

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمار ثليجي بالأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
قسم البيولوجيا
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**L'Evaluation de l'Activité biologique des Extrait des
Lichens Collectés à Partir de Territoire National**

Présenté par :

KROBBA Safia

BENSMAIL Ghania

Devant le jury composé de :

Khedim Rabah	Président	MCB
Benamar Ibrahim	Examineur	MAB
Messaoudi Omar	Rapporteur	MCB

Année universitaire : 2020/2021

Remerciement

Tous d'abord nous tenons à remercier le **Dieu** tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Nous exprimons nos profondes gratitude et respectueuses reconnaissances à notre encadrant Monsieur **Messoudi omar** pour son encadrement, conseils et sacrifices afin de donner le meilleur et pour son suivi durant la période de préparation de notre mémoire de fin d'étude.

Nos remerciements vont aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de jurer notre travail.

Nous adressons nos sincère remerciements à tous les professeurs qui par leurs conseils et leurs efforts durant tous les années passées nous sommes là, vraiment un grand remerciement pour leurs qualité d'enseignement qui nous a été dispensé.





Dédicace



En témoignage d'amour et d'affection, je dédie ce modeste travail avec une grande fierté à tous ceux qui me sont chers :

**Ma très chère mère Fatima, 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.*

** Mon très cher père Lakhedar, 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.*

***Que Dieu vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je suis puisse vous combler de bonheur.*

Mon chère époux **Ali et ma fille **Amina** et ma famille **ben smail** et la famille **Noureddine***

** Ma cher binôme **safia**.*

Ghania



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes plus chers êtres au monde :

À mes chères parents : ma mère et mon père pour leur amour, leur tendresse, et pour leur soutien durant toutes les étapes de ma vie. J'espère qu'un jour, je pourrai leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que Dieu leur prête tout le bonheur.

À mes chers frères et mes belles sœurs. Pour leurs encouragements et pour leur soutien moral et physique.

À mon très cher marié

*À mes yeux : wissal, anas et rodaina que Dieu leur prête tout le bonheur.
À tous ce qui ont enseigné moi au long de ma vie scolaire .Pour tout leur amour, leur soutien, leur encouragement, leur assistance et leur présence dans ma vie.*

À toute mes chères amies

Merci de votre présence, soutien et de m'avoir encouragée à aller plus loin.

À tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.

À toute ma famille.

À mon cher binôme ghania

K.Safia



Résumé: L'objectif de ce travail est d'évaluer l'activité biologique de cinq différentes espèces de lichens collectés à partir de trois régions d'Algérie : Laghouat, Chréa et Tissemsilt. Le rendement d'extrait méthanolique le plus élevé a été obtenu à partir de l'espèce *Xanthoria parietina* (7,089%). L'évaluation de l'activité antioxydante par l'utilisation du radical DPPH, indique que l'extrait méthanolique de l'espèce *Pseudevernia furfuracea* possède une activité antioxydante plus importante par rapport à celui des autres extraits et à l'acide ascorbique, qui est la molécule référence utilisée, avec une valeur d'EC₅₀ = 0,085 mg/ml, alors que le pouvoir antioxydant anti radicalaire d' ABTS a montré une activité très importante pour tous les extraits avec un meilleur pouvoir pour l'extrait de *Pseudevernia furfuracea* a une valeur d'EC₅₀ = 0,094mg/ml. L'évaluation de l'activité antimicrobienne indique que les deux lichens *Pseudevernia furfuracea* ; *Ramalina fraxinea* possèdent une activité contre les différents microorganismes tests utilisés, alors que les extraits méthanoliques des cinq lichens n'ont pas révélé une activité antibiofilme.

Mots clés : lichen, extraits méthanolique, activité, antimicrobienne, antioxydant, antibiofilme .

Abstract: The aim of this work is to evaluate the biological activity of five different species of lichens collected from three regions of Algeria: Laghouat, Chréa and Tissemsilt. The highest methanolic extract yield was obtained from the species *Xanthoria parietina* (7.089%). The evaluation of antioxidant activity, using DPPH as radical, indicates that the methanolic extract prepared from *Pseudevernia furfuracea* has higher antioxidant activity compared to the reference compound, ascorbic acid, with an EC₅₀ value = 0.085 mg / ml , antioxidant activity, using ABTS as radical indicates that all methanolic extracts have higher antioxidant activity and the methanolic extract prepared from *Pseudevernia furfuracea* has higher antioxidant activity with an EC₅₀ value = 0,094mg / ml . Evaluation of antimicrobial activity indicates that the two lichens *Pseudevernia furfuracea*; *Ramalina fraxinea* have activity against various test microorganisms used, while the methanolic extracts from the five lichens did not show any antibiofilme activity.

Keywords :lichens ,methanolic extracts, antibiofilme activity, antimicrobial activity antioxidant activity

المخلص : الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط البيولوجي لخمس أنواع من الأشنة، تم الحصول على أعلى إنتاجية للمستخلص الميثانولي من النوع *Xanthoria parietina* (7.089%)، تقييم النشاط المضاد للأكسدة عن طريق استخدام الراديكال DPPH, ABTS. يشير DPPH إلى أن المستخلص الميثانولي للنوع *Pseudevernia furfuracea* يحتوي على أكبر نشاط مضاد مقارنة بالمستخلصات الأخرى وحمض الأسكوربيك، وهو الجزيء المرجعي المستخدم بقيمة ملغ/مل EC= 0.085. أظهرت مضادات الأكسدة والجذور الحرة في اختبار ABTS نشاطا مهما لجميع المستخلصات ومستخلص *Pseudevernia furfuracea* ذو فاعلية أكبر بقيمة ملغ/مل EC₅₀=0.094. يشير تقييم النشاط المضاد للميكروبات أن الأشنتين *Pseudevernia furfuracea* و *Ramalina fraxinea* لها نشاط ضد الكائنات الحية المستخدمة. في حين أن مستخلصات الأشنة الخمسة ليس لها نشاط مضاد حيوي.

الكلمات المفتاحية: الأشنة، المستخلصات الميثانولية، النشاط، مضاد الميكروبات، مضاد الأكسدة، مضاد حيوي.

Liste des abréviations

ABTS : L'acide 2,2'-azino-bis 3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique

BHI : Brain Heart Infusion

CMIB : Concentration minimale inhibitrice du biofilm

DO: Densitéoptique.

DPPH : 2,2- diphényle-1-picrylhydrazyl

ERO : Espèces réactives dérivée de l'oxygène

IC50 : Concentration inhibitrice

UV : Ultraviolet

UVA : Ultraviolet A.

UVB : Ultraviolet B.

ADN :Acide DésoxyriboNucléique

ATCC: American Type Culture Collection

E. coli : Escherichia coli

R : rendement

Liste des Figures

Figure(01) :Lichen *Collema plicatissimum*

Figure(02) : Lichen *Ramalina fraxinea*

Figure(03) :Lichen *xanthoria parietina*

Figure(04) : *Anaptachia ciliaris*

Figure(05) : Lichen *Pseudevernia*

Figure (06) : Les chlorolichens ((a)*Parmelia sulcata*,) et les cyanolichens ((b)*Lobaria virens*,)

Figure (07) : Coupe transversale d'un échantillon de *Xanthoria parietina* observé au microscope électronique à balayage

Figure (08) : Structures de reproduction sexuée chez les lichens

Figure (09) : Les coumarines et dérivés

Figure(10) : Structure chimique des flavonoïdes

Figure (11) : Carte géographique montrant la zone de collecte des lichens.

Figure (13) : *Collemaplicatissimum*

Figure (14) : *Ramalina fraxinea*

Figure (15) : *xanthoria parietina*

Figure (16) : *Anaptychia ciliaris*

Figure (17) : *Pseudevernia Furfuracea*

Figure(18) : Récolte des lichens

Figure(19) : Mécanisme de piégeage du radical DPPH

Figure(20) : Réaction du radical ABTS•+ en présence d'un antioxydant

Figure(21) : Combinaison sur microplaque de 96 puits

Figure (22): Diamètre des zones d'inhibition en (mm) obtenu par les extraits méthanoliques des lichens *Ramalina fraxinea* et *Pseudevernia Furfuracea* .

