



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



Université des Frères Mentouri

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Spécialité : Biochimie Appliquée

Intitulé :

**Activité antibactérienne et caractéristiques
phytochimiques
des lichens issus de l'est algérien**

Présenté et soutenu par : KOUT MOUNIR

CHIHED AHMED

Soutenu le 03 /07/2018

❖ **Devant le jury**

Président : ELOUAR I. M.C.A, Université Frères Mentouri

Rapporteur : GHERIB A. M.C.B, Université D'Alger1

Examineur : LATRECHE A. M.C.B, Université Frères Mentouri

Année universitaire 2017 /2018

Résumé

Les lichens sont une source de nouvelles molécules à activité antibactérienne et antifongique. L'objectif de notre travail est d'essayer d'identifier et caractériser des lichens récoltés aux hasards de deux substrats (tronc d'arbre et mure de ville).

On a procédé à une extraction par macération (acétone), analyse et fractionnement par CCM, tests phytochimiques qualitatifs et quantitatifs et le teste d'activité antimicrobienne des extraits obtenus par méthode de diffusion en milieu gélose (MH).

le rendement d'extraction le plus élevé est celui du lichen du tronc d'arbre (53.1%) comparé au lichen de mur (42.1%) ; l'analyse par CCM révèle une différence d'apparition de spots par leurs nombre, Rf et couleurs ; le screening phytochimique indique une présence diversifiée de molécules bioactives tels que tanins, des anthocyanes, des stéroïdes et terpènes ; le dosage des polyphénols totaux varie entre 0.044 et 0.081mgEAG/ml respectivement lichen d'arbre et lichen de mur, la teneur en flavonoïde est de l'ordre de 0.058mgEQ/ml pour le lichen du tronc d'arbre et 0.061mgEQ/ml dans l'extrait de lichen de mur. Aucune activité antibactérienne sur les deux souches de bactéries testées.

Le lichen récolté est riche en certains métabolites secondaires à activités biologiques importantes

Mots clés : Acétone, lichen, CCM, flavonoïdes, polyphénol, activité antibactérienne.

Abstract

Lichens are a source of new molecules with antibacterial and antifungal activity. The objective of our work is to try to identify and characterize lichens harvested at the chance of two substrates (tree trunk and wall of city).

Maceration (acetone) extraction, TLC analysis and fractionation, qualitative and quantitative phytochemical tests, and antimicrobial activity testing of extracts obtained by diffusion method in agar (MH) were carried out.

the highest extraction yield is that of the tree trunk lichen (53.1%) compared to the wall lichen (42.1%); TLC analysis reveals a difference in appearance of spots by their number, R_f and colors; Phytochemical screening indicates a diversified presence of bioactive molecules such as tannins, anthocyanins, sterols and terpenes; the total polyphenols dosage varies between 0.044 and 0.081mgEAG / ml respectively tree lichen and wall lichen, the flavonoid content is of the order of 0.058mgEq / ml for the lichen of the tree trunk and 0.061mgEQ / ml in the lichen extract of the wall. No antibacterial activity on both strains of bacteria tested.

The harvested lichen is rich in some secondary metabolite with important biological activities

Key words: acetone extraction, *Xanthoria parietina*, TLC, antibacterial activity, Folin ciocalteu method.

ملخص

الأشنات هي مصدر لجزيئات جديدة ذات نشاط مضاد للبكتيريا ومضاد للفطريات. والهدف من عملنا هو محاولة لتحديد وتوصيف المخاطر من الأشنات التي جمعت اثنين من ركائز (جذع الشجرة وبلاك المدينة). تم استخراج الإجراء من قبل النقع (الأسيتون)، وتجزئ عن طريق تحليل TLC، اختبارات الكيمياء النباتي النوعية والكمية واختبار نشاط مضادات الميكروبات من مقتطفات حصلت عليها طريقة المتوسطة أجار نشر (MH).

أعلى إنتاجية استخراج هي أشنة جذع الشجرة (53.1%) مقارنة بأشنة الحائط (42.1%) ؛ تحليل TLC يكشف عن وجود اختلاف في مظهر البقع من خلال عددهم ، Rf والألوان. وأشار الفحص الكيمياء النباتي وجود غنية من الجزيئات النشطة بيولوجيا مثل العفص، anthocyan، الجامدة وتربين. جرعة من إجمالي البوليفينول تتراوح ما بين 0.044 و mgEAG0.081 / مل على التوالي بالنسبة لأشنة جذع الشجرة و أشنة الجدار، ومحتوى الفلافونويد هو بين mgEQ0.058 / مل لأشنة جذع الشجرة و mgEQ0.061 / مل في أشنة الجدار. لا يوجد نشاط مضاد للجراثيم على كل من سلالات البكتيريا التي تم اختبارها.

أشنة الحصاد غنية في بعض المستقلب الثانوي مع الأنشطة البيولوجية الهامة

، نشاط مضاد للجراثيم. طريقة الفولين TLC، Xanthoria parietina استخراج الأسيتون، : الكلمات المفتاحية ciocalteu.

Table des matières

Résumé	
Liste des tableaux	
Liste des Figures	
Liste des abréviations	

Introduction générale

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

I. Revue bibliographique

I. Revue bibliographique.....	3
1. Définition des lichens.....	3
2. Habitat.....	3
3. Morphologie.....	3
3.1. Thalles lépreux.....	3
3.2. Thalles crustacés.....	4
3.3. Thalles squamuleux.....	4
3.4. Thalles foliacés.....	4
3.5. Thalles fruticuleux.....	4
3.6. Thalles composites.....	5
3.7. Thalles gélatineux.....	5
4. Reproduction des lichens.....	6
4.1. Reproduction sexuée (champignon seul).....	6
4.2. Reproduction asexuée (algue associée au champignon).....	6
4.2.1. Reproduction asexuée par sorédies.....	7
4.2.2. Reproduction asexuée par isidies.....	7
5. Métabolites lichéniques.....	7
6. Bioindicateurs de pollution.....	15
6.1. Rôle des métabolites secondaires.....	15

II. Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes.....	17
1. Récolte des lichens.....	17
2. Identification des lichens.....	17
3. Extraction Acétonique (Macération).....	18
3.1. Principe.....	18

3.2. Mode opératoire.....	18
3.3. Paramètre calculé.....	19
4. Analyse par Chromatographie sur couche mince « CCM ».....	20
4.1. Principe.....	20
4.2. Mode opératoire.....	20
4.3. Paramètres calculés.....	21
5. Les Tests Phytochimique des extraits de lichens.....	21
5.1. Test de Tanins/polyphénols (test du FeCL ₃).....	21
5.2. Test d'Anthocyanes.....	21
5.2.1. Préparation de l'infusé à 10%.....	21
5.3. Test de Stérols/Polyterpènes (test de Liebermann-Büchard).....	21
5.4. Test d'Alcaloïdes (test de Mayer).....	22
5.5. Dosage des polyphénols totaux.....	22
5.5.1. Principe.....	22
5.5.2. Mode opératoire.....	22
5.5.3. Expression des résultats.....	22
5.6. Dosage des Flavonoïdes.....	23
5.6.1. Principe.....	23
5.6.2. Mode opératoire.....	23
5.5.3. Expression des Résultats.....	23
6. Détermination de l'Activité antibactérienne.....	23
6.1. Principe.....	24
6.2. Mode opératoire.....	24
6.2.1. Préparation de la solution mère de l'extrait.....	24
6.2.2. Préparation des disques.....	24
6.2. 3. Micro-organismes utilisés.....	24
6.2. 4. Méthode de diffusion en milieu gélosé.....	25
6.2.5. Expression des résultats.....	25

III. Résultats et interprétations

III. Résultats et interprétations.....	26
1. Résultat de rendement totale d'extractions RE _T	26
2. Résultat de l'analyse par « CCM ».....	27
3. Calcule de rapport frontal : $R_f = d/D$	28

4. Résultats des Tests phytochimiques.....	29
4.1. Résultats du screening chimiques.....	29
4.2. Résultats du dosage des polyphénols totaux.....	30
4.3. Résultats du dosage des Flavonoïdes.....	32
5. l'Activité antibactérienne de deux extraits lichéniques.....	34

IV. Conclusion Générale

Conclusion Générale et Perspectives.....	35
--	----

V. Références bibliographiques

VI. Annexes

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classes de métabolites secondaires.....	8
Tableau 2 : le rendement total d'extractions RET par l'acétone des deux extraits de lichens.....	26
Tableau 3 : Profil chimique de la migration des extraits acétoniques des lichens dans la CCM.....	28
Tableau 4 : Résultats du screening chimiques des extraits des deux lichens.....	30
Tableau 5 : Teneur en poly phénols des extraits acétonique de lichen.....	31
Tableau 6 : Teneur en flavonoïde totaux dans les extraits acétoniques des deux lichens.....	33

Liste des Figures

Figure 1 : Principal type de thalles rencontrés chez les lichens.....	5
Figure 2 : Reproductions sexuées (champignon seul).....	6
Figure 3 : Reproduction asexuée par sorédies.....	7
Figure 4 : Reproduction asexuée par isidies.....	7
Figure 5 : Structure de base d'une xanthone	9
Figure 6 : Biogenèse des composés issus de la voie de l'acide mévalonique.....	10
Figure 7 : Biogenèse et la voie de l'acide shikimique, de l'acide pulvinique et de la calycine.....	10
Figure 8 : Structure d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique)	11
Figure 9 : Schéma de biosynthèse de l'acide usnique.....	12
Figure 10 : Structure de quelques dérivés de l'acide usnique.....	13
Figure 11 : Schéma de biosynthèse proposé pour les chromones.....	13
Figure 12 : Schéma de biosynthèse des xanthonnes chez les lichens.....	14
Figure 13 : Photos prise des lichens d'arbres et de mur.....	17
Figure 14 : Le Protocol d'extraction acétonique de deux matières de lichens.....	19
Figure 15 : Chromatogramme des extraits lichéniques, avant et après révélation avec la vanilline Sous la lumière visible, a gauche extrait de lichen de mur(EM), a droite extrait de lichen d'arbre (EA).....	27
Figure 16 : pourcentage obtenue après la calcule de « Rf ».....	29
Figure 17 : la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	31
Figure 18 : Concentration des polyphénols des extraits acétonique des deux lichens.....	32

Figure 19 : Le courbe étalonnage de quercétine	32
Figure 20 : Concentration des Flavonoïdes des extraits acétoniques des deux lichens.....	33
Figure 21 : Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes.....	34

Liste des abréviations

% : pourcentage

[C] : concentration

µl : microlitre

A: d'arbre

AlCl₃ : chlorure d'aluminium

CCM: chromatographie sur couche mince

D: distance entre la ligne de dépôt et le front de solvant

d: distance entre le centre de cercle de molécule et le dépôt

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : densité optique

E. coli : Escherichia coli

EA: échantillon lichens d'arbre

EM: échantillon lichens de mur

FeCl₃ : chlorure de fer

g : gramme

h : heure

HCL: chlorure d'hydrogène

HgCL₂ : chlorure de mercure(II)

Kg : kilogramme

KI : iodure de potassium

M : mur

mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

mm : millimètre

NA₂CO₃ : carbonate de sodium

NH₄OH: hydroxyde d'Ammonium

nm : nanomètre

Obs : observation

R : rendement

R_f : rapport frontal

v : volume

Introduction générale

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'anti biorésistance 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 et al., 2011 ; Fukuda; K., 2014**).

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.

Les produits naturels sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. Les lichens sont des organismes symbiotiques composés d'un champignon et d'une algue ou d'une cyanobactérie. Cette relation symbiotique leur confère l'incroyable aptitude à coloniser des habitats extrêmes, faisant d'eux de véritables pionniers. Ils 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 lichens font l'objet d'études phytochimiques approfondies afin de mettre à jour de nouveaux composés, qui pourraient trouver des applications dans des domaines tels que l'industrie pharmaceutique et cosmétique. En effet Parmi eux, l'acide usnique est proposé comme possible alternative aux parabènes, il possède de nombreuses propriétés biologiques, et notamment une activité antimicrobienne.

