réalisé sur les extraits de lichens confirme la présence de métabolites secondaires bioactifs à savoir, les stérols, poly terpène, tanin et poly phénol. Cela rejoint l'hypothèse des travaux précédents, dans la littérature, que les lichens sont une source de molécules bioactive a intérêt très variés.

4.3.2. Résultats du dosage des polyphénols totaux

La courbe d'étalonnage obtenue en utilisant l'acide gallique à 10% à différentes concentrations en suivant la méthode de folin ciocalteu est illustrée dans la **Figure 18**

Les résultats du dosage de la teneur en poly phénol contenus dans les deux extraits de lichens sont réunis dans le **Tableau 5**

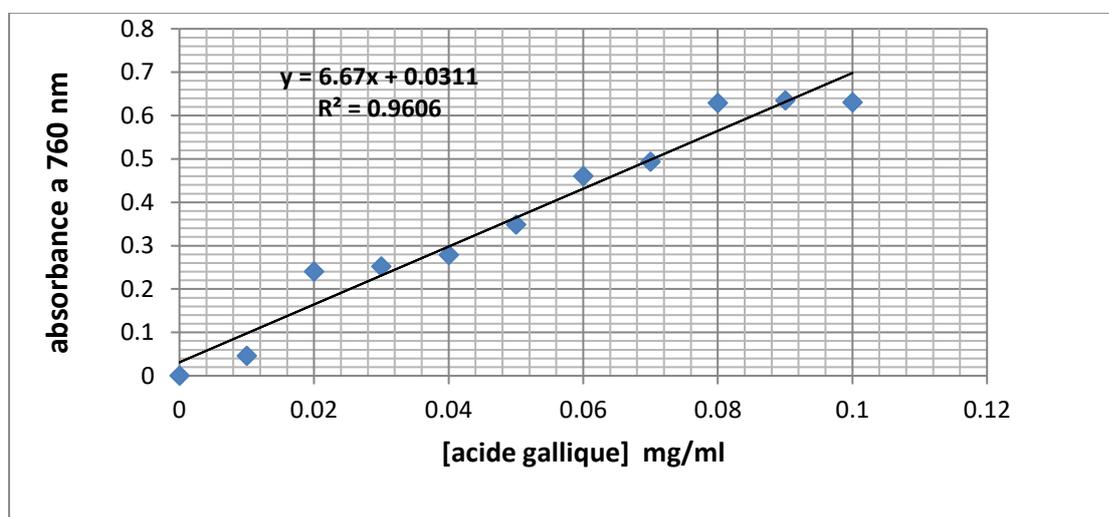


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Tableau 4 : Teneur en phénols totaux dans l'extrait acétonique et méthanolique des lichens récoltés

	Extrait Acétonique	Extrait Méthanolique
Teneurs en phénols totaux (mg EAG/mg extrait)	2,147 ± 0,135	3,533 ± 0,162

EAG : équivalent acide gallique

Les teneurs (en moyenne) en poly phénols totaux des deux extraits varient entre 2,147 à 3,533 mg EAG/g . La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait

4. Résultats et interprétation

méthanolique de lichens étudiés, avec un taux $3,533 \pm 0,162$ mg EAG/g, par rapport à l'extraits acetonique de lichens, où nous enregistrons des teneurs de l'ordre de $2,147 \pm 0,135$ mg EAG/g

4.3. 3. Résultat de dosage des flavonoïdes totaux

Le résultat de la teneur en flavonoïde des extraits de lichens étudiés, est énoncé dans le **tableau 5**.