Figure (23) : Les diamètre des zones d'inhibition de *Ramalinafraxinea* vis-à-vis les cinq bactéries.

Figure (24) : Les diamètres des zones d'inhibition de *PseudeverniaFurfuracea* vis-à-vis les cinq bactéries.

Figure (25) : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits méthanoliques des lichens .

Figure (26) : pourcentage de réduction de radical DPPH en fonction de la concentration d'acide ascorbique

Figure (27) : Histogramme de classement croissant d'IC50 de radical DPPH

Figure (28) : Courbes de pourcentage d'inhibition d'ABTS en fonction de la concentration des extraits lichéniques

Figure (29) : pourcentage d'inhibition de radical ABT par l'acide ascorbique

Figure (30) : Histogramme de classement croissant d'IC50 de radical DPPH

Figure (31) : Résultat de l'activité antibiofilm des lichens sur une microplaque

Liste des Tableaux

Tableau (01) : quelque des espèces des lichens

Tableau (02) : Les espèces des lichens utilisés

Tableau (03): le rendement total d'extractions RET des extraits méthanolique des lichens

Tableau (04): Diamètre des zones d'inhibition en (mm) obtenu par les extraits méthanolique des lichens.

Tableau (05) : Valeur d'IC50 des extraits testés.et de l'acide ascorbique de test de DPPH

Tableau (06) : Les résultats obtenus sont illustrés en histogrammes représente le classement croissant EC_{50} des extraits lichenique et de l'acide ascorbique

Table des matières

Remercîmen.

Dédicace.

Résumé.

Liste de l'abréviation.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction **02**

Partie 1 Synthèse bibliographique

Chapitre I Généralité sur Les lichens

I.Généralité sur les lichens :.....	02
II-Ecologie et répartition :	07
II.1.Ecologie des lichens :.....	07
II.2. Répartition des lichens :.....	07
III-Morphologie et anatomie des thalles lichéniques.....	08
III.1.Le thalle :	08
IV- Biologie lichenique :	08
IV.1.Symbiose lichénique.....	08
IV.2.La reproduction les lichens.....	09
V.Intérêt et application des lichens.....	10
V.1.Bio-indicateurs.....	10
V.2. Propriétés médicinales et pharmacologiques	10
V.3. applications alimentaires.....	10
V.4. Application industrielles	11
V.5. Rôle écologique	11
VI. Les molécules bioactives	11
VI.1.Les composés phénoliques	11
1.1.Les acides phénoliques	12

1.2. Les flavonoïdes	12
1.3 Les tannins	13
1.4. Lignanes.....	13
2. Les alcaloïdes	13
3. Les terpénoïdes	14
VI.2. Rôle des molécules bioactives :	14

Chapitre II Activités biologiques des lichens

I. Activité antimicrobienne :	16
I.1 Activité antibactérienne.....	16
I.2. Activité antifongique	16
I.3. Les principales méthodes d'action antimicrobienne des lichens.....	16
II. Activité antioxydante :	17
II.1 .Système antioxydant :	17
II.1.2. Stress oxydatif.....	17
II.1.3 Les principales sources d'antioxydants.....	17
III. Activité antibiofilme :	18
III.1. Les biofilms	18
III.2. Organisation du biofilm.....	18
III.2.1 Constituants d'un biofilm	18
III.2.2 Formation du biofilm.....	18
III.3. Biofilms et activités humaines.....	19
III.3.1 .Biofilms d'intérêt.....	19
III.3.3.2 Problèmes engendrés par les biofilms	19

Partie 2: Etude expérimentale *Erreur ! Signet non défini.*

Chapitre III Matériel et méthode

I. La collection des échantillons	23
II. Préparation des échantillons.....	25
III. Préparation des extraits brut :	26
III.1. Rendement de l'extraction.....	26
IV. Evaluation des activités biologiques des lichens.....	27
IV.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	27

VI.1.1 .préparation de la suspension.....	27
IV.1.2.mise en évidence de l'activité antimicrobienne par un méthode de disque.....	27
IV.2 .Evaluation de l'activité antioxydant.....	28
IV.2.1.Le test d'inhibition du DPPH	28
IV.2.2Méthode de piégeage du radical libre ABTS	29
IV.3.Evaluation de l'activité antibiofilm.....	31
IV.3.1.Préparation des cultures bactériennes.....	31
IV.3.2.le protocole de l'activité antibiofilm	31
 <i>Chapitre IV Résultats et discussions</i>	
I. Résultat de rendement total d'extractions méthanoliques.....	34
II. Evaluation de l'activité biologique des extraits lichéniques.....	35
II.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne	35
II.2. Evaluation de l'activité antioxydent	38
II.2.1 Activité antiradicalaire contre le DPPH.....	38
II.2.2Activité de piégeage du radical libre ABTS	42
II.3.Etude de l'activité antibiofilm.....	45
II.3.1.Détermination des différentes concentrations de dillution de nous extraits licheniques..	45
II.3.2.Détermination des concentrations minimales inhibitrices de biofilm (CMIB).....	46
<i>Conclusion</i>	47
<i>Références bibliographiques</i>	50
<i>Annexes</i>	60

Introduction générale



La croissance de la résistance aux antibiotiques ainsi que la diminution de l'efficacité de plusieurs médicaments utilisés pour le traitement de certaines pathologies telles que les maladies cancéreuses et virales, à augmenter le besoin mondiale de découvrir des nouvelles molécules bioactives à partir des ressources naturelles, telle que les végétaux ainsi que les microorganismes, surtout les moisissures et les actinomycètes, qui ont fournies beaucoup de molécules bioactives qui ont été développées comme des médicaments. Cependant, ces deux dernières sources tellement ont été largement exploitées comme source de molécules bioactives, les recherches sont orientées récemment vers l'exploitation de nouvelles sources naturelles peu exploitées, parmi eux, les lichens.

Les lichens résultant de l'association symbiotique entre un champignon et une algue. Ils sont capables de produire des métabolites avec divers effets biologiques. Bien que moins utilisés que les plantes, ils sont devenus actuellement des sources potentielles de substances bioactives, telles que ;les anti-inflammatoires, les antitumoraux, les anti-cancérogènes, les antibactériennes, les antioxydants, et les antihémorragiques (**Friadi, 2012 ; Rossignol, 2013 ; Fraser et Cuerrier, 2007**).

Afin de valoriser les lichens de notre territoire national comme source de molécules bioactives, cette étude vise à exploiter l'activité biologique, notamment l'activité antioxydante, antimicrobienne et antibiofilm, de cinq espèces de lichens : *Ramalina fraxinea*, *xanthoria parietina*, *Anaptychia ciliaris*, *Pseudevernia Furfuracea*, collectés à partir de différentes régions de Laghouat, Tasmssilte et Chreaa.

Pour arriver à ce but, on a suivi les étapes suivantes ;

- La collection des espèces de lichens.
- Extraction et préparation des extraits méthanoliques.
- Évaluation des activités biologiques ;l'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion par des disques sur gel. Alors que l'activité antioxydante est déterminée par deux tests de piégeage d'un radical ;DPPH, ABTS. En fin l'évaluation de l'activité anti-biofilm par la méthode de dilution sur une microplaque.

Partie 1
Synthèse bibliographique



Chapitre I

Généralité sur Les lichens



Les lichens, qui sont intégrés dans le règne fongique, résultent de l'association symbiotique d'un champignon appelé mycobionte et d'une algue verte et/ou d'une cyanobactérie appelée photobionte. Cette symbiose confère aux lichens une structure et une reproduction spécifiques par rapport à chaque constituant seul. A la différence des plantes supérieures, ils ne possèdent ni racine, ni tige, ni feuille, mais un appareil végétatif rudimentaire : le thalle. La découverte de fossiles suggère qu'ils seraient apparus il y a quelques 600 millions d'années. (DIEU .A, 2015) Il existe environ 18500 espèces de lichens couvrant approximativement 8% de la surface terrestre (LAGARDE ,2017) .