Les lichens 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, antiproliférative et cytotoxiques. Cependant, seulement des nombres très limités de substances de lichens ont été examinés pour leurs activités biologiques et leur potentiel thérapeutique dans la médecine(**Joël B. et al., 2005**).

Parmi les 1050 substances lichéniques décrites (**Stocker W., 2008**), seules quelques-unes sont disponibles commercialement, et le potentiel d'une grande partie d'entre elles reste peu 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 de comparaison entre deux lichens issus de différents substrats, de la région de Constantine, potentiellement intéressantes (sur le plan de quantité de métabolites secondaires et de qualité des molécules bioactives) et de la mise en place d'un Protocole d'extraction adéquat pour optimiser l'isolation des molécules bioactives.

Notre document est partagé en deux partie, la première réunit les généralités sur les lichens 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 à une séparation et purification par CCM, après un éventuel screening phytochimique qualitatifs pour caractériser les extraits de lichens étudiés, enfin un test biologique par l'évaluation de l'activité antibactériennes des extraits de lichens étudiés.

Revue bibliographique

I. Revue bibliographique

1. Définition des lichens

Un lichen est un champignon supérieur en symbiose avec une algue, le terme d'algue étant pris au sens le plus large. Le champignon est presque toujours un ascomycète et le lichen est nommé ascolichen. L'algue, le plus souvent, est un Chlorophyte (algue verte) : Chlorococcale, avec contenu cellulaire très vert, ou Trentepohlia (algue orange), avec cytoplasme contenant des gouttelettes d'huile, riches en caroténoïdes. Mais ce peut être aussi une Cyanophycée (algue bleue) avec contenu cellulaire vert bleuâtre ou vert brunâtre, entouré d'une enveloppe incolore, jaune brunâtre ou violet pourpre. Exceptionnellement chez quelques Verrucaria aquatiques, l'algue en symbiose est un Xanthophyte (algue jaune) avec contenu cellulaire vert jaune brunâtre. **(Bulletin, 1987).**

2. Habitat

Les lichens croissent dans les biotopes les plus divers. Ils manquent seulement dans la mer à des profondeurs supérieures à 10 mètres, au centre des grandes villes, où la pollution atmosphérique est importante, et sur les tissus animaux vivants. Cependant, des parties non vivantes de ces derniers sont des substrats pour les lichens: carapaces et coquilles d'animaux marins et, seulement dans les régions chaudes et très humides, carapaces de tortues et élytres de coléoptères. **(Bulletin, 1987).** En outre, des lichens peuvent se trouver sur les substrats les plus inhabituels : os, cuir, métaux, vitre, papier goudronné **(Bulletin.; 1987).**

3.Morphologie

Selon leur morphologie, les thalles lichéniques sont classés en 7 types fondamentaux :

3.1. Thalles lépreux

Association cohérente de granules (0,1-0,2 mm) constitués chacun d'un peloton d'hyphes associées à quelques cellules algales. Les thalles lépreux, considérés comme primitifs, parviennent à constituer de grandes surfaces farineuses **(Figure 1f)** **(Gavériaux J.,2008)**

3.2. 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 microlichens (**Figure 1e**) (**Gavériaux; J., 2008**).

3.3. Thalles 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. 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 (**Figure 1d**) (**Hassani L. et Djeddi K., 2013**).

3.4. Thalles foliacés

Les thalles foliacés 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. Ex : les *Umbilicaria* (**Figure 1c**) (**Gavériaux; J. 2008**).

3.5. 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 (**Figure 1b**) (**Hassani L et al., 2013**).

3.6. 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* (**Figure 1g**). (**Gavériaux J.-P , 2008**).

3.7. 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 (**Figure 1a**) (**Gavériaux J.-P, 2008**).

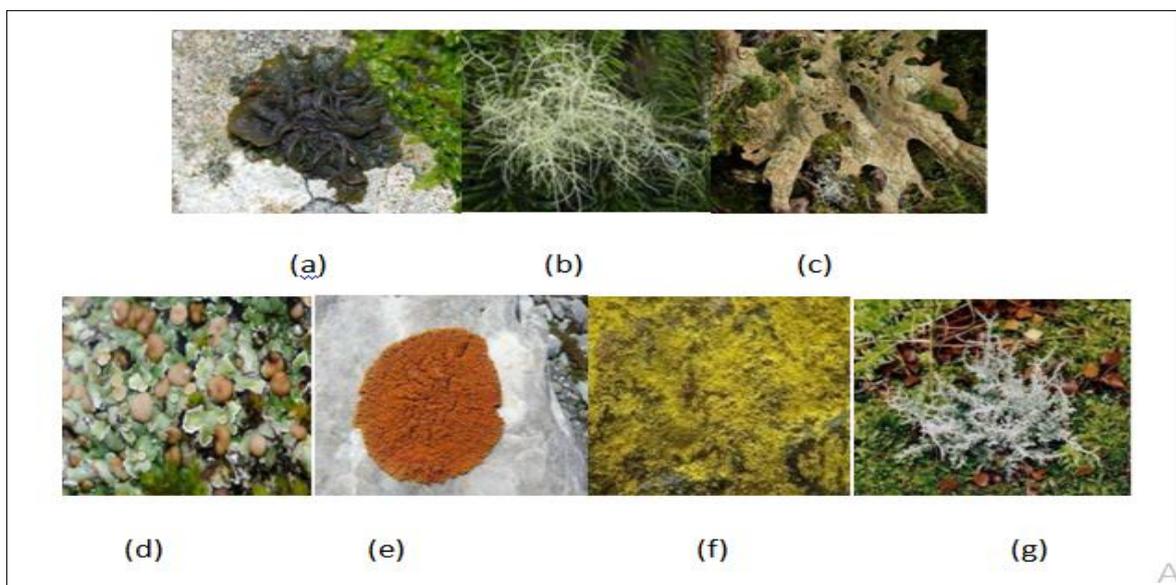


Figure 01 : Principal type de thalles rencontrés chez les lichens. (a) Thalle gélatineux de *Collema auriforme* ; (b) Thalle fruticuleux de *Usnea sp*; (c) Thalle foliacé de *Lobaria pulmonaria* ; (d) Thalle squamuleux de *Squamarina cartilaginea* ; (e) Thalle crustacé de *Caloplaca biatorina* (f) Thalle lépreux de *Chrysothrix chlorina* ; (g) Thalle complexe de *Stereocaulon corticatum*.

4. Reproduction des lichens

Les lichens sont capables de se reproduire selon deux modes : soit par **reproduction végétative**, soit par **reproduction sexuée** (rencontre des spores fongiques avec un photobionte). Chez la majorité des lichens, la reproduction sexuée est très largement prédominante, (Murtagh et al.; 2000).

4.1. Reproduction sexuée (champignon seul)

Les apothécies sont des organes qui indiquent la reproduction sexuée. La reproduction sexuée se déroule en deux phases :

Phase 1 : Dans le même thalle, des « hyphes + » et des « hyphes - » (sortes de filaments du champignon) fusionnent et forment des boutons appelés apothécies qui vont produire des spores.

Phase 2 : Ces spores facilement transportées par le vent vont constituer de nouveaux des hyphes asexués qui devront capturer et emballer une algue présente dans le milieu de façon à pouvoir donner naissance à un nouveau lichen.

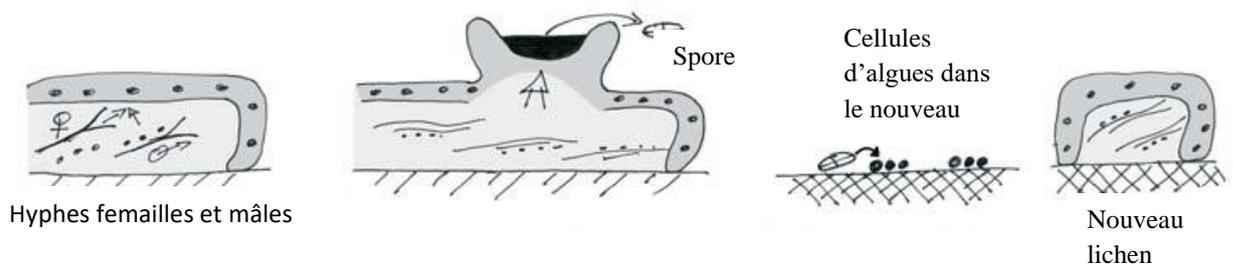


Figure 02 : Reproductions sexuées (champignon seul).

4.2. Reproduction asexuée (algue associée au champignon)

Les sorédies et les isidies qui contiennent à la fois le champignon et l'algue se réimplantent facilement et finissent par donner un nouveau thalle. Ces différents modes de reproduction permettent de coloniser de nombreux lieux. La reproduction asexuée s'accomplit selon deux modes :

4.2.1. Reproduction asexuée par sorédies

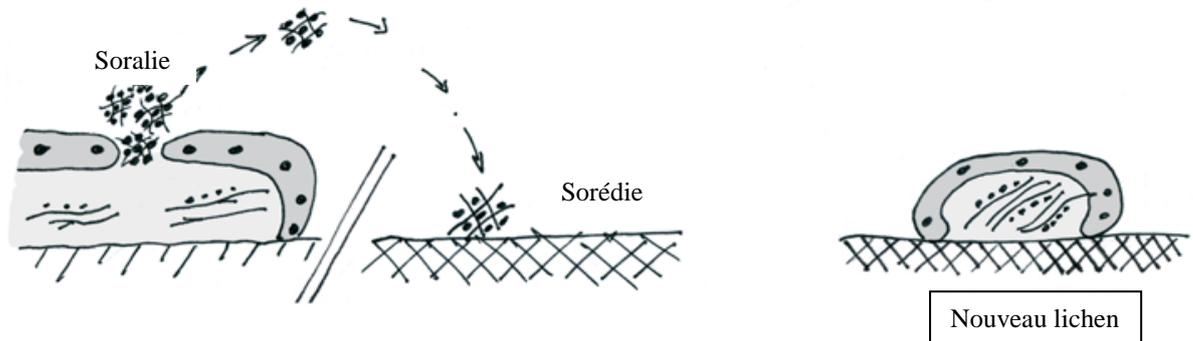


Figure 03 : Reproduction asexuée par sorédies.

Le thalle se déchire et laisse pousser des sortes de bosses appelées soralies de couleur différente de la surface du thalle. Ces soralies émettent de petits granules légers appelés sorédies qui se séparent facilement du thalle puis sont transportées par le vent ou les animaux. Les sorédies permettent la colonisation de nouveaux lieux parfois très éloignés.

4.2.2. Reproduction asexuée par isidies

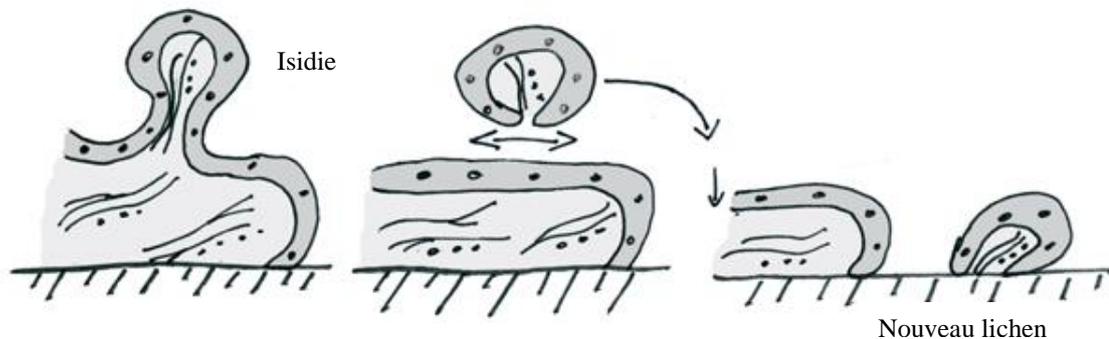


Figure 04 : Reproduction asexuée par isidies.

Le thalle émet des petits bourgeons de la même couleur que la surface du thalle appelés isidies. Ces isidies se détachent mais, plus lourdes, elles tombent à proximité et permettent la colonisation d'un même endroit (ex : parois rocheuses ou murs).