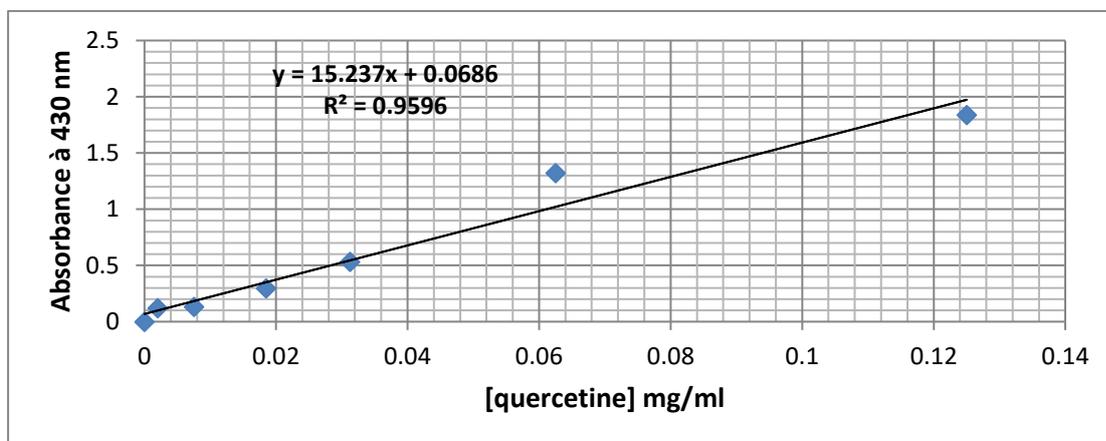


Figure 19 : Courbe d'étalonnage de la Quercétine.

Tableau 5 : Teneur en flavonoïdes totaux dans l'extrait acétonique et méthanolique des lichens récolté

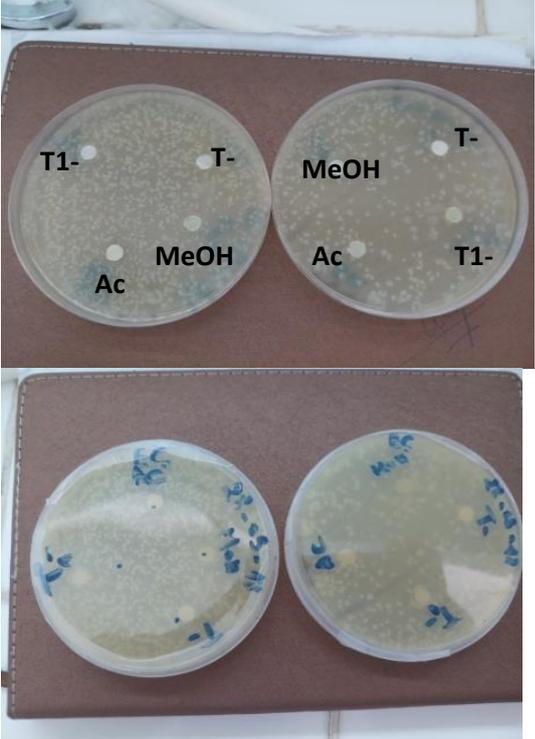
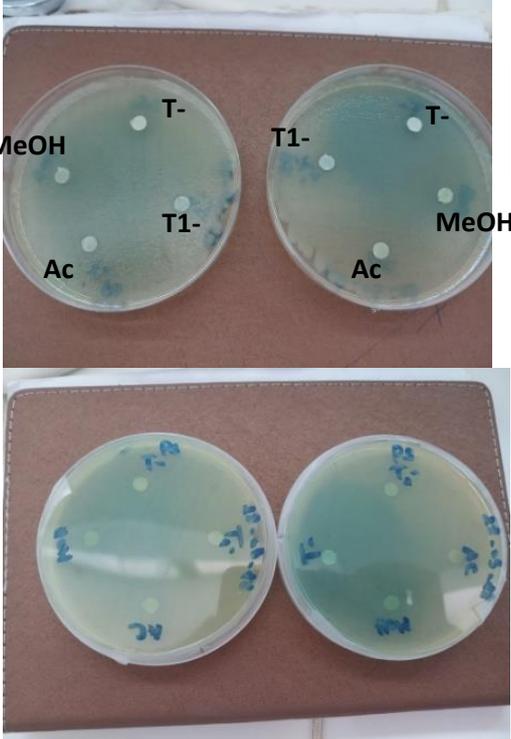
	Extrait Acétonique	Extrait Méthanolique
Teneurs en flavonoïdes totaux (mg deE Q/mg extrait)	$8,347 \pm 0,485$	$11,023 \pm 0,0802$