Tableau (01) : quelque des espèces des lichens

1- *Collema plicatissimum*

Thalle foliacé, 2 cm de diamètre, adhérent au substrat au moyen de groupes denses de rhizomyces. Érigés, plats, larges, non ramifiés, arrondie au sommet et fortement pliée longitudinalement de façon irrégulière . Surface à grain fin, presque jamais lisse. (MORENO .EGEA, 1992)



Figure(01) :Lichen *Collema plicatissimum* .(MORENO .EGEA, 1992)

2- *Ramalina fraxinea*

Thalle : fruticuleux

Photobionte : algue verte autre que *Trentepohlia*.

Chimie : Pas de réactions chimiques particulières

Apothécies : fréquentes, marginales ou faciales.

Habitat : corticole, sur arbres de bords de route (frêne, peuplier, tilleul)

(Roux ,2017)



Figure(02) :Lichen *Ramalina fraxinea*

3- *xanthoria parietina*

xanthoria parietina est l'un des lichens les plus communs dans les îles britanniques, il est particulièrement abondant sur les bâtiments frame et par la mer sur les rochers immédiatement au-dessus de la laisse des hautes eaux, bien qu'il se produit également dans d'autres habitats tels que les arbres, les murs et les clôtures bordant les routes et prairies.(D.J. Hill et H.W.woolhouse,1966).



Figure(03) : Lichen *xanthoria parietina*

4-*Anaptychia ciliaris*

Un grand lichen foliacé trouvé sur des troncs d'arbres bien éclairés et enrichis en nutriments

Habitats : Principalement sur l'écorce d'arbres à feuilles, rarement sur les rochers, les murs de pierre et les pierres tombales.(Haluwyn ,2009)



Figure(04) : *Anaptychia ciliaris* (Haluwyn ,2009)

5-*Pseudevernia Furfuracea* : est une espèce de lichens de la famille des Parmeliaceae.*Pseudevernia furfuracea* est un lichen foliacé bien connu, utilisé commercialement dans le mélange d'épices.

(Kalra .Conlan,.Areche .Dilawari ,2021)



Figure(05) : Lichen *Pseudevernia Furfuracea* (Kalra .Conlan,.Areche .Dilawari ,2021)

I. Ecologie et répartition

I.1. Ecologie des lichens

Les lichens sont répandus à travers presque toutes les régions du monde : des zones les plus extrêmes, vers les pôles, dans les déserts rocheux, et représentent environ 8 % de la couverture terrestre (Lange et al., 2001). Aussi, les lichens sont capables de reviviscence, c'est-à-dire de passer rapidement, réversiblement et répétitivement de l'état sec à l'état hydraté, en particulier en haute montagne (Aubert et al., 2007). Ils tolèrent une dessiccation extrême et une exposition intense aux ultraviolet (UV) en particulier grâce à la présence de pigments corticaux qui piègent ou empêchent la formation de radicaux libres (Nybakken et al., 2004 ; Gauslaa, 2005 ; Vrábliková et al., 2006).

I.2. Répartition des lichens

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

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

Selon la nature de substrat on distingue 3 grands groupes :

- **Lichens épiphytes**

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

- **Lichens saxicoles**

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

- **Lichens terricoles**

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

On en trouve aussi des lichens poussent sur des mousses (musciocoles), sur les feuilles

(foliicole), et même sur d'autres lichens (lichénicoles) et sur le bois mort (ligniciles), plus rarement sur des panneaux de signalisation, du verre, des boîtes aux lettres...ect (**Humbert, 2012**).

II. Morphologie et anatomie des thalles lichéniques

II.1. Le thalle

C'est l'appareil végétatif du lichen qui assure sa nutrition, sa survie et sa croissance. Il va présenter une morphologie spécifique, différente de celle des algues et des champignons libres.

Selon leur morphologie, on peut distinguer plusieurs grands types de thalles, les 3 principaux étant : les thalles crustacés, foliacés et fruticuleux .La distinction de ces principales morphologies permet, par l'observation à l'œil nu ou à la loupe, de suivre les premiers critères des clés de détermination.

- a. **Thalles crustacés** forment des thalles ressemblant à des croûtes, ils adhèrent au support sur toute leur surface ; ils ne peuvent en être détachés.
- b. **Thalles foliacés** forment des thalles en forme de lames ou de feuilles, ils sont faiblement appliqués au substrat et sont facilement détachables par endroits.
- c. **Thalles fruticuleux** présentent des formes barbues ou en lanière et sont fixés en un seul point au support. (**Gregory et Dimijian., 2003**).

III. Biologie lichenique :

III.1. Symbiose lichénique

Les lichens sont issus d'une symbiose entre un champignon appelé mycobionte ou mycosymbiote, en majorité un Ascomycète, et une algue appelée photobionte ou photosymbiote. Dans 90 % des cas, le photobionte est une algue verte (chlorolichens), alors qu'il s'agit d'une cyanobactérie (cyanolichens) dans les 10 % restants. Ces deux partenaires sont indispensables au bon fonctionnement de leur association. L'algue synthétise la matière organique à partir du dioxyde de carbone (CO₂) de l'air et du rayonnement solaire (photosynthèse). En contrepartie, le champignon prélève dans le milieu l'eau et les sels minéraux indispensables à la symbiose lichénique. Les éléments nutritifs n'étant pas puisés dans le substrat, les lichens ne sont donc pas néfastes au développement de l'arbre. Le partenaire fongique est également responsable de l'ancrage de la structure et protège l'association lichénique des rayonnements ultraviolets trop agressifs et de leurs possibles effets délétères. (**Yannick Agnan ,2021**)



Figure (06) : Les chlorolichens (*Parmelia sulcata*, à gauche) et les cyanolichens (*Lobaria virens*, à droite) sont les deux catégories de lichens. (Yannick Agnan ,2021)

Le mycobionte est constitué d'un réseau plus ou moins dense de filaments fongiques appelés hyphes. Les cellules algales, appelées gonidies, sont localisées sous une couche d'hyphes dans la partie la plus superficielle du lichen : la zone la plus exposée aux rayonnements solaires nécessaires à la photosynthèse.

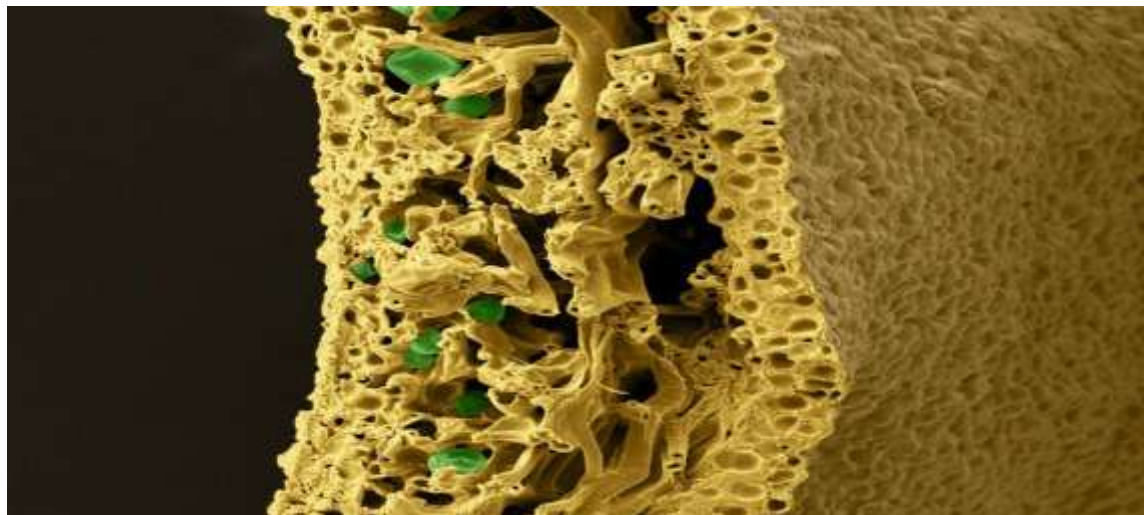


Figure (07) : Coupe transversale d'un échantillon de *Xanthoria parietina* observé au microscope électronique à balayage.(Yannick Agnan ,2021)