5. Métabolites lichéniques

Les produits lichéniques peuvent être divisés en deux groupes, soit les métabolites primaires et secondaires. Les substances naturelles primaires sont communes à plusieurs organismes et par définition, elles sont essentielles à la survie et la reproduction. Parmi les

composés primaires, on retrouve les acides aminés, les acides gras, les sucres, les protéines, les polyols, les caroténoïdes, les vitamines, etc., qui sont biosynthétisés par l’algue et le partenaire fongique. Ces composés sont dits intracellulaires, étant donné qu’ils se retrouvent dans la paroi cellulaire et dans les protoplastes, alors que les métabolites secondaires sont dits extracellulaires, comme ils se retrouvent à la surface de l’hyphe du champignon. Les composés secondaires ne sont pas essentiels à la survie de l’organisme, mais ils y jouent des rôles spécifiques, (**Claudia Carpentier, 2016**).

Les métabolites issus des lichens sont classés selon leur voie biosynthétique, cette classification a été proposée par **Asahina et Shibata en 1971**, puis a été améliorée par **Culberson et Elix en 1996** (**Claudia Carpentier, 2016**). Les lichens produisent une grande variété de métabolites secondaires de type phénolique qui proviennent pour la très grande majorité 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 lichéniques sont produits. Les différents types de composés lichéniques qui dérivent ces trois voies métaboliques sont présentés au **tableau 1**, (**Claudia Carpentier, 2016**).

Tableau 1 : Classes de métabolites secondaires.

Voie de biosynthèse	Type de composé	Nombre de composés
Voie des acétates Polymalonates	Acides aliphatiques, esters et dérivés	56
	Monoaromatique phénoliques	32
	Depsides, tridepsides et esters benzyliques	207
	Depsidones et diphényléthers	131
	Depsones	8
	Dibenzofuranes, acide usnique et dérivés	29
	Anthraquinones et dérivés	52
	Chromones et chromanes	13
	Naphtoquinones et bis-naphtoquinones	10
	Xanthones et bis-xanthones	78
Voie des mévalonates	Di-, sesquiter-, et tri-terpènes	88
	Stéroïdes	33
Voie de l’acide Shikimique	Terphénylquinones 2	2
	Dérivés de l’acide pulvinique 13	13

❖ 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**).

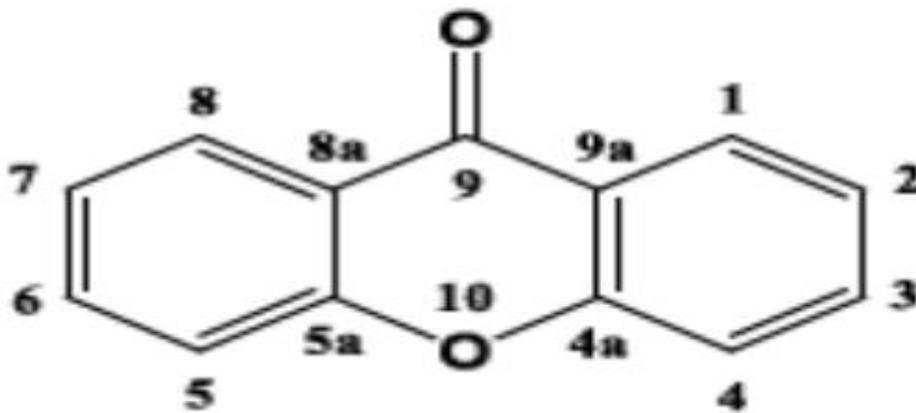


Figure 5 : Structure de base d'une xanthone (**Harck., 2015**).

❖ Voie de l'acide mévalonique

La voie de l'acide mévalonique (**Figure 6**) conduit essentiellement à la synthèse de mono-, di-, tri-, sester et sesquiterpènes, stéroïdes et caroténoïdes (**Huneck., 1999**). Pour la plupart, ils ne sont pas spécifiques des lichens et sont issus de l'assemblage d'unités isopréniques formées à partir de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) (**DIEU A. , 2015**).

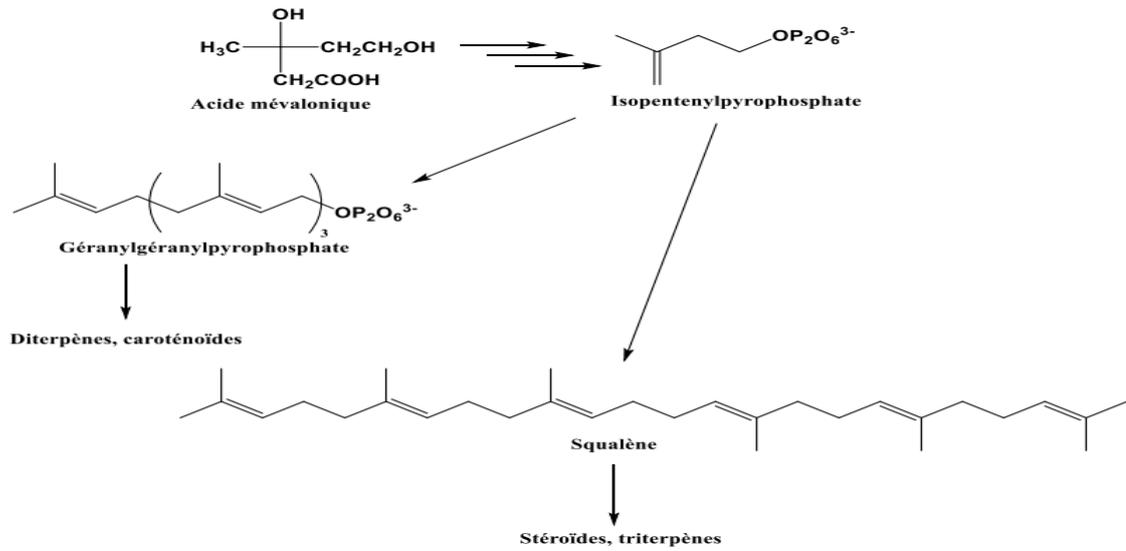


Figure 6 : Biogenèse des composés issus de la voie de l'acide mévalonique (DIEU A., 2015).

❖ Voie de l'acide shikimique

Cette voie (Figure 7) permet la synthèse d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) qui, chez les plantes, sont les précurseurs des flavonoïdes, des coumarines, ou encore des alcaloïdes. En revanche, chez les lichens, des composés atypiques, tels que l'acide vulpinique et la calycine, sont formés respectivement chez *Lethraria vulpina* et *Pseudocyphellaria crocata* (Stocker W., 2008). La phénylalanine serait le précurseur, via la formation d'acide polyporique, de l'acide pulvinique dilactone, lui-même à l'origine de la calycine (DIEU A., 2015).

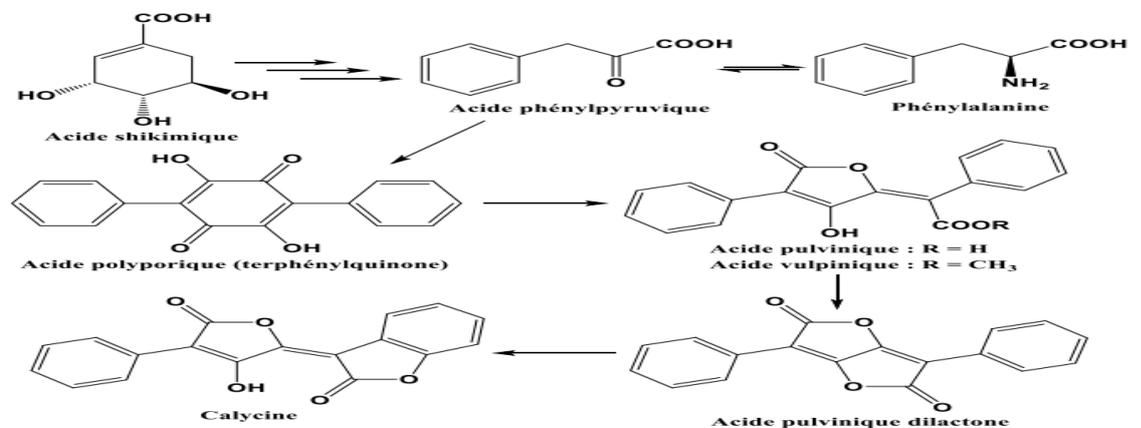


Figure 7 : Biogenèse et la voie de l'acide shikimique, de l'acide pulvinique et de la calycine (DIEU A., 2015).

❖ 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 (**Figure 8**)(DIEU A., 2015).

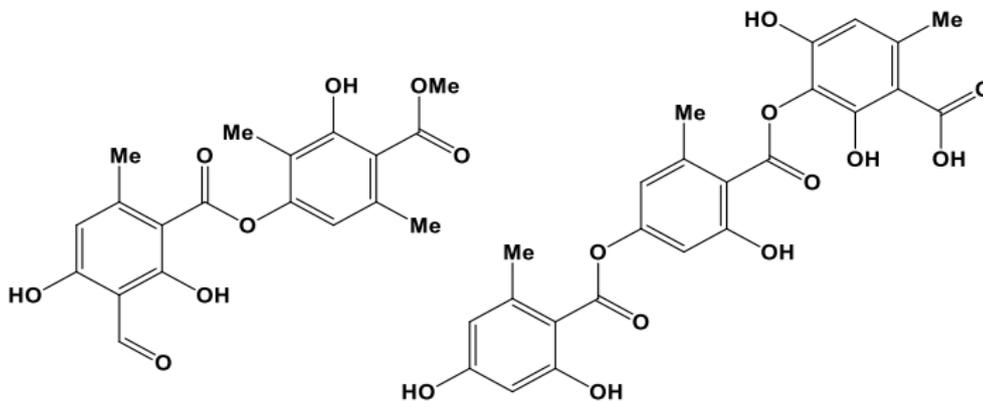


Figure 8 : Structure d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique) (DIEU A., 2015).

❖ L'acide usnique

L'acide usnique est le métabolite lichénique le plus commun et le plus étudié. Contrairement aux dibenzofuranes, il est issu du couplage oxydatif entre deux molécules de méthylphloroacétophénone. La voie de biosynthèse proposée, sous contrôle enzymatique, implique la méthylation du tétracétide avant cyclisation pour former la méthylphloroacétophénone, suivie d'un mécanisme radicalaire conduisant à la cyclisation et la formation de l'acide hydro-usnique. Enfin, une étape finale de déshydratation permettrait l'obtention d'acide usnique (**Figure 9**) (Taguchi et al., 1966, DIEU A., 2015).

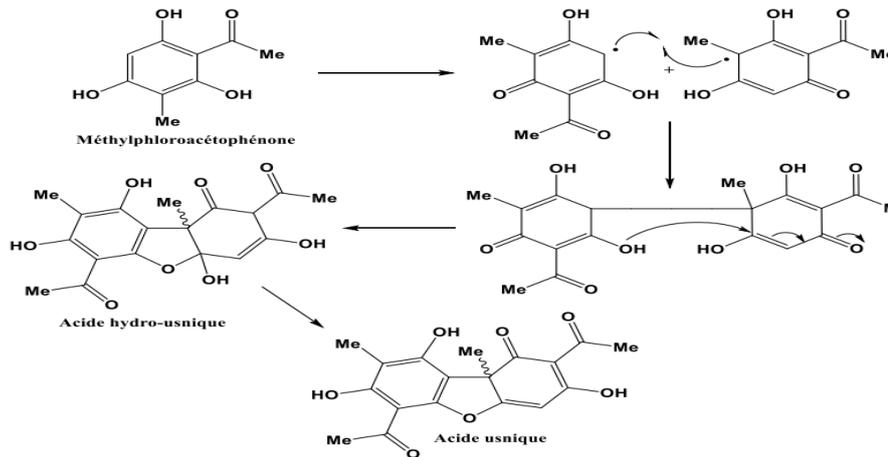


Figure 9 : Schéma de biosynthèse de l'acide usnique (DIEU A., 2015).