EQ : équivalent quercétine

Les résultats, présentés dans le Tableau 6, montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient entre les deux types d'extraits. L'extrait acétonique de lichens qui renferme des teneurs plus faibles ($8,347 \pm 0,485$ mg EQ/g) comparé à la concentration des flavonoïdes de lichens étudiés dans l'extrait méthanolique ($11,023 \pm 0,0802$ mg EQ/g).

4.4. Résultats de la recherche d'activité antimicrobienne

Tableau 6 : Résultats du test anti-bactérien de l'extrait acétoniques et méthanoliques de lichens récoltés sur deux souches de bactéries *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa*

<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	
<p>Pas de zone inhibition</p> <p>Il y a une croissance bactérienne</p>	<p>Pas de zone inhibition</p> <p>Il y a une croissance bactérienne</p>

PREMIER ESSAI

DEUXIEME ESSAI

L'extrait acétonique de lichens ne provoque aucune zone d'inhibition comparée aux contrôles positifs (les antibiotiques appropriés) sur la multiplication des bactéries aussi bien *Pseudomonas aeruginosa* que *Escherichia coli*

4. Résultats et interprétation

Selon (**Adriana Basile et al., 2015**) l'extrait acétonique de lichens récoltés possède une activité antibactérienne contre neufs souches bactériennes représentatives des classe Gram(+) et Gram (-) The Gram (+).

L'équipe de (**Felczykowska et al., 2017**) l'extrait acétonique de lichens récoltés n'a pas montré d'activité antibactérienne contre des bactéries testées,

D'après les résultats de (**Basile A et al., 2015**) où des extraits de lichens récoltés ont été testés contre plusieurs souches bactériennes et il a été trouvé que les extraits d'acétone de lichens ont inhibé tous les micro-organismes testés aux concentrations de 7.8-62.5 µg/ml.

Conclusion

Conclusion

Le développement de nouveaux antibiotiques est plus que jamais nécessaire non seulement pour faire face à l'extension inéluctable des résistances bactériennes mais aussi pour le traitement de pathologies infectieuses émergentes. Donc la recherche des molécules naturelles bioactives est devenue actuellement un sujet très important.

Les Lichens sont les organismes uniques, produisant les métabolites biologiquement actifs avec une grande variété d'effets. Mais sauf quelques unes qui sont commercialisées à cause des difficultés d'extraction et d'isolement de ces composés en quantité importante.

Dans notre approche expérimentale, nous avons tenté par l'extraction par macération à l'acétone et le méthanol, couramment utilisé en routine de laboratoires, de caractériser, du point de vue taxinomique et biochimique les lichens récoltés. Nous avons également utilisés des tests phytochimies qualitatifs et quantitatifs, analyse par CCM et un test d'activité antibactérien.

L'extraction par macération avec le méthanol donne un meilleur rendement (6,5%) compare au rendement massique de l'acétone (5 %). l'analyse par CCM des deux extraits indiqué la présence de différents spots caractérise par la couleur et le Rf, cette diversité est aussi confirme par test de follin ciocalteu et le dosage des flavonoïdes qui montrent que l'extrait méthanolique est plus riche en poly phénol avec une valeur de (3,533 mgEAG/g) et flavonoïdes (11,023 mgEAG/g) que l'extrait acétonique avec des valeurs de (8,347 mgEAG/g) et (2,147 mg)

EQ/g). les tests de phytochimie qualitatifs révélés une diversité de métabolite secondaire bioactive dans les deux extraits : des stérols et les poly terpènes, les tanins et les polyphénols et l'absence des alcaloïdes.