III.2. La reproduction des lichens

La multiplication des lichens peut se faire de deux façons distinctes : par brassage génétique (reproduction sexuée) ou non (reproduction asexuée). La reproduction sexuée ne fait intervenir que le partenaire fongique. Elle s'opère *via* trois structures : l'apothécie (petite coupelle), la lirelle (apothécie allongée sous forme de fente dans le thalle) et le périthèce (petit dôme présentant un orifice apical). Celles-ci produisent les spores qui, émises dans l'air, se développeront après la rencontre avec une algue appropriée (Yannick Agnan ,2021)



Figure (08) : Structures de reproduction sexuée chez les lichens (Yannick Agnan ,2021)

Le second type de reproduction - la reproduction asexuée - fait intervenir deux structures particulières : les soralies (amas poudreux libérant des sorédies) et des isidies (excroissances du thalle). Sorédies et isidies sont constituées des deux partenaires (hyphes mycéliens et gonidies). Ces fragments lichéniques sont transportés par le vent et peuvent, en conditions favorables, coloniser de nouveaux milieux. (Yannick Agnan ,2021)

IV. Intérêt et application des lichens

IV.1. Bio-indicateurs

Les indicateurs biologiques sont des espèces capables par leur comportement général (disparition, augmentation ou variation de densité) de rendre compte de l'évolution générale d'un milieu (Amiard, 2011).

Une des utilisations très répandue des lichens est leur capacité à « révéler les pollutions ». En effet, ils sont de véritables sentinelles de l'environnement car ils développent rapidement des réactions physiologiques et cellulaires en relation avec les stress environnementaux. Contrairement aux plantes, ils n'ont ni cuticule protectrice, ni stomate, ce qui augmente les échanges des lichens avec l'air ambiant (Häffner *et al.*, 2001).

IV.2. Propriétés médicinales et pharmacologiques

Les lichens ont été consommés en temps de famine, (Karagöz *et al.*, 2009), et ils sont utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle, soit dans leur intégralité, soit sous forme d'extraits. Les Indiens d'Amérique, les Egyptiens, les Indiens et les Chinois employaient les lichens pour traiter les maux, et en premier lieu comme expectorants (Elix, 1996).

IV.3. Applications alimentaires

Dans l'alimentation humaine, seul *Cetraria islandica* a été utilisé autrefois dans les pays nordiques, sous forme de farine mélangée à la farine panifiable ou préparé en bouillie, pour

l'alimentation animales les lichens jouent un rôle important dans la nutrition des Mammifères alpins (Ozenda, 2000).

IV.4. Application industrielles

- **Parfums et cosmétiques**

Les Parfums est l'une utilisation industrielle des lichens qui conserve aujourd'hui une importance notable, c'est aussi l'une des plus anciennes. Evernia prunastri est le plus utilisé, reconnu par ses parfums à odeur de Chypre d'orient..etc. (Ozenda, 2000).

- **Teintures et pigments**

De nombreux lichens ont anciennement été utilisés comme colorants par l'artisanat puis dans l'industrie textile. Ces espèces étaient dénommées« orseille de terre » ou « orseille de mer » selon leur lieu de ramassage (Mitrović et al., 2011).

IV.5. Rôle écologique

Les lichens s'insèrent dans les chaînes alimentaires, sont consommés par certains animaux les (limaces et l'escargot).Ils font l'objet d'un parasitisme par d'autres champignons qui leur sont inféodés. Servir de matériaux de construction pour les nids d'oiseau et d'écureuils (Association Française lichénologie, 2011).

les métabolites secondaires ont essentiellement un rôle de défense vis-à-vis des facteurs environnementaux physiques et biologiques : exposition intense à des rayonnements ultraviolets (UV), défense contre les herbivores, compétition pour l'habitat (effet allélopathique).Aussi, ces composés contribueraient à l'altération des roches afin de faciliter l'adhésion du lichen (Seaward, 1997).

D'autres peuvent également être source de glucose et dans certaines régions ils sont consommés comme aliment pour l'homme (Japon, Canada), (Gregory et Dimijian, 2003).

V. Les molécules bioactives

Les molécules bioactives peuvent être des métabolites secondaires. On peut les classer en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief, 2003).

V.1. Les composés phénoliques

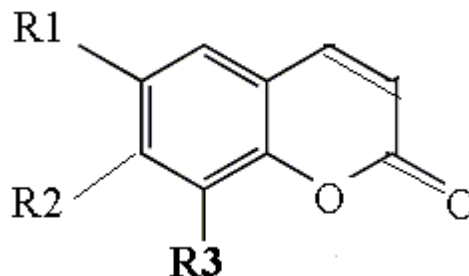
Les polyphénols forment un vaste ensemble de substances difficiles à définir simplement .L'élément structurale fondamentale qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une

autre fonction, éther, ester, hétéroside. Les connaissances en matière de polyphénols sont actuellement en pleine évolution et les équipes de recherche dans le monde y accorde actuellement. (SALL ,2009)

V.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont présents en abondance dans les aliments et divisés en deux classes:les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. Les acides hydroxycinnamiques sont plus fréquents que les acides hydroxybenzoïques et comprennent essentiellement l'acide p-coumarique, caféïque, férulique et sinapique (Pandey et Rizvi, 2009).

Les coumarines et dérivés



R1 = R3 =H, R2 = OH : Ombelliférone

R1 = R2 =OH, R3 =H: Esculétol

R1 = OCH3, R2 = R3 =OH : Fraxétol R1 =OCH3, R2 =OH, R3 =H : Scopolétol

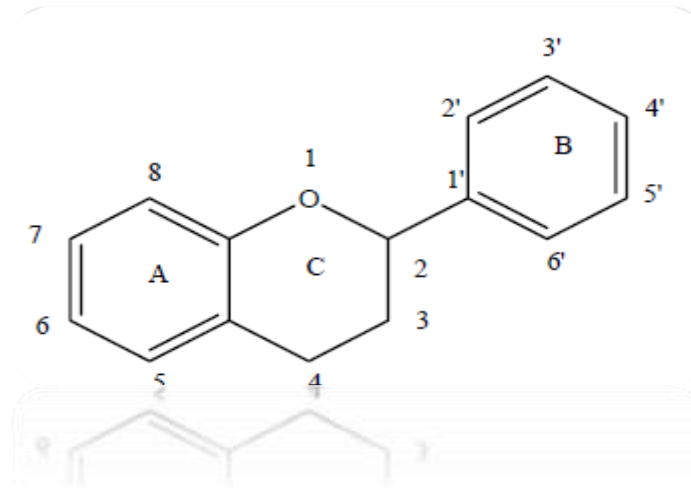
Figure (09): Les coumarines et dérivés

(SALL ,2009)

a. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. On les trouve dissous dans la vacuole des cellules à l'état d'hétérosides ou comme constituants de plastes particuliers, les chromoplastes (Guignard, 1996).

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles en C6 reliés par une chaîne en C3. Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone. Tous les flavonoïdes environ 300 ont une origine biosynthétique commune, à savoir les flavones, les flavonols et les flavanones. Ils peuvent être regroupés en une dizaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central. (SALL ,2009)



Figure(10) :Structure chimique des flavonoïdes
(SALL ,2009)

b. Les tannins

Les tanins sont des polyphénols à haute poids moléculaire (de 500 à 20 000 daltons), ils ont la capacité de combiner aux protéines ce qui explique leur pouvoir tannant. Ce sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux. (Sauvionet *al.*, 2013)

Il y a deux types de tanins ; les tanins hydrolysables sont les tanins galliques et tanins ellagiques (les acides sont acide gallique et acide ellagique). Les tanins condensés sont non hydrolysables ou tanins catéchiques. (SALL ,2009)

c. Lignanes

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6- C3). Ce sont des composés dont les deux noyaux phénoliques sont reliés par quatre atomes de carbone, au lieu de trois dans les flavonoïdes. Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles. (Belyagoubi, 2011).