❖ Dérivés de l'acide usnique

Des dérivés de l'acide usnique sont également présents chez les lichens. Par exemple, les acides isousnique (Ingó l. , 2002), l'acide (-) placodiolique (Connolly et al., 1984 ; Millot et al., 2013) et l'acide (-) pseudoplacodiolique (Huneck et al., 1981). L'acide usnique a été identifié uniquement chez les lichens mais certains de ses dérivés sont décrits chez des champignons. Par exemple, la (-)-mycousnine, une phytotoxine, et la (-)- cercosporamide, dérivé amidé de l'acide usnique, ont été isolés respectivement de *Mycosphaerella nawae* et *Cercosporidium henningsii* (Figure 10) (Sassa et Igarashi, 1990 ; Conover et al., 1992).

❖ 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 certains micro-organismes endophytes (Figure 11) (Andrioli et al., 2012, DIEU A., 2015).

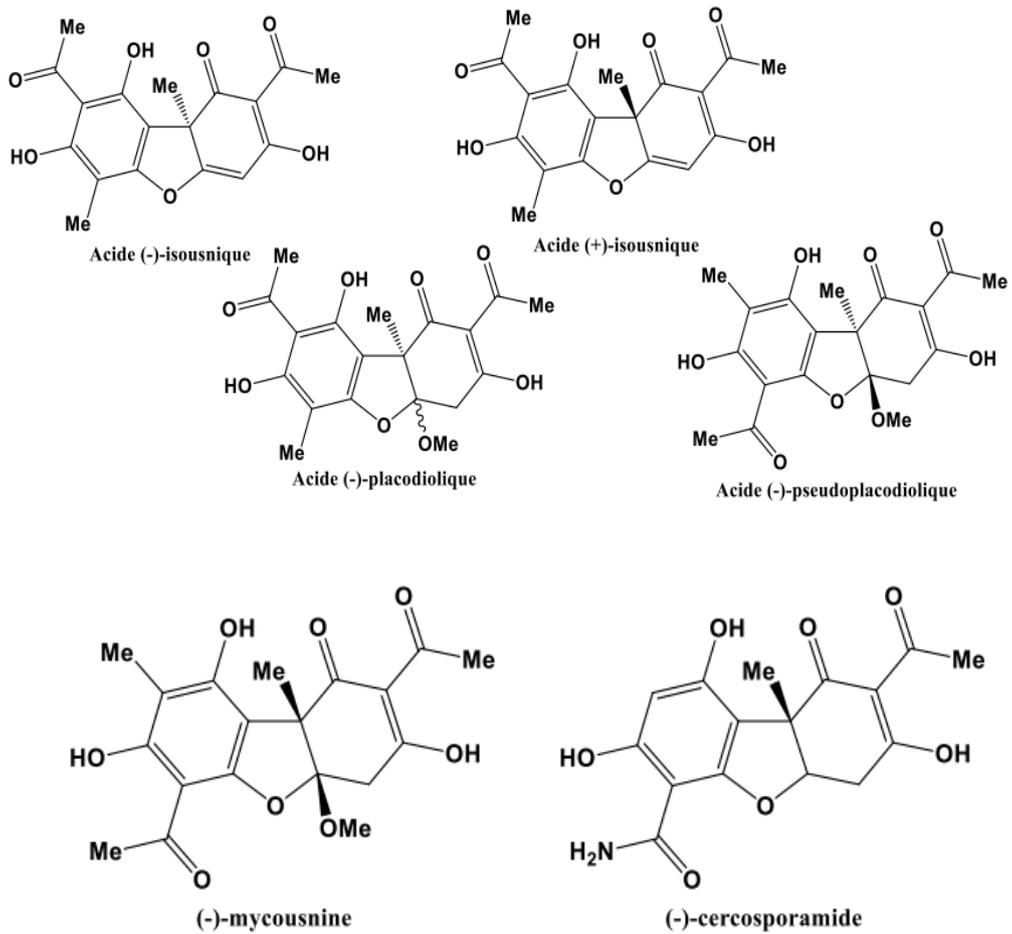


Figure 10 : Structure de quelques dérivés de l'acide usnique (DIEU A., 2015).

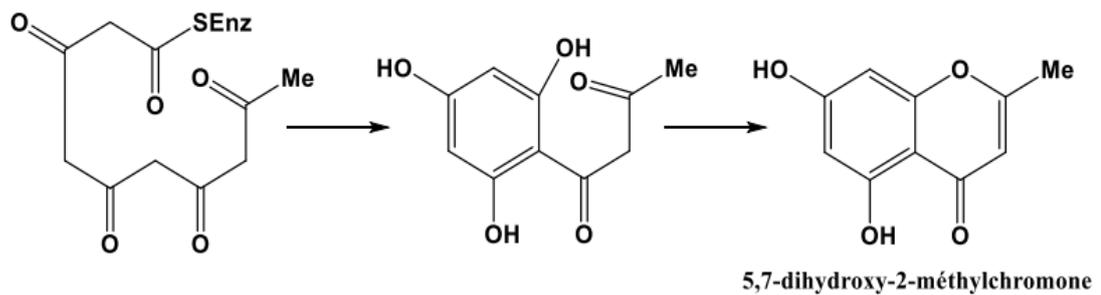


Figure 11 : Schéma de biosynthèse proposé pour les chromones (DIEU A., 2015).

❖ La biosynthèse des xanthones

La voie de biosynthèse proposée pour ces métabolites (**Figure 12**), implique la cyclisation d'une chaîne linéaire (octacétide) qui mène à l'obtention de la xanthone, avec la possibilité d'une benzophénone intermédiaire (**Masters et Bräse, 2012**). Au contraire, certaines xanthones plus inhabituelles, comme la raveneline issue du champignon *Helminthosporium ravenelii* (**Raistrick et al., 1936 ; Birch et al., 1976**), ou la thioméline isolée du lichen *Rinodena thiomela* (**Elix et al., 1987**), possèdent un groupement méthyle en position 3. Dans ce cas, la cyclisation du polycétide impliquerait un intermédiaire anthrone ou anthraquinone dont le clivage oxydatif conduirait à la formation d'une benzophénone. Cette dernière mènerait soit directement à l'obtention de la xanthone, soit à l'obtention d'un intermédiaire xanthone polyhydrogénée (tétrahydroxanthone) subissant des réarrangements pour former la xanthone (**Masters et Bräse, 2012**).

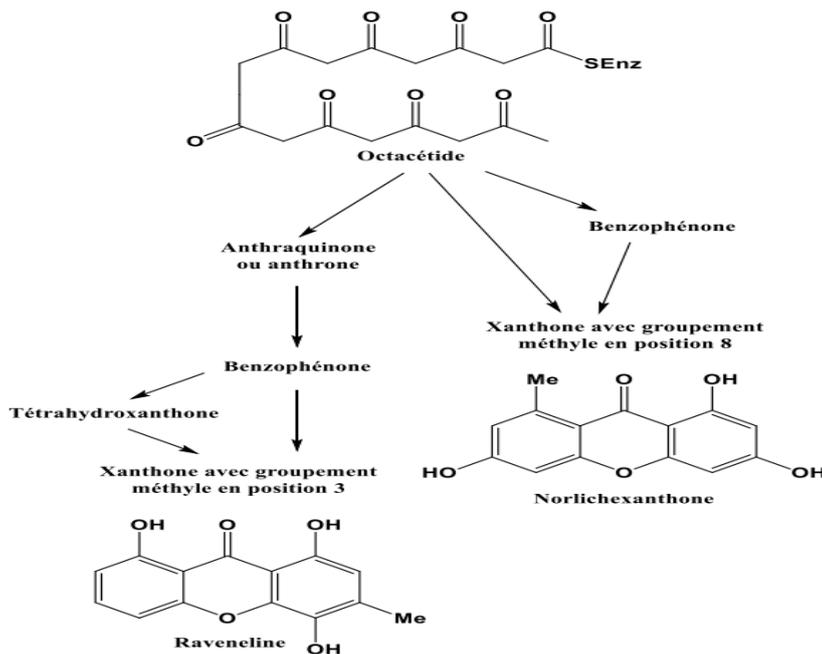


Figure 12 : Schéma de biosynthèse des xanthones chez les lichens (**DIEU Amandine.; 2015**).

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 *Cladonia coccifera*,

Usnea plicata, *Lobaria pulmonaria*, *Xanthoria parietina* et *Evernia prunastri* (**Saklani et Upreti.; 1992**).

Le lichen *Cetraria islandica*, ou « mousse d'Islande » utilisé contre la tuberculose, les bronchites chroniques, les diarrhées et permet 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**).

6. Bioindicateurs de pollution

Les espèces de lichens sensibles à la pollution sont utilisées comme bioindicateurs (**Gombert et al.; 2006 ; Thormann.; 2006**), 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 H., 1999 et Purvis , 2014**).

6.1. Rôle des métabolites secondaires

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant leur rôle (**Whittaker R. H., & Feeney, P. P.,1971**). Ils ne semblent pas essentiels à la croissance végétale, mais peuvent jouer un rôle important dans les mécanismes de défense contre les agressions extérieures (**Stead P et al, 1998 ; Fahselt D., 1994**). Notamment, certains métabolites tels que les anthraquinones, pourraient agir comme pigments accessoires, permettant en condition de faible luminosité de capter l'énergie solaire ou à l'opposé, de protéger l'organisme contre les effets nocifs induits par les radiations solaires (**Fahselt D., 1994**). Outre leur rôle comme agents protecteurs contre les stress physiques, les métabolites secondaires interviennent dans les mécanismes de défense dirigés contre divers organismes. Par exemple, les terpènes et les dibenzofuranes possèdent des propriétés antibactériennes et antifongiques (**Rowe; J. G.; et al.; 1991**).

Le potentiel thérapeutique des lichens est depuis longtemps exploité par la médecine douce. Différentes préparations provenant de lichens ont montrées des effets analgésiques, antipyrétiques, antibactériens et antifongiques (**Huneck S., 1999**). Plus récemment, les tests de criblage d'activité biologique ont démontré non seulement leur action anti-inflammatoire (**Kumar S et al, 1999**). mais aussi leur potentiel antibiotique (**Cardarelli M. et al, 1997**). L'évaluation de l'activité biologique a également révélé des propriétés pesticides (**Dayan F. et al, 2001**), phytotoxiques, antitumorales, antiprolifératives, antimitotiques, antioxydantes et antivirales (**Yamamoto Y et al, 1995**). Cependant, les lichens du genre *Cladina* ont été bien moins étudiés que les *Usnea*, *Parmellia* et *Cladonia*. Quelques travaux rapportent que plusieurs métabolites bioactifs issus d'autres lichens sont également présents chez le 25 genre *Cladina*. C'est le cas pour l'acide usnique (21) et l'acide atranorique (14), composés majeurs chez *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina* respectivement (**Huovinen K., et al ,1986**).

Matériel et Méthodes

3. Extraction Acétonique (Macération)

3.1. Principe

La macération est une méthode consiste à laisser la poudre de la plante 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'acétone est classiquement utilisé pour l'extraction des métabolites secondaires lichéneuse, l'extraction peut être effectuée à température ambiante pendant plusieurs heures (**Vila J 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 J. et al., 2011**).

3.2. Mode opératoire

10g de poudre ont été macéré avec 100ml d'acétone à concentration (0.791kg/l) dans une erlenmeyer, après agitation, le mélange a été laissé 24h.

Après 24h de macération on a procédé à une filtration pour récupérer l'extrait (filtrat), cette macération est répétée deux fois pour les deux échantillons de lichens,

L'extrait obtenu a été mis à l'évaporateur rotatif pour sécher le solvant, et récupérer l'extrait brut concentré (**Figure 14**).