Comme perspectives à ce travail, nous proposons de compléter et de perfectionner l'analyse qualitative et quantitative de cette espèce, par des méthodes analytiques beaucoup plus sophistiquées telles que HPLC/MS, pour bien spécifier les composés bioactifs responsables de *Xanthoria parietina*.

Annexes

Annexes

- **La préparation des solutions :**

1. Solution d'Acide sulfurique à 1% :

Mélanger 1ml d'acide sulfurique avec 100ml d'eau distillée.

2. Solution de chlorure ferrique FeCl_3 à 2% :

Mélanger 2g de chlorure ferrique avec 100ml d'eau distillée.

3. Le Folin ciocalteu à 2% :

Mélanger 2ml du Folin ciocalteu avec 100ml d'eau distillée.

4. Solution du carbonate de sodium Na_2CO_3 à 7.5% :

Mélanger 7.5g du carbonate de sodium avec 100ml d'eau distillée.

5. Solution méthanolique du chlorure d'aluminium AlCl_3 :

Mélanger 2g du chlorure d'aluminium avec 100ml du méthanol.

6. **Préparation du réactif de Mayer**

1.36g du chlorure de mercure HgCl_2 + 5g d'Iodure de potassium KI compléter avec l'eau distillée jusqu'à 100ml.

Références

Références

A

- **Adachi, K., 1983. Synthesis of orcinol monomethyl ether.** Memoirs of the Osaka Institute of Technology, Series A, Science and Technology, 28(1) : 33-42.
- **Agnieszka Felczykowska, Alicja Pastuszek-Skrzypczak, Anna Pawlik, Krystyna Bogucka, Anna Herman, 2017.** Antibacterial and anticancer activities of acetone extracts from in vitro cultured lichen-forming fungi. BMC Complementary and Alternative Medicine, ISSN 1472-6882.17.1-12.
- **AISSOUS, Assia, BECHARA, Rima. 2016.** Caractérisation Chimique et Activités Biologiques d ' Extrait Brut Hydroalcoolique Des Graines de Lepidium." *Mémoire Présenté En Vue de l'obtention Du Diplôme de Master*, 36.
- **Alilou, Hakim, Bouchaib Bencharki, Lalla Mina, and Idrissi Hassani. 2014.** "Asteriscusgraveolenssubsp. Odorus" 10 (3): 316–28.
- **Andrioli, W. J.; Silva, T. M.; Silva, V. B. da; Damásio, A. R. L.; Maller, A.; Conti, R.; Jorge, J. A.; Araújo, J. M.; Silva, C. H. T. P.; Pupo, M. T.; Polizeli, M. L. T. M.; Bastos, J. K. 2012.** The fungal metabolite eugenitin as additive for *Aspergillus niveus* glucoamylase activation Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 74, 156-161.
- **Antosiewicz, and Beata Guzow-Krzemińska, 2017.** Antibacterial and anticancer activities of acetone extracts from in vitro cultured lichen-forming fungi:. BMC Complementary and Alternative Medicine .17:300.
- **Arctander, S., 1960.** Perfume and flavor materials of natural origin. NJ. (U.S.A.), Elizabeth, p. 1-46, 445-456.

B

- **Barry, R. A., M. P. McKinley, P. E. Bendheim, G.K, Lewis, S. J. De Armond, and S. B. Prusiner. 1985.** Antibodies to the scrapie protein decorate prion rods. J. Immunol.135:603-613.
- **Basile A, Rigano D, Loppi S, Di Santi A, Nebbioso A, Sorbo S, et al.** Antiproliferative, antibacterial and antifungal activity of the lichen *Xanthoria parietina* and its secondary metabolite parietin. Int J Mol Sci. 2015;16(4):7861–75.
- **Bauer, A. W., W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966.** "Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method." *American Journal of*