V.1.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes forment une grande famille hétérogène de métabolites secondaires, qui présentent un intérêt par leurs propriétés pharmacologiques et leurs applications en médecine. Les alcaloïdes sont des molécules organiques hétérocycliques azotées et basiques. Ils sont dérivés des acides aminés tels que la tyrosine, tryptophane et autres (Pierre et Chin, 2016). On distingue trois types d'alcaloïdes : les alcaloïdes vrais, les pseudo-alcaloïdes et les proto-alcaloïdes.

V.1.3. Les terpénoïdes

Les terpénoïdes sont classés aussi parmi les substances secondaires importantes du métabolisme lichénique. Les terpènes peuvent être considérés comme étant des dérivés de l'isoprène. Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités isopréniques. On distingue :

- **Monoterpènes** : ce sont des produits généralement odorants obtenus par entraînement à la vapeur d'eau des végétaux entiers ou d'organes de végétaux.
- **Diterpènes** : ce sont des dérivés des hydrocarbures en $C_{20}H_{32}$ ($n=4$). Le phytol, la vitamine A, les acides résiniques des conifères, et les gibbérellines sont des exemples de diterpènes.
- **Triterpènes** : ces composés en C_{30} ($n=6$) sont très répandus, notamment dans les résines, à l'état libre (phytosterols), estérifiés, ou sous forme hétérosidiques (saponosides).
- **Tetraterpènes** : les seuls représentants de ce groupe sont les caroténoïdes, substances colorées en jaune, orange ou rouge.
- **Polyterpènes** : caoutchou naturel (Merghem, 2009).

V.2. Rôle des molécules bioactifs :

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).

Chapitre II
Activités
biologiques des
lichens



I. Activité antimicrobienne :

Pour les industries pharmaceutiques, la recherche de nouveaux antibiotiques est une préoccupation majeure en termes de santé publique. Un antibiotique est une substance chimique ayant une activité bactéricide (entraîne la mort) ou bactériostatique (empêche la croissance) sur des micro-organismes pathogènes, et permettant de traiter des infections.

I.1 Activité antibactérienne

Plus généralement dans la littérature, les activités antibactériennes des extraits de lichens varient en fonction des solvants utilisés pour les extractions ainsi que des bactéries testées et notamment de la composition de leur membrane, différente chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Les premières sont généralement plus sensibles à l'activité antibiotique des métabolites lichéniques que les secondes (**Rowe et al. 1989**).

Face au développement de formes résistantes de bactéries vis-à-vis des traitements antibactériens conventionnels, les métabolites lichéniques sont étudiés comme alternatives. En effet, plus de 50 % des lichens possèderaient une activité antibiotique et représenteraient donc une source importante de nouveaux composés bioactifs (**Zambare et Christopher, 2012**)

I.2. Activité antifongique

Certains métabolites secondaires peuvent être actifs sur différentes souches de champignons et de levures. L'acide (+)-usnique, isolé du lichen, montre une activité antifongique (**Cardarelli et al, 1997**) (inhibe également la croissance de *Candida glabrata* et *Candida albicans* (**Yilmaz et al, 2004**).

I.3. Les principales méthodes d'action antimicrobienne des lichens

Les propriétés antimicrobiennes des extraits de lichen et de leurs métabolites secondaires sont connues depuis longtemps (**Piovano et al., 2002 ; Paudel et al., 2008 ; Micheletti et al., 2009**).

On distingue les mécanismes suivants :

- L'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.
- L'inhibition de la synthèse de la membrane cytoplasmique.
- L'inhibition de la synthèse des protéines.
- L'inhibition de la synthèse de l'acide nucléique.

II. Activité antioxydante :**II.1 .Système antioxydant :**

L'organisme a développé des systèmes de défense très efficaces contre la production des radicaux libres. Les molécules contrôlant cette production sont désignées par le terme « Antioxydant ».

Du point de vue biologique, les antioxydants sont toutes substances qui, présentes à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat (Abuja et Albertini, 2001), ces systèmes peuvent être exogènes ou endogènes et sont réagis synergiquement afin de protéger les cellules vis-à-vis aux ROS.

Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont: l'oxygène singulet O_2 , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , les peroxydes alkyles $ROOH$, le radical superoxyde O_2 , les radicaux hydroxyles HO , peroxydes ROO et alkoxydes RO .

Un des mécanismes de protection des lichens est la production et l'accumulation de pigments corticaux capables d'absorber les UVA et UVB, Il s'agit de caroténoïdes, de mélanines, de composés phénoliques, l'acide usnique, ou de composés issus de la voie de l'acide shikimique (Nguyen et al., 2013).

II.2.Stress oxydatif

Nocifs, lorsqu'il y a un déséquilibre entre la balance des ERO (espèces réactives de l'oxygène) et ERN et les systèmes de défense ,avec comme conséquence l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (ADN, protéines, lipides) en lien avec l'apparition de nombreuses maladies graves (cancer, diabète , artériosclérose ,arthrite, maladies neuro-dégénératives et maladies cardiovasculaires) (Evans et Halliwell, 1999).

Des molécules prooxydantes appelées radicaux libres ou espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites quotidiennement dans l'organisme. Ces dernières sont cependant contrôlées par les antioxydants. Toutefois, une production excessive de ces molécules réactives ou une insuffisance des mécanismes antioxydants peut déséquilibrer la balance oxydant/antioxydant (Papazian et Roch, 2008).

II.3 Les principales sources d'antioxydants**II.3.1 Les médicaments**

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

II.3.2 Les vitamines

- **Acide ascorbique : Vitamine C**

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

- **La vitamine E**

Elle semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle. On la retrouve dans les huiles végétales (Bossokpi, 2002).

II.3.3 Les antioxydants naturels

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

III. Activité antibiofilme :**III.1. Les biofilms**

Un biofilm est une structure complexe constituée de microorganismes et d'une matrice extra-cellulaire auto-induite. Ce mode de vie est connu depuis très longtemps.

Il a de fait été possible de connaître plus en détail la constitution de ces biofilms, comment ils s'établissent et quelles sont les propriétés particulières conférées par ce mode de vie aux microorganismes qui le constituent. Ces propriétés peuvent parfois être exploitées, mais sont aussi à l'origine de problèmes spécifiques nécessitant la mise en place de stratégies de lutte adaptées. (Kacou, 2019)

III.2. Organisation du biofilm**III.2.1 Constituants d'un biofilm**

Un biofilm est essentiellement constitué de micro colonies de microorganismes entourées d'une matrice extracellulaire, celle-ci constituant environ 85% du biofilm.

La matrice extracellulaire quant à elle est constituée de différents éléments : eau, exopolysaccharides, acides nucléiques extra-cellulaires, protéines. (Sutherland, 2001)

III.2.2 Formation du biofilm

Le processus de formation d'un biofilm est classiquement décrit en 5 étapes

- Pré-conditionnement de la surface colonisée
- Adhésion des micro-organismes
- Croissance et prolifération des cellules
- Maturation du biofilm

- Détachement des cellules

III.3. Biofilms et activités humaines

Ce phénomène va donc interférer avec de nombreuses activités humaines.

Leurs propriétés pourront s'avérer utiles dans certains cas et être exploitées. Mais il arrive également des situations où la formation des biofilms peut avoir des conséquences néfastes, tant sur les activités en milieu aquatique, en santé ou dans le domaine industriel.

III.3.1 .Biofilms d'intérêt

Les biofilms peuvent représenter un intérêt dans divers domaines. Ils peuvent être utilisés en bioremédiation, pour éliminer tant les polluants organiques que les métaux lourds (**Edwards et al,2013**). Des travaux ont permis de mettre en évidence leurs propriétés antitumorales (**Wang et al,2017**), immunomodulatrices (**Bay et al,2012**), antioxydantes (**Wang et al,2013**)et également leur intérêt dans l'industrie alimentaire, notamment comme bio-émulsifiants (**Carrión et al,2015**). Il a également été démontré leur capacité à être utilisés pour de la micro-encapsulation.

III.3.2 Problèmes engendrés par les biofilms

Si les biofilms sont étudiés pour les intérêts qu'ils présentent et qui peuvent éventuellement être exploités, ils le sont également pour les problèmes qu'ils posent dans divers domaines : milieu marin, domaine de la santé, industrie etc.