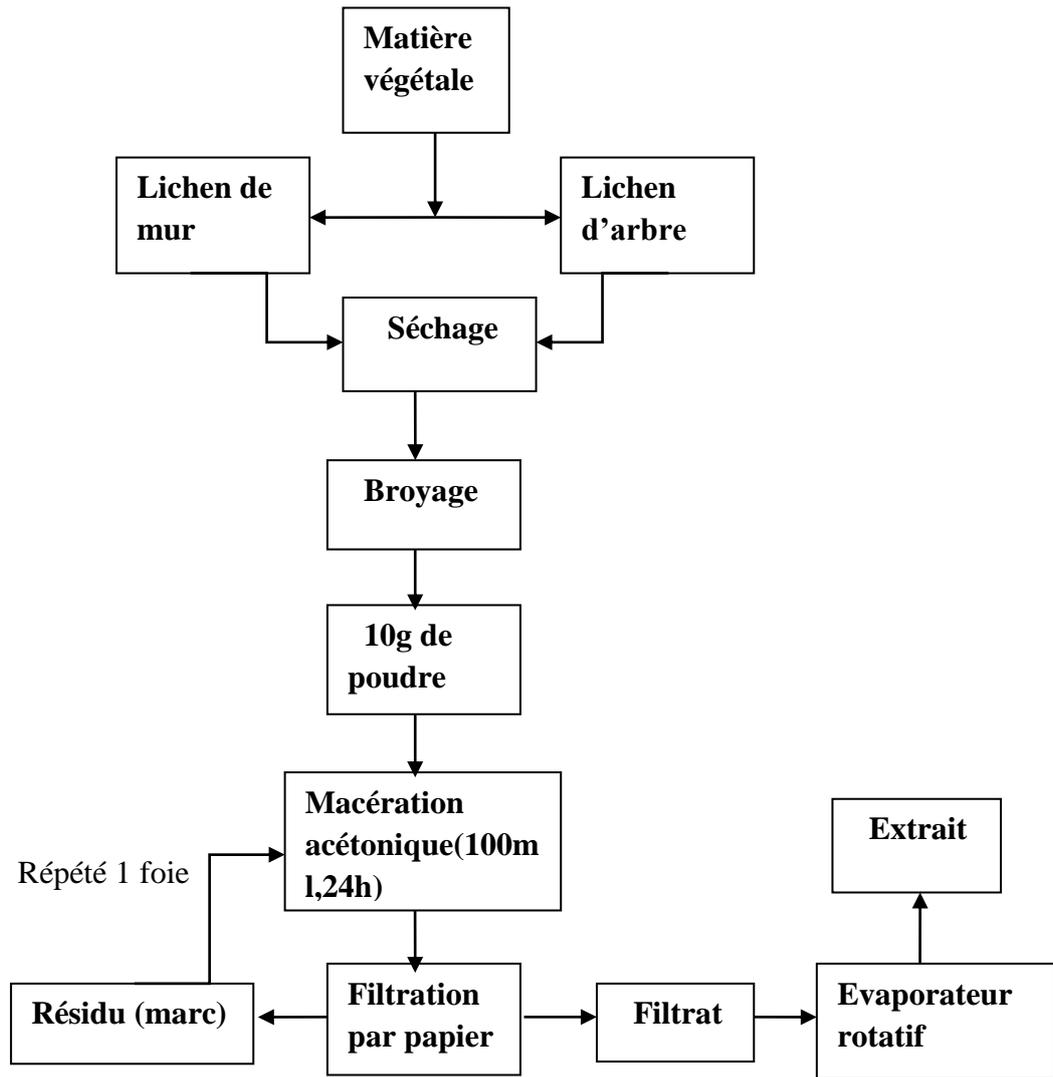


Figure 14 : Le Protocol d'extraction acétonique de deux matières de lichens.

3.3. Paramètre calculé

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.

4. Analyse par Chromatographie sur couche mince « CCM »

Les analyses par chromatographie sur couche mince CCM visent à évaluer la complexité des extraits bruts et à les fractionner grossièrement.

4.1. Principe

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants; elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La chromatographie sur couche mince, ou sur plaque (CCM), est effectuée surtout en vue d'une analyse d'un mélange. La phase stationnaire solide est fixée sur une plaque, et la phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou un mélange de solvants. On dépose sur la phase fixe une petite quantité du mélange à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile. La phase mobile migre de bas en haut, par capillarité, le long de la phase fixe en entraînant les constituants du mélange. C'est le phénomène d'élution, qui permet la séparation des constituants du mélange à analyser. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (R_f)

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du « R_f » avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques; même R_f) (Andriamialihariso, 2001).

4.2. Mode opératoire

Nous avons pris une plaque CCM d'aluminium contenant le gel de silice (phase stationnaire) sur la quelle on a tracé la ligne de départ (dépôt) et la ligne de front, à l'aide d'une micropipette on a déposé (20 μ l) d'extrait lichénique, sécher les gouttes à l'air libre pour concentrer l'extrait.

Ensuite on a préparé la phase mobile (éluant) par mélange de 3 solvants : (70ml de toluène /20ml d'acétate d'éthyle/5ml d'acide formique (v/v/v)), qu'on a mis dans une cuve à chromatographie, et nous avons mis la plaque CCM, fermer la cuve pour éviter l'évaporation du solvant.

Une fois l'éluant a atteint la ligne de front, on a enlevé la plaque CCM, laisser séché. Les spots de séparations sont entourés à l'aide d'un crayon et observé à la lumière visible grâce à un réactif révélateur « la vanilline ». Les chromatogrammes sont ensuite examinés sous UV (visible) et les bandes observées ont été entourées. La couleur des bandes sous UV a été notée et le front servira pour calculer le rapport frontal (Rf).

La Détection des spots s'est fait grâce auréactif révélateur « la vanilline » (composée de 1g de vanilline+100ml de méthanol+2ml d'acide sulfurique).

4.3.Paramètres calculés

Le rapport frontal **Rf** est calculé par l'équation suivante :

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

5. Les Tests Phytochimiques des extraits de lichens

5.1. Test de Tanins/polyphénols (test du FeCL3)

Dans un tube à essai nous avons mis (2ml) d'extrait lichénique, ajouter une goutte de Fecl3 à 2% (2g de Fecl3+100ml d'eau distillée), l'apparition de coloration bleu noirâtre ou verte foncée indique la présence de polyphénols ou tanins (**Alain et al, 2010**).

5.2. Test d'Anthocyanes

5.2.1. Préparation de l'infusé à 10%

(10g) de poudre ont été mise dans (100ml) d'eau bouillante, filtrer après 20 min.

- mettre quelques (ml) de l'infusé dans un tube à essai et ajouter quelques gouttes d'HCL pur, puis on observe le changement de la couleur, ensuite on rajoute quelques gouttes de l'NH4OH, le changement de la couleur indique la présence d'Anthocyanes. (**Paul W., 2012**).

5.3. Test de Stérols/Polyterpènes (test de Liebermann-Büchard)

Nous avons mis (5ml) d'extrait dans un tube à essai, laisser évaporé dans un bain de sable à 100°C de la plaque chauffante, Le résidu est dissout à chaud dans (1 ml) d'anhydride acétique ; ajouter (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 indique la présence de stérols ou polyterpènes (Alain et al, 2010).

5.4. Test d'Alcaloïdes (test de Mayer)

Dans un tube à essai contenant (3ml) d'acide sulfurique à 1% nous avons ajouté (1ml) d'extrait lichénique, puis nous avons mis les tubes dans un bain marie à 100°C pendant 5min, après refroidissement on ajoute 5gouttes de réactif de Mayer, l'apparition de précipité blanc indique la présence d'alcaloïdes (Rosine C., 2009).

5.5. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux dans les différents extraits a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999).

5.5.1. Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolibdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), il est réduit par les phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}), (Ribéreau Gayon et al. ; 1972). Cette coloration bleue dont l'intensité est proportionnelle aux taux de composés phénoliques présents dans le milieu donne un maximum d'absorption à 760 nm.

5.5.2. Mode opératoire

On introduit 200µl des extraits acétoniques dilué à 1ml de Folin ciocalteu à 2% et 800µl de carbonate de sodium Na_2CO_3 à 7,5%.

On complète avec l'eau distillé jusqu'à atteindre 3ml .on prépare dans les mêmes conditions le blanc avec de l'eau distillée à la place de la solution des lichens puis on porte les tubes à l'étuve à 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 ont été réalisées en triplicata.

5.5.3. Expression des résultats

Les concentrations des polyphénols totaux contenus dans les extraits de lichen ont été 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.

5.6. Dosage des Flavonoïdes

L'estimation de la teneur en flavonoïdes totaux contenus dans les extraits de lichen a été réalisée par la méthode de **(Bahorun et al., 1996)**.

5.6.1. Principe

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

5.6.2. Mode opératoire

Nous avons fait une dilution de l'extrait lichénique (1ml d'extrait+10ml d'eau distillée)
- 1 ml de chaque extrait de lichen a été dilué, ou standard (quercétine), et mélangé avec 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2% dans le méthanol).

- Dans les mêmes conditions un témoin a été préparé avec de l'eau distillée à la place des extraits de lichens.

- Après 10 minutes d'incubation a été réalisée température ambiante.
- L'absorbance a été lue à 415 nm contre un blanc dans un spectrophotomètre.
- Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata.

5.6.3. Expression des Résultats

La concentration des flavonoïdes a été déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$).

6. Détermination de l'Activité antibactérienne

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 W.N et al, 2006)**.

6.1. Principe

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.

6.2. Mode opératoire

6.2.1. Préparation de la solution mère de l'extrait

(1ml) de l'extrait acétonique est solubilisé dans (0,5 ml) de DMSO, puis compléter par (0,5ml) d'eau distillée pure. Afin de préparer une solution mère de (200mg /ml). Ensuite cette solution a été stérilisée à l'autoclave (121°C pendant 15min).

6.2.2. Préparation des disques

Des disques de papier buvard de 6mm de diamètre ont été imprégnés de l'extrait.

Des disques témoins ont été aussi préparés :

- Disque imprégné de l'eau physiologique stérile.
- Disque imprégné de mélange d'eau physiologique et DMSO (V/V).
- Disque imprégné d' un antibiotique de référence.

6.2.3. Micro-organismes utilisés

❖ *Escherichia coli*

C'est une bactérie à Gram négatif, commensale 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, les diarrhées d'été ,diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (Percival. ; 2004).

❖ *Pseudomonas aeruginosa*

Ce sont des bacilles à Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles

grâce à 1 à 2 flagelles, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (Percival, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales (Van Delden et Iglewski, 1998, Harrar A., 2012).

6.2.4. Méthode de diffusion en milieu gélosé

On a préparé des colonies jeunes de bactéries de 18h à 24h puis une suspension bactérienne a été réalisée dans l'eau physiologique stérile, on a mesuré la DO de cette suspension jusqu'à avoir la même DO de Mc Farland (une suspension de 0,1 à 0,12 nm lue à une longueur d'onde de 600 à 620nm).

- Des bactéries ont étéensemencées sur des boîtes de pétrie contenant la gélose Muller Hinton (milieu MH) : mettre quelques gouttes de la suspension de bactéries et à l'aide d'un râtelier étaler sur toute la surface.
- Les disques imprégnés de (20 µl) d'extrait sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose.
- Les boîtes ont été laissées pendant 1h à température ambiante pour une rediffusion des substances.
- Incuber à 37°C à l'étuve pendant 24h.

6.2.5. Expression des résultats

- L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'incubation autour de chaque disque (en mm).
- Le diamètre d'inhibition a été mesuré contre le diamètre d'antibiotique de référence.

Résultats et Interprétation

III. Résultats et interprétations

1. Résultat de rendement total d'extractions RE_T

Les résultats du rendement d'extractions totale RE_T% de l'extrait de lichen provenant de deux sources de substrats différent (roche et arbre) sont présentés dans le **Tableau 2**.

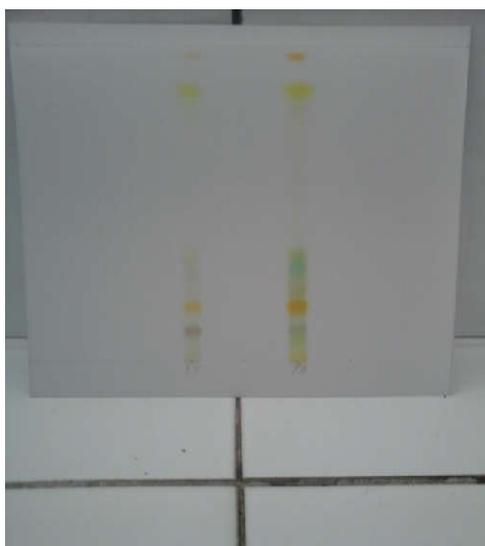
Tableau 2 : le rendement total d'extractions RE_T par l'acétone des deux extraits de lichens

	lichen du mur	lichen de l'arbre
Poids sec (g)	10	10
RE _T %	42.1	53.1

D'habitude les métabolites secondaires des lichens sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organique, ces substances ont été surtout identifiées comme lactones (ex : protolichessterinic acid), composés phenoliques (ex : atranol and resorcinol) depsides (ex : diffractic acid), dérivé de l'acide pulvinique (ex : vulpinic acid), dibenzofurans et acide usnique (**Khanuja et al., 2007 ; Ranković et al, 2008 ; Gomes et al., 2002**). La technique la plus efficace pour l'extraction de substances de lichen a été à l'origine proposée par Solhaug et Gauslaa (1996) et consiste à plongé le thalle sec dans l'acétone pure plusieurs fois pendant une période allant de quelques minutes à plusieurs heures (**Fabio C et al,2017**).