Références

- *Clinical Pathology* 45 (4): 493–96.
- **Bettaieb Rebey, J. Sriti, B. Besbess, K. Mkaddmini Hammi, I. Hamrouni Sellami, B. Marzouk, R. Ksouri** : Effet de la provenance et du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes des graines de fenouil (*Foeni*, n.d.).
- **Bolou GEK, Attioua B, N'guessan AC, Coulibaly A, N'guessan JD, Djaman AJ. 2011.** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch. Sur *Salmonella Typhi* et *Salmonella Typhimurium*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, 80: 772-790
- **Boustie, J., and Grube, M. (2005) Lichens-a promising source of bioactive secondary metabolites. Plant Genetic Resources 3, 273–28.(41)**

c

- **Carlos IZ, Carli CBA, Maia DCG, Benzatti FP, Lopes FCM, Roese FM, Watanabe M, Micheletti AC, dos Santos LC, Vilegas W, Honda NK, 2009,** Immunostimulatory effects of the phenolic compounds from lichens on nitric oxide and hydrogen peroxide production, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(4), 847-852
- **Culberson, W. L.; Culberson, C. F.; Johnson, A. Mycologia,1982.** A New Endemic Red-Fruited *Cladonia* from the North Carolina Coast, 74 (4), 662-667.

D

- **Dictionnaire de la langue française : lexis, Paris, Larousse,1989 (1re éd. 1979).**
- **Doughari, J.H., Pukuma, M.S. and De, N, 2007.** Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* (L) Dell and *Moringa oleifera* Lam on *Salmonella typhi*. *African Journal of Biotechnology* Vol 6 (19).Pp 2212-2215.

G

- **Ghedira K, 2005.** Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytother.* 3: 162-169.40.

H

Références

- **Hakim ALILOU***, **Bouchaib BENCHARKI**, **Lalla Mina Idrissi HASSANI** et **Noureddine BARKA** , **2014**: Screening phytochimique et identificationspectroscopique des flavonoïdes. d’*Asteriscusgraveolens*subsp. *Odorus* . Afrique SCIENCE 10(3) 316 - 328).
- **Harck, Alexandre. 2015.** “Conception et Validation de Déphaseurs Large Bande Intégrant Des MEMS-RF Dans Un Environnement Hostile.”
- **Hollosy F, Meszaros G, Bokonyi G et al (2000)** Cytostatic, cytotoxic and protein tyrosine kinase inhibitory activity of ursolic acid in human tumor cells. *Anticancer Res* 20:4563–4570
- **Hopkins.G.W, 2003** : Physiologie végétale. Boeck université. 2éme édition. De boeck superieur. 514.
- **Huneck, S. 1999** , The Significance of Lichens and Their Metabolites, *Naturwissenschaften* , 559-570.

I

- **Ishikawa H, Nishimuro S, Watanbe T et al (1997)** Use of ursolic acid for the manufacture of a medicament for suppressing metastasis. *European Patent Appl* EP774255.
- **Ismed, F. (2012).** Phytochimie de lichens du genre *Stereocaulon* : étude particulière de *S . halei* Lamb et *S . montagneanum* Lamb , deux lichens recoltés en Indonésie Thèse soutenue à Rennes. *Thesis*, 1–2.

J

Joël Boustie, Martin Grube Lichens, 2005: a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources* 3(2); 273–287

K

- **Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL,2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. Center for Vaccine Development, Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland 21201, USA

Références

- **Krishna D., Chaluvadi M., Raj N. and Sripal R.** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J. Pharmacol.* 2001; 33: 2-16.54.

L

- **Lacy, A et O’Kennedy, R.** Studies on Coumarins and Coumarin-Related Compounds to Determine their Therapeutic Role in the Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design* 10, 3797-3811, 2004.