III.3.2.1milieu aquatique

Le biofouling est un phénomène naturel, lié à la richesse en microorganismes du milieu aquatique. Cependant, il peut également se mettre en place sur des surfaces artificielles immergées (pipelines, coques de navires, plate-forme pétrolière, installations d'aquaculture, etc.) avec des conséquences :

- L'accélération de la corrosion
- La perturbation de l'hydrodynamique des navires
- L'introduction d'espèces invasives, avec risque de perturbation des écosystèmes
- La perturbation de l'aquaculture

III.3.2.2 Biofilms dans le domaine de la santé

Les infections à biofilm posent ainsi d'importants problèmes thérapeutiques, mais également des problèmes de diagnostic, car les techniques classiques de microbiologie sont principalement adaptées au mode de vie planctonique (**Burmølle et al,2010**). Ces infections peuvent être de divers types et être à la base de pathologies variées, parfois graves voire mortelles.

Les infections à biofilm sont également retrouvées dans les infections ostéo-articulaires chroniques, que celles-ci soient liées à du matériel implanté, consécutives à une diffusion hématogène ou par contiguïté.

On peut enfin noter l'implication des biofilms dans les échecs de traitement des infections gynécologiques, pouvant être cause d'infertilité(**Muzny et al,2015**).

III.3.2.3 Autres domaines subissant l'impact des biofilms

L'impact des biofilms en industrie s'avère non négligeable. Dans l'industrie agroalimentaire, ils favorisent le périssabilité des denrées alimentaires et entraînent des risques sanitaires pour les consommateurs (**Muzny et al,2015**). Ils vont aussi être à l'origine de la dégradation des infrastructures (**Usher et al,2014**).

III.4 Stratégies de lutte contre les biofilms (antibiofilm)

Au regard des problèmes posés par les biofilms, différentes stratégies de lutte ont été envisagées et expérimentées dans les différents domaines concernés. Quel que soit le domaine, les stratégies adoptées visent 2 buts : d'une part prévenir l'adhésion des microorganismes et/ou éliminer ceux-ci, et ce, d'autre part, tout en prenant en compte la contrainte de limiter voire annihiler les effets adverses sur l'environnement et l'homme(**Muzny et al, 2015**).

Partie 2:
Etude expérimentale



Chapitre III
Matériel et
méthodes



I. La collection des échantillons

Les lichens utilisés dans notre étude ont été collectés (**Figure 18**) à partir de différentes régions de territoire nationale (**Figure 11**)

Les lichens utilisés sont décrits dans le (**Tableau 02**)



Figure (11) : Carte géographique montrant la zone de collecte des lichens.

Tableau (02) : Les espèces des lichens utilisés

1. *Collemplicatissimum*

Des échantillons ont été collectés au mois de mars de l'année 2021
Elghaycha –Laghouat



Figure (13) : *Collemplicatissimum*

2. *Ramalinafraxinea*

Des échantillons ont été collectés au mois de décembre de l'année 2017

Famille : Ramalinaceae

Localité : Par National de Theniet-el-Had

Substrat : sur les chênes , canton

Djouareb



Figure (14) : *Ramalinafraxinea*

3. *xanthoria parietina* ,

Des échantillons ont été collectés au mois octobre de l'année 2017

Lieu de récolte : Par National de Theniet-el-Had (Tissemsilt)

Substratum : Sur un petit rameau tombé de cèdre de l'atlas



Figure (15) : *xanthoria parietina*

4. *Anaptychiaciliaris* (L) kob

Des échantillons ont été collectés au 14/06/014

Lieu de récolte : Par National de Theniet-el-Had (Tissemsilt)

Substratum : Sur un tronc de Cèdre de l'atlas



Figure (16) : *Anaptychia ciliaris* (L) kob

5. *Pseudevernia Furfuracea*

Il a été acheté chez l'herboriste

Lieu de récolte : Cheréaa (Blida)



Figure (17) : *Pseudevernia Furfuracea*

Les espèces de nos échantillons sont identifiées par un expert en botanique



Figure(18) : Récolte des lichens

II. Préparation des échantillons

Les échantillons sont lavés avec l'eau de robinet pour être débarrasser des particules poussiéreuses.

Après cela les lichens sont séchés à l'air libre à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 72 h (Le séchage est un procédé qui consiste à abaisser la teneur en eau pour que les réactions d'altération ne puissent plus se produire, et pour limiter la prolifération des microorganismes. Après cela, les lichens sont broyés et réduits en poudre très fines (Le broyage permet d'augmenter la surface de contact entre le solvant et le lichen).

Après la collecte, le nettoyage et le séchage des lichens, nous avons procédé à l'extraction des extraits bruts méthanoliques par macération. Par la suite, nous avons déterminé et évalué les activités biologiques (antioxydants, antimicrobienne, et antibiofilme) pour chaque extrait.

III. Préparation des extraits bruts :

L'extraction est réalisée par macération à température ambiante pour éviter la dégradation potentielle de certains composés (notamment les depsides, sensibles à la chaleur) (Vila J. et al., 2011). La macération est une méthode qui consiste à laisser la poudre de lichen en contact prolongé avec un solvant (Lagnica. ; 2005).

Le principe consiste à faire imprégner 10 g de poudre de lichens de chaque espèce dans un volume de 100 ml du solvant (méthanol), dans un erlenmeyer, sous agitation magnétique (pour augmenter le contact avec le solvant) à la température ambiante pendant 24h.

Après la macération on a fait la centrifugation grâce à une centrifugeuse à une vitesse de 4000 tours /min pendant 20 min ; pour récupérer l'extrait (surnageant), pour les cinq échantillons de lichens,

L'extrait méthanolique, est concentré sous vide au rota vapeur rotatif à température 40°C et à une vitesse de 90 tours /min pour évaporer le solvant (Yu et Dahlgren., 2005).

Le résidu sec obtenu est ensuite pesé et on l'ajoute 3ml de méthanol pour la préparation de l'extrait brut méthanolique de chaque un de concentration bien connu.

III.1. Rendement de l'extraction

Le rendement d'extraction est le rapport entre le poids d'extrait après évaporation et le poids des lichens en poudre à extraire. Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \{(P1 - P0) / E\} \times 100$$

Avec :

R (%) : Rendement exprimé en %.

P1 : poids de ballon rempli après évaporation en (g).

P0 : poids du ballon vide après évaporation (g)

E : poids initial de la poudre végétale en (g).

IV. Evaluation des activités biologiques des lichens

IV.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne

L'origine des souches de références c'est le laboratoire de : Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédicale et à l'Environnement "LAMAABE", université de Tlemcen une utilise de l'activité antimicrobienne contre Sept souches bactériennes : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus* ATCC 49733 , *Bacillus subtilis* ATCC 11778 Gram-positif tandis que *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 26790, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 sont à Gram-négatif, et un levure de *Candida sp* IP 444 .

VI.1.1 préparation de la suspension

Les bactéries préalablement gardées au réfrigérateur à 4°C ont été revivifiées .Pour cela, quelques colonies de chaque souche ont été prélevées et mises dans des tubes contenant un Bouillon BHIB, à raison d'une souche de bactéries par tube. Ces derniers subissent, ensuite, une incubation à 37°C pendant 18 à 24h.

Après la revivification, vient l'étape de la préparation de l'inoculum, consistant à réaliser des suspensions bactériennes, de chaque souche, dans l'eau physiologique à 0,9% avec une concentration correspondante à une densité optique située entre 0,08 et 0,1, laquelle a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre avec une longueur d'onde située à 620nm. (**Bouharb et al,2014**) .

IV.1.2. mise en évidence de l'activité antimicrobienne par un méthode de disque

L'étape de l'ensemencement s'effectue dans une zone stérile, qui doit se faire dans les 15mn qui suivent la préparation de l'inoculum. Il consiste à tremper l'écouvillon dans la suspension puis le frotter après l'avoir étalé sur la totalité de la surface gélosée de façon à former des stries serrées en tournant la boîte à environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution uniforme de la suspension. (**Kahina et al,2008**)

Avec un écouvillon, l'ensemencement de 15 mL environ de notre milieu de culture a été réalisé sur une boîte de pétrie.