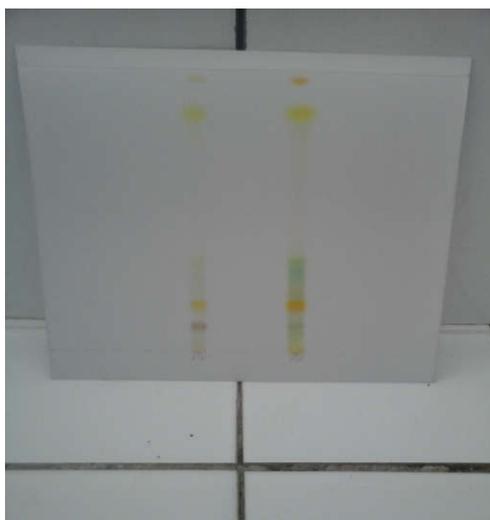
L'extraction acétonique des lichens récoltés a donné un rendement d'extraction RE% allant de 42.1% jusqu'à 53.1 % pour les lichens provenant des murs et du tronc d'arbre respectivement.

2. Résultat de l'analyse par « CCM »



Détection aux visibles
avant révélation

EM EA



Détection aux visibles
Après révélation

EM EA

Figure 15 : Chromatogramme des extraits lichéniques, avant et après révélation avec la vanilline Sous la lumière visible, a gauche extrait de lichen de mur(EM), a droite extrait de lichen d'arbre (EA).

L'analyse par CCM des extraits acétonique de *Xanthoria parietina* révèle un nombre des spots de lichen d'arbre plus grand (5) par rapport aux nombre des spots de lichen de mur (4),

Le profil de migration est différent dans les deux extraits et semblerait être influencé par le substrat du lichen ou plus exactement l'environnement dans le lichen se développe.

3. Calcul de rapport frontal : $R_f = d/D$

Tableau 3 : Profil chimique de la migration des extraits acétoniques des lichens dans la CCM.

	les spots	couleurs	Rf (%)
E d'arbre	1	Vert claire	0.18
	2	Orange	0.31
	3	Vert	0.35
	4	Jaune	0.87
	5	Violet	0.97
E de Mur	1	Brune	0.1
	2	Jaune foncé	0.18
	3	Jaune	0.87
	4	Violet	0.96

D'après le tableau ci-dessus, on constate que les deux spots jaune et violet avec R_f : 0,87 et 0,97 respectivement se retrouvent dans les deux extraits de *lichens* étudiés.

On retrouve des taches de couleur et R_f différents en fonction du substrat (lieu de développement du lichen) d'où provient le lichen : le lichen de murs (saxicoles), contient une substance de couleur brune avec un $R_f = 0,1$ qu'on ne retrouve pas chez le lichen d'arbre (corticoles), cette dernière comporte des substances distinctes tels que spot Orange (R_f 0.31), spot vert ($R_f = 0.35$), spot violet ($R_f = 0.97$).

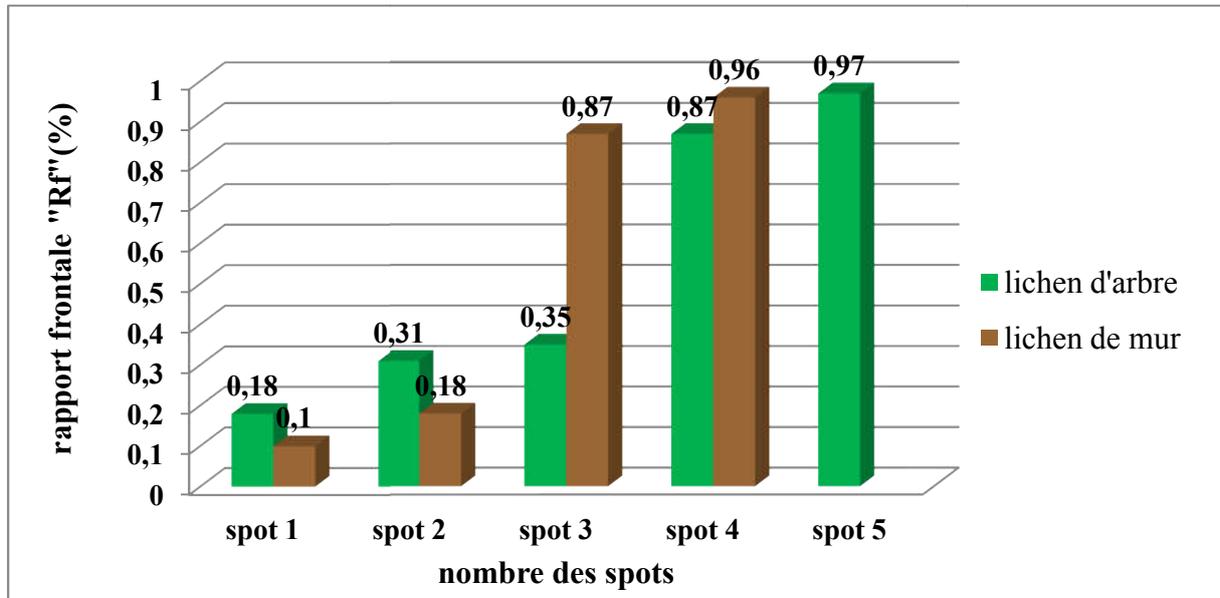


Figure 16 : pourcentage obtenue après la calcul de « Rf ».

4. Résultats des Tests phytochimiques

4.1. Résultats du screening chimiques

Les résultats du screening phytochimique des deux extraits lichéniques obtenus par macération acétonique sont regroupés dans le **tableau 5**.

Les résultats du screening chimiques des extraits indiquent la présence des tanins et des poly phénols et l'absence d'anthocyane

Dans l'extrait de lichen d'arbre il y à une coloration violet puis vert indique la présence de stérol et de polyterpène par contre l'extrait de lichen de mur montre une absence de stérol et de polyterpène (absence de la coloration violette).

L'absence du précipité blanc dans les deux extraits lichéniques montre l'absence d'alcaloïdes dans les deux extraits de lichen.

Il ya une grande diversité des métabolites secondaires des lichens, la littérature rapporte, qu'il y aurait environ 1050 métabolites spécialisés décrits chez les lichens et de nombreux autres restent encore à caractériser.

Certains de ces métabolites de lichen sont impliqués dans le maintien de l'équilibre symbiotique (**Huneck, 1999**), tandis que d'autres dissous roches (rocks) pour le meilleur attachement(pièce jointe) de lichens (**Seaïeunrd. 1997**).

Tableau 4 : Résultats du screening chimiques des extraits des deux lichens.

Le métabolite recherché	Le test	Résultats (couleur)		Obs (+ /-)
Polyphénols/Tanins	Test du FeCL3	EA	Vert foncé	+
		EM	Vert foncé	+
Anthocyanes		EA	Pas change	-
		EM	Pas change	-
Stérols/Polyterpènes	test de Liebermann-Büchard	EA	Violet puis vert	+
		EM	Pas change	-
Alcaloïdes	test de Mayer	EA	Pas de précipite blanc	-
		EM	Pas de précipite blanc	-

(+) : Présence.

EA : extrait de *Xanthoria parietina* de substrat arbre.

(-) : absence.

EM : extrait de *Xanthoria parietina* de substrat mur.

4.2. 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 17**.

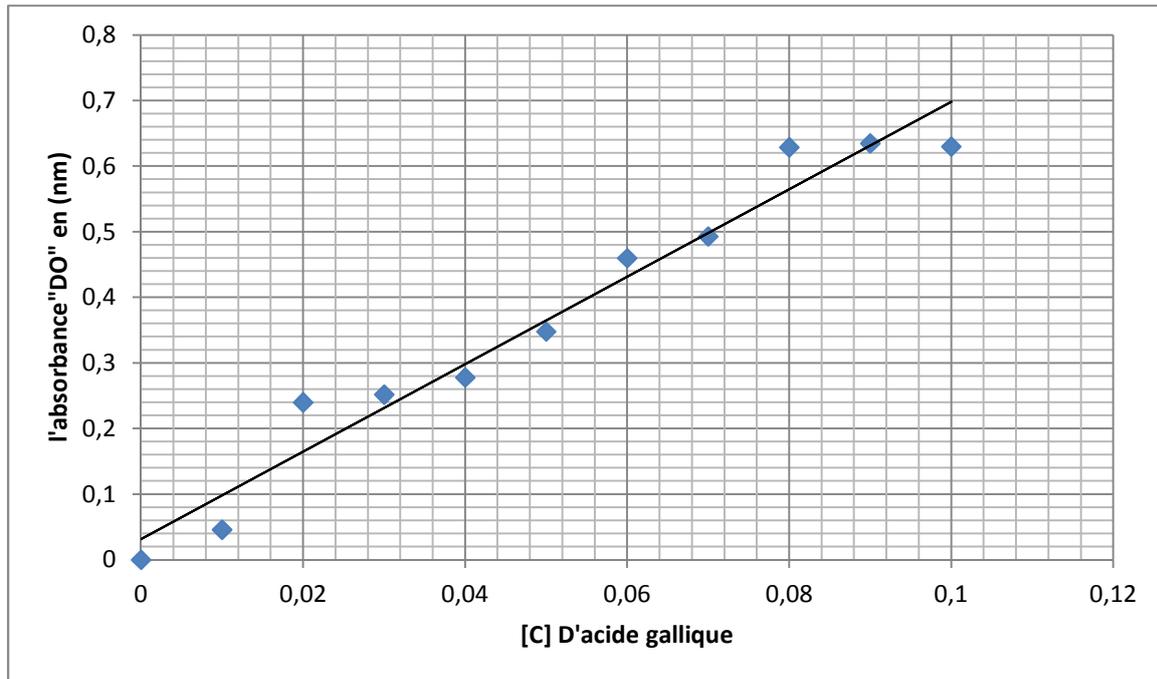


Figure 17 : la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Tableau 5 : Teneur en poly phénols des extraits acétonique de lichen.

	Extrait A	Extrait M
Quantité de poly phénol totaux En mg EAG/g	0,081 ±0,0047	0,044 ± 0,0068

EAG : équivalent d'acide gallique **A** : extrait d'arbre **M** : extrait du mur

Les teneurs en poly phénols totaux des deux extraits varient entre 0,081 à 0,044mg EAG/g . La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait acétonique de lichen du tronc d'arbre, avec un taux $0,081 \pm 0,0047$ mg EAG/g ES, par rapport à l'extrait acétonique de lichen du mur, où nous enregistrons des teneurs de l'ordre de $0,044 \pm 0,0068$ mg EAG/g

Tableau 5.