M

- **Mechernene Bekhta, 2014.** “Évaluation de l’Activité Antioxydante de Quelques Extraits de La Racine de Bryonia Dioica : Cas de Bryonia Dioica.”
- **Mohamed, Miara, and Djamel Universit. 2015.** “Aspects Taxonomiques Des Lichens Du Pin d’Alep (Pinus Halepensis) et Du Cyprès (Cupressus Sempervirens) de La Forêt de Guezoul (Tiaret),.” no. June.
- **Murtagh, G. J.; Dyer, P. S.; Crittenden, P. D, 2000.** Sex and the single lichen .*Nature*, 404, 564-564.
- **M. Rizk, 1982.** Constituents of plants growing in Qatar, a chemical survey of 60 plants *Fitoterapia*, 52 (2), 35- 42).
- **Muggia, L., Schmitt, I. & Grube, M. 2008.** Purifying selection is a prevailing motif in the evolution of ketoacyl synthase domains of polyketide synthases from lichenized fungi. *Mycol. Res.* 112: 289-296O
- **Osawa K, Marsumoto T, Yasuda H et al (1991)** The inhibitory effect of plant extracts on the collagenolytic activity and cytotoxicity of human gingival fibroblasts by *Porphyromonas gingivalis* crude enzyme. *Bull Tokyo Dent Coll* 32:1–7.

P

- **Parrot, D. (2014).** Etude de quatre lichens marins, maritime ou terrestre et des bactéries associées : Evaluation de la diversité bactérienne et recherche de métabolites d’intérêt.

Références

- **Percival SL.** Microbiology of waterborne diseases. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 2004, p. 480.67.
- **Polovinka, M. P.; Komarova, N. I.; Korchagina, D. V.; Sokolov, D. N.; Luzina, O. A.; Vlasenko, N. G.; Malyuga, A. A.; Romanova, E. V.; Salakhutdinov, N. F, 2012.**Secondary metabolites of the lichen *Cladonia stellaris*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48 (3), 392-395.

R

- **Ranković, B. (2015).** Lichen secondary metabolites: Bioactive properties and pharmaceutical potential. *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*, (January), 1–202. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13374-4>.
- **Romagni, J. G.; Dayan, F. E.** Advances in Microbial Toxin Research and Its Biotechnological Exploitation R.K. Upadhyay (Ed.) 2002, 151-169.

S

- **Setzer, William N, Jennifer M Schmidt, Joseph A Noletto, and Bernhard Vogler. 2006.** “Leaf Oil Compositions and Bioactivities of Abaco Bush Medicines.” *Pharmacologyonline* 3: 794–802.
- **(Silver., (2011) Clinical Microbiology Reviews24, 71–109. –3) (Fukuda, K. (2014) Antimicrobial resistance Global report on surveillance, World Health Organization, France, p 256)**
- **Stocker-Wörgötter, E. 2008.**Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS gene *Natural Product Reports*, 25, 188-200.
- **Stocker-Wörgötter, E.; Mach Cortes Cordeiro, L.; Lacomini, M. 2013.**Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier , 39, 337-380.

T

Références

- **Taguchi, H.; Sankawa, U.; Shibata, S. Tetrahedron Letters 1966.**, 42, 5211-5214.
- **Talbi, H, A Boumaza, K El-, J Talbi, and A Hilali. 2015.** “Evaluation de l’ Activité Antioxydante et La Composition Physico-Chimique Des Extraits Méthanolique et Aqueux de La Nigella Sativa L . (Evaluation of Antioxidant Activity and Physico-Chemical Composition of Methanolic and Aqueous Extracts of Nigella Sat.” *Mater. Environ. Sci.* 6 (4): 1111–17.

V

- **Van Haluwyn, C.; Asta, J.; Gavériaux J.-P.**, Guide des lichens de France : lichens des arbres. 2009, Belin (Ed.) 231 p.
- **Varvaresou, A.; Papageorgiou, S.; Tsirivas, E.; Protopapa, E.; Kintziou, H.; Kefala, V.; Demetzos, C. 2009.**International Journal of Cosmetic Science, 31, 163-175.
- **Vermerris W; Nicholson R; 2006.** Isolation and Identification of Phenolic Compounds, Phenolic Compound Biochemistry, Springere-Book 2006; 151-191.