Les disques de papier buvard (Wattman n°1) stérile de 6mm de diamètre imbibé de 15µl des extraits *Ramalina fraxinea* , *xanthoria parietina* , *Anaptychia ciliaris*, *Pseudevernia Furfuracea* sauf pour l'extrait de *Collema plicatissimum* de 10µl ; sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose à l'aide d'une pince stérile, de raison que dans chaque boîte de pétri deux disques.

- Les boîtes ont été laissées pendant 30min à température ambiante pour une rediffusion des substances.

- Incuber à 37°C à l'étuve pendant 24h. (Aouni *et al*, 2013)
- La lecture se fait à l'aide d'une règle graduée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque et les résultats obtenus sont exposés dans un tableau (résultat et discussion).

IV.2 Evaluation de l'activité antioxydant

Les antioxydants présentent une grande diversité moléculaire agissant contre les processus d'oxydation, Afin d'évaluer l'activité antioxydant des extraits, deux tests ont été réalisés pour les extraits méthanoliques brutes :

Test DPPH• ou (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl)

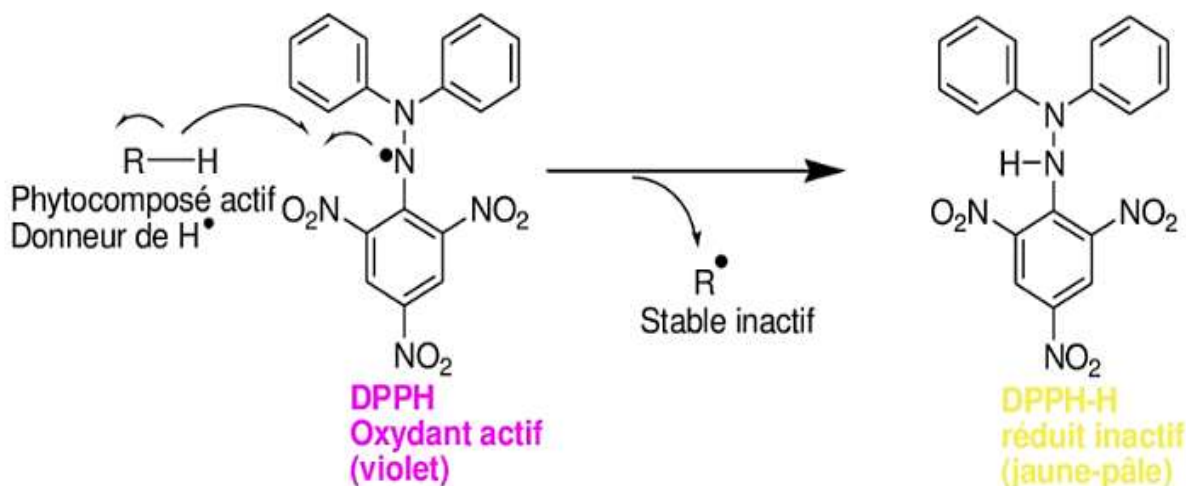
Test ABTS•+ ou (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6- sulphonic acid)).

Chacun des précédents tests a été comparé par rapport à un antioxydant de synthèse (acide ascorbique).

IV.2.1 Le test d'inhibition du DPPH

C'est une méthode plus utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydant.

Le DPPH ou 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle agit en tant qu'un radical libre stable efficace réduit par un antioxydant, montrant un spectre d'absorption à 517 nm avec une couleur violette, la réduction de ce radical nous donne la coloration jaune.



Figure(19) : Mécanisme de piégeage du radical DPPH (Konan *et al.* 2017).

On fait la manipulation avec des dilutions d'échantillon d'essai avec des concentrations croissantes différentes, pour chaque essai on complète le volume (extrait + méthanol) à 50 µl, puis l'ajout d'un 1.450 ml de réactif de DPPH. Les mélanges sont vigoureusement agités au vortex et mis en obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Après agitation au vortex,

la lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre calibré par le méthanol à 517 nm.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition, calculés suite à la diminution de l'intensité de la coloration du mélange, selon la formule :

$$I\% = \left(\frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échant}}}{A_{\text{blanc}}} \right) \times 100$$

Où :

A échant : Absorbance de la solution de DPPH· en présence d'extrait.

A blanc : Absorbance de la solution de DPPH· sans d'extrait.

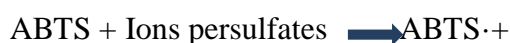
Méthode de calcul d'EC50

Les graphes de pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des échantillons, nous permettent d'obtenir la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer la concentration DPPH· initiale à 50%.

Cette valeur est appelée la concentration efficace EC₅₀ et parfois notée IC₅₀. Une faible valeur d'EC₅₀ correspondant à une grande efficacité de l'extrait.

IV.2.2 Méthode de piégeage du radical libre ABTS

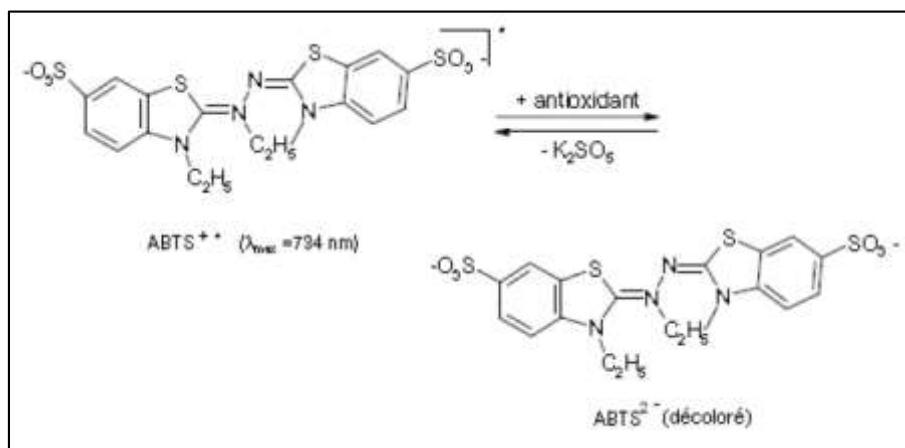
Ce test basé sur la capacité d'un antioxydant à stabiliser le radical cationique ABTS·⁺ de coloration vert bleu en le transformant en ABTS incolore. Le radical préformé ABTS·⁺ est généré en présence des ions persulfates.



Cette méthode est basée sur la capacité des composés à piéger le radical-cation ABTS·⁺. Le radical ABTS·⁺ est formé par oxydation de l'ABTS incolore avec le persulfate de potassium K₂S₂O₈. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de H·), le radical d'azote concerné piège un C conduisant à l'ABTSH₂⁺, ce qui entraîne la décoloration de la solution.

L'absorbance résiduelle du radical ABTS·⁺ est mesurée à 734 nm après 6 minutes.

Ce test est simple, opérationnel, reproductible, et peut être utilisé dans différents milieux.



Figure(20) : Réaction du radical ABTS^{•+} en présence d'un antioxydant

Pour préparer le radical ABTS^{•+} nous avons ajouté 7mM de ABTS^{•+} à 2,45mM de persulfate de potassium.

Le mélange a été incubé à l'obscurité et à température ambiante, pendant 24heures. La solution d'ABTS^{•+} obtenue est diluée dans du méthanol de manière à ce que l'absorbance du mélange soit de 0,71 à 734 nm.

Dans des tubes à essai, 50 µL de chaque dilution de l'extrait est mélangé avec 0.95 mL de la solution d'ABTS^{•+}, le mélange est incubé à l'obscurité pendant 6 min. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre UV Visible à 734 nm.

L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôles positifs.

Selon Gouzi et al, 2013, L'activité d'inhibition du radical ABTS est calculée selon la formule suivante:

$$A(\%) = (A_0 - A_1/A_0) \times 100$$

Avec:

A0: Absorbance de l'ABTS (seul)

A1: Absorbance de l'ABTS + échantillon à tester.