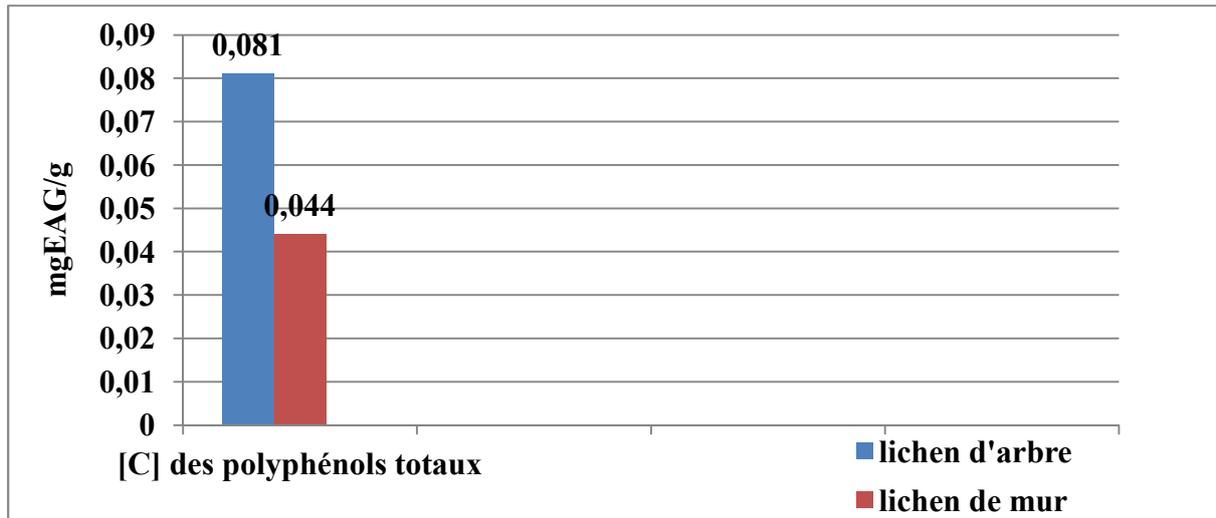


Figure 18 : Concentration des polyphénols des extraits acétonique des deux lichens.

4.3. Résultats du dosage des Flavonoïdes

La courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine à différentes concentrations en suivant la méthode de (Bahorun et al.; 1996) Figure 19.

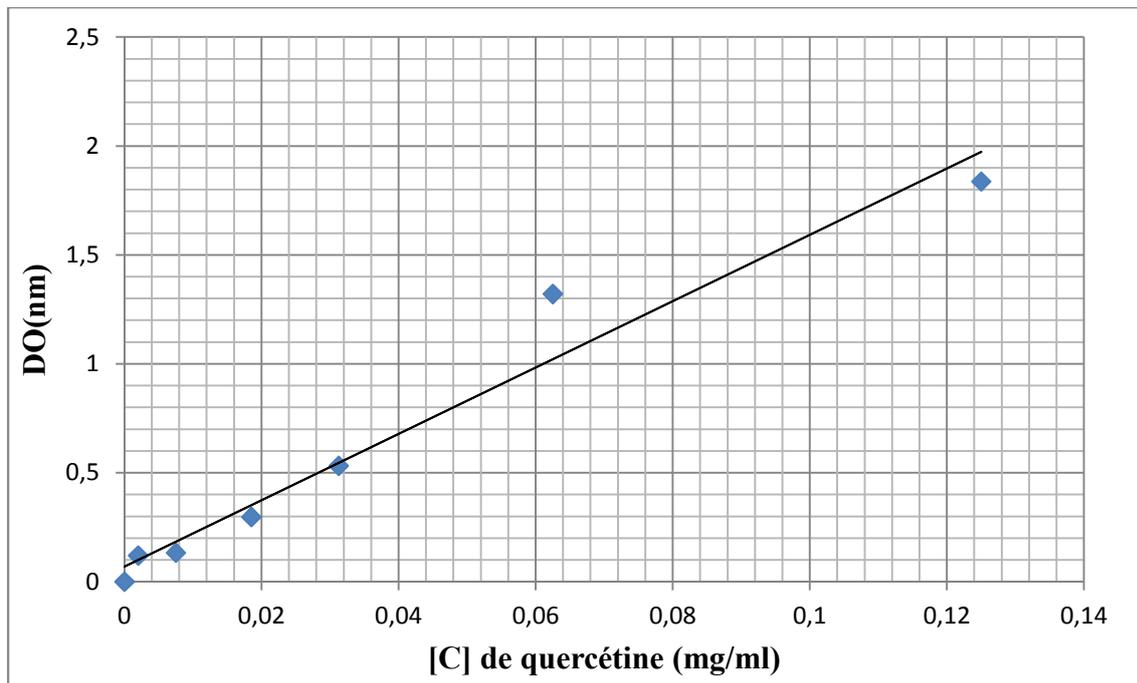


Figure 19 : Le courbe étalonnage de quercétine .

Tableau 6 : Teneur en flavonoïde totaux dans les extraits acétoniques des deux lichens.

	Extrait A	Extrait M
Quantité des flavonoïdes totaux (en mg EQ/g)	0,058 ± 0,006245	0,061 ± 0,007

EQ : équivalent de quercétine **A :** extrait d'arbre **M :** extrait du mur

Les résultats présentés dans le Tableau 6 montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient légèrement entre les deux extraits, dont l'extrait acétonique de lichen d'arbre renferme des teneurs plus faibles (0,058 mg EQ/g) comparativement à l'extrait acétonique du lichen de mur (0,061 mg EQ/g).

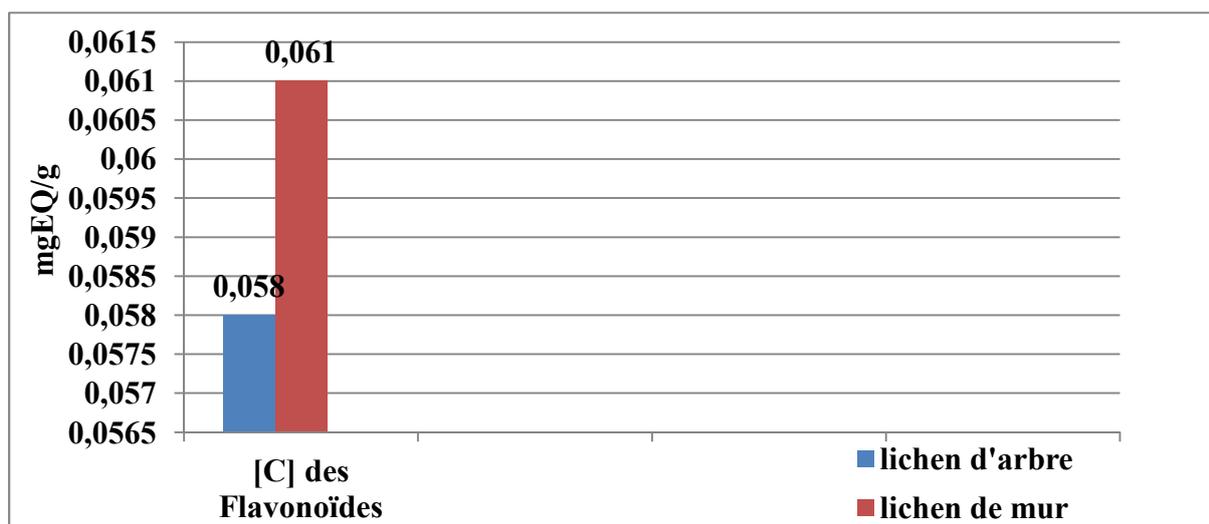
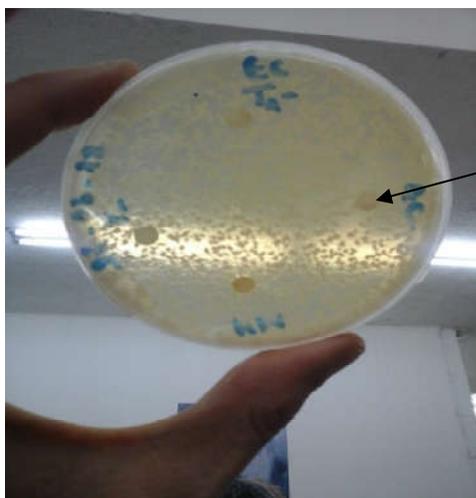


Figure 20 : Concentration des Flavonoïdes des extraits acétoniques des deux lichens.

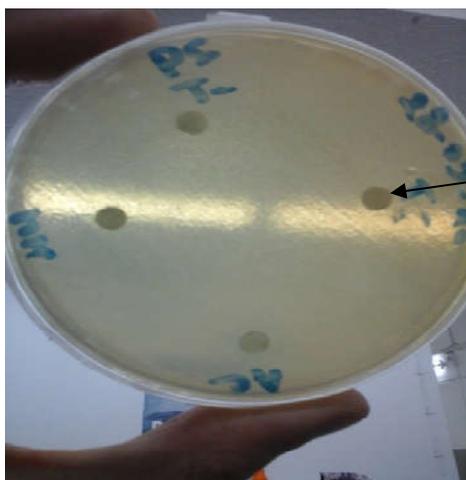
5. l'Activité antibactérienne de deux extraits lichéniques

(A)



Aucune zone d'inhibition au tour des disques imprégnés de l'extrait de lichen sur **E. coli**

(B)



Aucune zone d'inhibition des disques imprégnés de l'extrait de lichen sur **Pseudomonas**

Figure 21 : Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa* (A) et *Escherichia coli* (B) aux extraits acétoniques des lichens.

L'extrait acétonique de lichen n'a provoqué aucune zone d'inhibition comparativement au control positif (les antibiotique appropriés) sur la multiplication des bactéries

« *Pseudomonas aeruginosa* que *Escherichia coli* »

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

Conclusion Générale

Conclusion

Dans le but de comparer entre deux échantillons de lichens provenant de deux substrats différents « mur et arbre » de la région de Constantine, on a procédé à plusieurs analyses : une caractérisation phytochimique, analyse par CCM, dosage de certains métabolites secondaires et détermination de l'activité antibactérienne.

On a constaté que les deux extraits de lichens contiennent des tanins et des polyphénols et ne contiennent pas d'anthocyanes et des alcaloïdes, l'extrait de lichen d'arbre indique la présence des stérols et des polyterpènes contrairement à l'extrait de lichen du mur.

La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait acétonique de lichen provenant du tronc d'arbre, avec un taux $0,081 \pm 0,0047$ mg EAG/g, par rapport à l'extrait acétonique de lichen du mur, où nous enregistrons des teneurs de l'ordre de $0,044 \pm 0,0068$ mg EAG/g. Les teneurs en flavonoïdes totaux varient légèrement entre les deux extraits, l'extrait acétonique de lichen d'arbre renferme des teneurs plus faibles ($0,058$ mg EQ/g) comparativement au lichen du mur ($0,061$ mg EQ/g).

Concernant l'activité antibactérienne, on a noté une absence pour les deux extraits de lichens.

Il serait intéressant de compléter cette étude par d'autres travaux pour détecter le maximum des composés bioactifs des extraits lichéniques, tels que : l'isolation et l'identification des métabolites secondaires par HPLC, spectrométrie de masse et résonance magnétique nucléaire « RMN », fluorescence, diffusion de lumière électronique...etc

Références bibliographiques

V. Références bibliographiques

A

- **Aboya MJ., (2013)**, Résistance bactérienne et phytomolécule antimicrobienne issues de *Morinda morindoïdes*. Thèse de Doctorat de l'Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, 184 p.
- **Adriana Basile , Daniela Rigano , Stefano Loppi , Annalisa Di Santi , Angela Nebbioso , Sergio Sorbo , Barbara Conte 1, Luca Paoli , Francesca De Ruberto , Anna Maria Molinari, Lucia Altucci , and Paola Bontempo ,** Antiproliferative, Antibacterial and Antifungal Activity of the Lichen *Xanthoria parietina* and Its Secondary Metabolite Parietin *Int.J.Mol. Sci.* (2015), 16, 7861-7875p; doi:10.3390/ijms16047861.
- **Agroum S, Koucha S., (2016)**, Evaluation de l'activité antioxydante *in vivo* et hypoglycémante des composés phénoliques d'extraits du lichen *xanthoria parietina* de la région de Boumerdès, Université M'Hamed Bougara Boumerdès, 31p.
- **Ait hammou et al., (2013)**, Inventaire des lichens du chene vert (*Quercus rotundifolia*) De La Foret Communale Guezoul de Tiaret. *Revue Ecologie-Environnement* (9).
- **Alain Dit Philippe Bidie Banga B. N'guessan Adou F. Yapo, Jean David N'guessan & Allico Joseph D., (2011)**, Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *science et nature.* 8 (1), 1 – 11p.
- **Andriamialiharisoa R.F., (2011)**, Metabolites secondaires particuliers des feuilles de cinq populations de *mascarocoffea* Et des endophytes des feuilles de *Coffea* sp A 315 ,mémoire magiter, Université D'Antananarivo.

B

- **Bahorun et al., (1996)**, La méthode du trichlorure d'aluminium est2p.
- **Bergogne-Berezin et Dellamonica., (1995)**, Antibiothérapie en pratique clinique - Eugénie Bergogne-Bérézin
- **Billing et Sherman., (1998)**, Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. - NCBI.

- **Bulletin de la société Baranique du Centre-Ouest**, nouvelle série. Tome, Première partie: Généralités sur les lichens et leur détermination. - pdf, 18, (1987), docplayer.fr/60863371-Premiere-partie-generalites-sur-les-lichens-..., 148.

C

- **Cardarelli, M.; Serino, G.; Campanella, L.; Ercole, P.; Nardone, F.; Alesiani, O. & Rossiello, F.; (1997)**, Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. Cellular and Molecular Life Sciences, 53, 667-672p.
- **Claudia Carpentier., (2016)**, Investigations phytochimiques de lichens soumis au stress de la nordicité.5-6p.

D

- **Dayan, F. E. & Romagni, J. G.; (2001)**, Lichens as a potential source of pesticides. Pesticide Outlook, 229-232p.
- **Dieu Amandine.**, Thèse de Doctorat Chimie des Substances Naturelles | Université de Limoges, (2015), [pdf]Etude phytochimique de trois lichens & approche synthét.12-18p .

F

- **Fabio Candotto Carniel, Elisa pellegrini, Federica Bove, Matteo Crosera, Gianpiero Adami, Cristina Nali, Giacomo Lorenzini and Mauro Tretiach:** Acetone washing for the removal of lichen substances affects membrane permeability , The Lichenologist 49(4): 387–395, (2017).
- **Fahselt, D.; (1994)**, Secondary biochemistry of lichens. Symbiosis, 16, 117-165p.
- **Fukuda, K., (2014)**, Antimicrobial resistance Global report on surveillance, World Health Organization, France, 256p.

G

- **Gavériaux J.-P., (2003)**, - Principaux produits chimiques utilisés en lichénologie, bull. AFL 2003-1, vol. 28, 16 p.
- **Gavériaux J.-P., (2003 / 2004 / 2005)**, - Le microscope et son utilisation en lichénologie, 1e partie, bull. AFL 2003-2, vol. 28, 20 p. / 2e partie 2004-1, vol. 29, 10 p. /3e partie, 1, vol. 30, 10 p.
- **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.

- **Ghedira., (2005)**, Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle ... - Springer Link.
- **Gibson C., (2009)**, bords de mer , ed. Larousse, collection "Nature en poche", 224p.

H

- **Harck., Alexandre, (2015).**, “Conception et Validation de Déphaseurs Large Bande Intégrant Des MEMS-RF Dans Un Environnement Hostile.”
- **Harrar, A, (2012)**, [pdf]Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus
- **Hassani, L et Djeddi, K**, Les lichens de Béjaia : témoins de la qualité de l'environnement, (2013).6-7p.
- **Huneck, S.; (1999)**, The significance of lichens and their metabolites. Naturwissenschaften, 86, 559-570p.
- **Huovinen, K. & Ahti, T.; (1986)**, The composition and contents of aromatic lichen substances in the genus Cladina. Annales Botanica Fennici, 23, 93-106p.

J

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

K

- **Kaper et al., (2004)**, [pdf]Enteroaggregative Escherichia coli - Journal of Medical Microbiology. jmm.microbiologyresearch.org/content/.../jmm.0.46930-0?....
- **Khebbaz, w ; et Gobbi, r, (2014)**, traçabilité de l'identification des métabolites secondaires végétaux, 5p.
- **Kumar, S. K. C. & Muller, K.; (1999)**, Lichen metabolites. I. Inhibitory action against leukotene B4 biosynthesis by a non-redox mechanism. Journal of Natural Products, 62, 817-820p.

M

- **Muggia et al., (2009)**, Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in ..., Volume 2, 14-31p.
- **Mazari et al, (2010)**, [pdf]Chemical composition and antimicrobial activity ... - Academic Journals.

P

- **Paul Woungly Mavian ,(2012)**, Activité antifalcémiant et screening phytochimique de la fraction éthéro-méthanolique de BEAT-SS, Université de Kinshasa - Pharmacien .
- **Percival, (2004)**, Understanding the effects of bacterial communities and biofilms on

R

- **Rosine Clémence Momo Dongmo, (2009)**, Evaluation de l'activité antidermatophytique des extraits au méthanol et fractions d'*acalyphamanniana* (euphorbiacées) et *tristemma hirtum* (mélastomatacées), Université de Dschang - Master en biochimie clinique et pharmacologie.
- **Rowe, J. G.; Saenz, M. T.; Garcia, M. D. & Gil, A. M.; (1991)**, Nouvelle contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne et identification des substances lichéniques de quelques lichens de sud de l'Espagne. *Annales Pharmaceutiques françaises*, 49 (5), 278-285p.

S

- **Setzer, W.N. and Vogler, B., (2006)**, Bioassays for activity. In *Natural products from plants*, Taylor & Francis, 2ème éd., New York, pp.
- **Silver, (2011)**, *Clinical Microbiology Reviews*24, 71–109. –3.
- **Singleton et al.; (1999)**, [PDF]Determination of total phenolic and total ... - *Su Ürünleri Dergisi*.
- **Stead, P.; Silva, G. 1.; Lee, I. S.; Kinghorn, D. A.; & Wright, A. E.; (1998)**, *Natural products isolation*, (éd. Canell, R. J. P.); Humana Press, Totowa, 473 p.
- **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.

V

- **Van Delden et Iglewski., (1998)**, Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. - NCBI.

- Vila, J et al, (2011), [pdf]Download pdf - International Journal of Pharma and Bio Sciences, 28 (1), 28-34p.

W

- Whittaker, R. H., & Feeney, P. P.; (1971), Allelochemics: Chemical interactions between species. Science, 171 (3973), 757-769p.

Y

- Yamamoto, Y.; Miura, Y.; Kinoshita, Y.; Higuchi, M.; Yamada, Y.; Murakami, A.; Ohigashi, H. & Koshimizu, K.; (1995), Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epsteinbarr virus activation. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 43 (8), 1388-1390p.

Les Site Internets

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9866731> .
- www.ijpbs.net/download.php?download_file=cms/php/... .
- www.worldwidewounds.com/2004/.../Percival/Community-Interact... .
- www.egejfas.org/download/article-file/57243 .
- www.academicjournals.org/.../article1380705668_Mazari%20et%20... .
- <https://www.univsetif.dz/MMAGISTER/.../HARRAR%20Abd%20El%20Nacer.pdf>,
10p.
- <https://link.springer.com/article/10.1007/s10298-005-0096-8> .
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9586227>
- https://books.google.com/books/about/Antibiothérapie_en_pratique_clinique.html?id...
...
- <https://www.memoireonline.com › Sciences>.
- <http://fsnv.univ-tiaret.dz/revues.php>.
- <https://www.passeportsante.net/fr/Solutions/HerbierMedicinal/Plante.aspx?doc...hm> .
- <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01184892/document>.

ANNEXES

Annexes

❖ Préparation des réactifs

1) L'acide sulfurique à 1% : 1ml d'acide sulfurique + 100ml d'eau distillé.

2) Réactif de Mayer : 1.36g de HgCl_2 + 5g de KI + 100ml d'eau distillé.

3) Na_2CO_3 à 20% : 20g de Na_2CO_3 + 80ml d'eau distillé.

4) AlCl_3 à 2% : 2g de AlCl_3 + 98ml d'eau distillé.

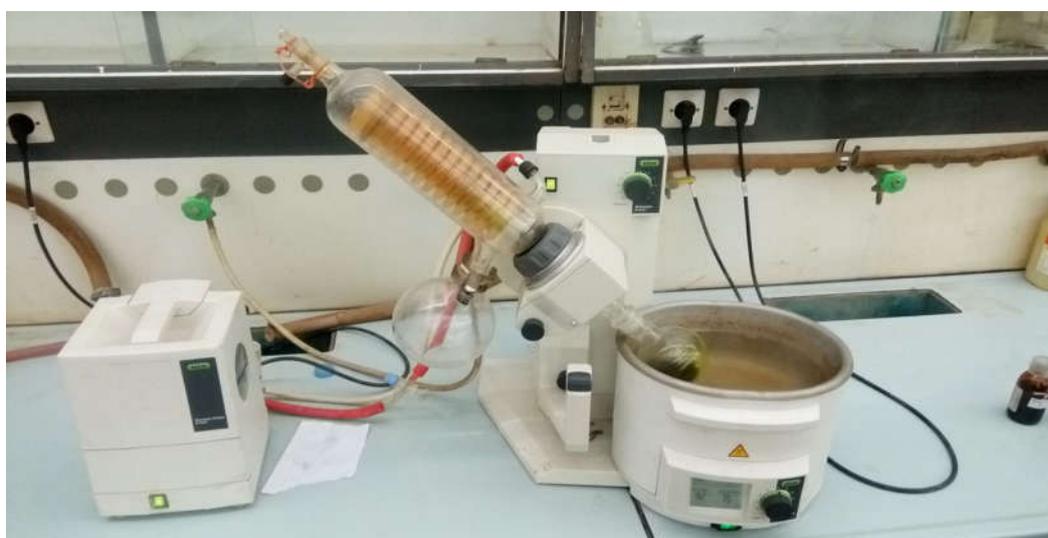


Photo A : Evaporateur rotatif.

(A)



(B)



Photo B : (A) : bain de sable, (B) : plaque chauffante.

❖ Préparation de l'acide gallique

Tableau A : Préparation de l'acide gallique et ça DO.

Tubes	[] d'acide gallique(mg/ml)	Méthanol (ml)	Solution mère (ml)	DO
Blanc	0	2	0	0
1	0.01	1.8	0.2	0.046
2	0.02	1.6	0.4	0.24
3	0.03	1.4	0.6	0.252
4	0.04	1.2	0.8	0.278
5	0.05	1	1	0.348
6	0.06	0.8	1.2	0.46
7	0.07	0.6	1.4	0.493
8	0.08	0.4	1.6	0.629
9	0.09	0.2	1.8	0.635
10	0.1	0	2	0.63

❖ Préparation de quercétine

Tableau B : concentration de la quercétine et ça DO.

[] de la quercétine (mg/ml)	DO (nm)
0	0
0.002	0.12
0.0075	0.133
0.0185	0.297
0.03125	0.532
0.0625	1.321
0.125	1.837

Année universitaire : 2017/2018	Présenté par : KOUT MOUNIR CHIHHEL AHMED
Mémoire présente en vue de l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée	
Intitulé : Activité antibactérienne et caractéristiques phytochimiques des lichens issus de l'est algérien	
<p>Résumé :</p> <p>Les lichens sont une source de nouvelles molécules à activité antibactérienne et antifongique. L'objectif de notre travail est d'essayer d'identifier et caractériser des lichens récoltés aux hasards de deux substrats (tronc d'arbre et mure de ville). On a procédé à une extraction par macération (acétone), analyse et fractionnement par CCM, tests phytochimiques qualitatifs et quantitatifs et le teste d'activité antimicrobienne des extraits obtenus par méthode de diffusion en milieu gélose (MH). le rendement d'extraction le plus élevé est celui du lichen du tronc d'arbre (53.1%) comparé au lichen de mur (42.1%) ; l'analyse par CCM révèle une différence d'apparition de spots par leurs nombre, Rf et couleurs ; le screening phytochimique indique une présence diversifiée de molécules bioactives tels que tanins, des anthocyanes, des stérols et terpènes ; le dosage des polyphénols totaux varie entre 0.044 et 0.081mgEAG/ml respectivement lichen d'arbre et lichen de mur, la teneur en flavonoïde est de l'ordre de 0.058mgEQ/ml pour le lichen du tronc d'arbre et 0.061mgEQ/ml dans l'extrait de lichen du mur. Aucune activité antibactérienne sur les deux souches de bactéries testées. Le lichen récolté est riche en certains métabolites secondaires à activités biologiques importantes.</p>	
Mots clés : Acétone, lichen, CCM, flavonoïdes, polyphénol, activité antibactérienne.	
Date de soutenance : 03/07/2018	