Méthode de calcul d'EC50

La concentration inhibitrice de 50% des radicaux ABTS (IC50) est calculée de la même manière que celle effectuée pour le radical DPPH.

IV.3 Evaluation de l'activité antibiofilm

Les Souches bactériennes utilise : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. l'extrait testes : les extraits méthanolique des Cinq lichens *Collema plicatissimum* , *Ramalina fraxinea*, *xanthoria parietina* , *Anaptychia ciliaris* , et *Pseudevernia Furfuracea*.

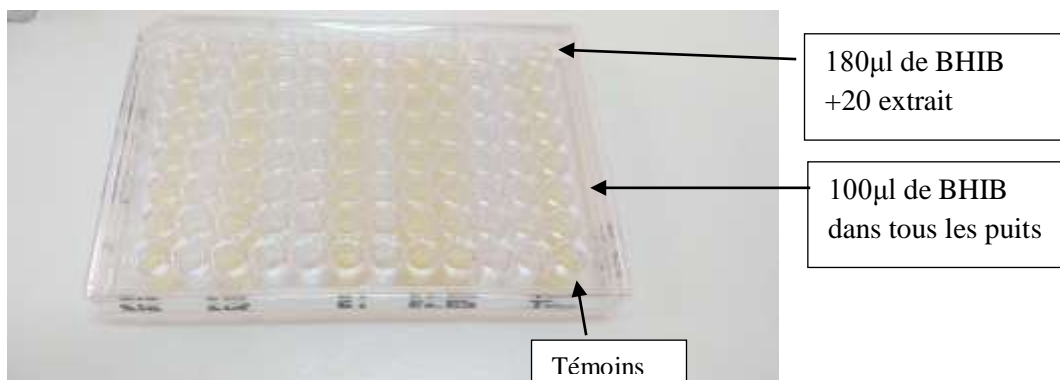
IV.3.1 Préparation des cultures bactériennes

Une suspension bactérienne est préparée dans 10 mL de milieu BHIB à partir d'une culture jeune de *Klebsiella pneumoniae* obtenue sur gélose Mac Conkey. La suspension ainsi préparée est incubée dans un premier temps à 37°C pendant 24 heures la densité optique de la suspension bactérienne est ajustée à 600 nm de sorte à obtenir les valeurs de DO entre 0.08 et 0,1. (Barchan et al, 2016)

IV.3.2 le protocole de l'activité antibiofilm

Protocole de méthode N°1

- Inoculer 150µl de suspension dans les puits de microplaque
- l'incubation est réalisée à 37 ° C pendant 24 h.
- Les puits sont lavés trois fois avec l'eau distillée stérile, et laisser sécher 15min à Température ambiante.
- Chaque puits contient 100 µL de BHIB, ajouté à la première ligne 80µl BHIB et 20µl de extrait, nous obtenons 200µl. Après bien mélange on prend 100 µL de mélange et inoculés dans le 2em puits. et on fait le même avec les autres puits et dans le dernier puits ont éliminés le 100µl.
- laver trois fois avec l'eau distillée stérile



Figure(21) : Combinaison sur microplaque de 96 puits

- Ajouter 200 µl de cristal violet et incuber 30 min à Température ambiante.
- Laver trois fois avec l'eau distillée.
- La lecture se fait avec le lecteur de microplaque. (Al-Sohaibani, S., & Murugan, K.2012).

Protocole de méthode N°2

- Inoculer 150µl de suspension dans les puits de microplaque
- Chaque puits contient 150 µL de suspension, ajouter à la première ligne 130µl suspension et 20µl de extrait, nous obtenons 300µl sont inoculés à 150µL dans chaque puits . Et dans le dernier puis sont éliminés 150µl.

nous avons évalué leur effet à sous-inhibiteur concentrations ($1/2\times$, $1/4\times$ et $1/8\times$ MIC) sur à la fois l'adhésion et la formation de biofilm *Klebsiella pneumoniae* de sur polystyrène.

- l'incubation est réalisée à 37 ° C pendant 24 h.
- Les puits sont lavés trois fois avec l'eau distillée, et laisser sécher 15min à Température ambiante
- Ajouter 200 µl de cristal violet et incuber 30 min à Température ambiante.
- Laver trois fois avec l'eau distillée.(Neelakantan et al,2015)

Les résultats se fait avec le lecteur spécifique de microplaque. les résultats des différents concentrations des dilution des extraits et les lectures des densité optique sont résume dans un tableau (résultat et discussion)

Chapitre IV
Résultats et
discussions



I. Résultat de rendement total d'extractions méthanolique

Le méthanol est un solvant très efficace pour l'extraction des composés relativement polaires et apolaire des lichens. Par conséquent, nous avons utilisé également ce solvant pour la préparation des extraits bruts de nos espèces.

Les résidu de chaque extraction sont pesés pour calculer le rendement ; celui-ci varie en fonction de l'espèce lichenique , la composition chimique des échantillons et la nature du solvant et de sa polarité.

Le rendement d'extraction méthanolique est exprimé en pourcentage (%), il est calculé à partir du poids du résidu sec obtenu après évaporation sous vide et la prise d'essai initiale(g), Les résultats sont présentés dans le (**Tableau03**)

Tableau (03): le rendement total d'extractions RET des extraits méthanoliques des lichens

Extraits des lichens	Poids initial (g)	poids de résidu sec (g)	Rendement(%)	Couleur d'extrait
<i>Ramalina fraxinea</i>	1,18	0,072	6,102	marron
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	2,179	0,109	5,002	vert fonce
<i>Xanthoria parietina</i>	2,68	0,19	7,089	Marron
<i>Anaptychia ciliaris</i>	1,795	0,109	6,072	verte
<i>Collema plicatissimum</i>	8,207	0,09	0,739	Marron fonce

D'après le tableau (03), le rendement d'extraction méthanolique des lichens obtenus varient de 0,739 % à 7,089 %.

Nous constatons que les rendements de l'extraction méthanolique varient considérablement. L'espèce de *Xanthoria parietina* donne clairement le meilleur rendement (7,089%) suivie par des resultats tres proches et grandes relativement des lichens de *Ramalina fraxinea* ,*Anaptychia ciliaris*,et *Pseudevernia furfuracea* des valeurs successive ;6.102%,6.072% ,6.072% .

Le rendement le plus faible est celui de l'extrait de *Collema plicatissimum* de l'ordre de 0,739 %D'autre part , le rendement en extrait methanolique de *Pseudevernia furfuraceas* (**5,002%**)est

supérieur par rapport à ceux obtenu par (Bouladjoul A et Boumomez H 2018), de la même espèce qui sont de (3,63 %).

Le rendement d'extraction est tributaire de plusieurs facteurs qui peuvent influencer les performances de l'extraction, tels que la taille des particules, la nature du solvant, la température, le temps d'extraction et le degré d'agitation.

II. Evaluation de l'activité biologique des extraits lichéniques

II.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne

Le potentiel antimicrobien de notre extraits lichéniques a été évalué par l'utilisation des souches bactériennes de différentes structures cellulaires: *Staphylococcus aureus*; *Micrococcus*; *Bacillus subtilis*, Gram-positif tandis que *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *K. pneumoniae* à Gram-négatif et un levure: *Candida sp*

Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous résumes la présence ou l'absence de l'activité antimicrobienne exprime en zone d'inhibition en mm.

Tableau (04): Diamètre des zones d'inhibition en (mm) obtenu par les extraits méthanoliques des lichens.

Les souches /les lichens					
	<i>Anaptychia ciliaris</i>	<i>xanthoria parietina</i>	<i>Collemapli catissimum</i>	<i>Pseudeverna Furfuracea</i>	<i>Ramalina fraxinea</i>
<i>S.aureus</i>	-	-	-	11.52 mm	11.50mm
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	10.57 mm	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	/	13.3 mm	18.30 mm
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	15.5mm	8.68 mm
<i>Candida Albicans sp</i>	-	-	-	11.6 mm	18.45 mm

<i>Escherichia coli</i>	/	/	-	/	/
<i>Micrococcus</i>	/	/	-	/	/

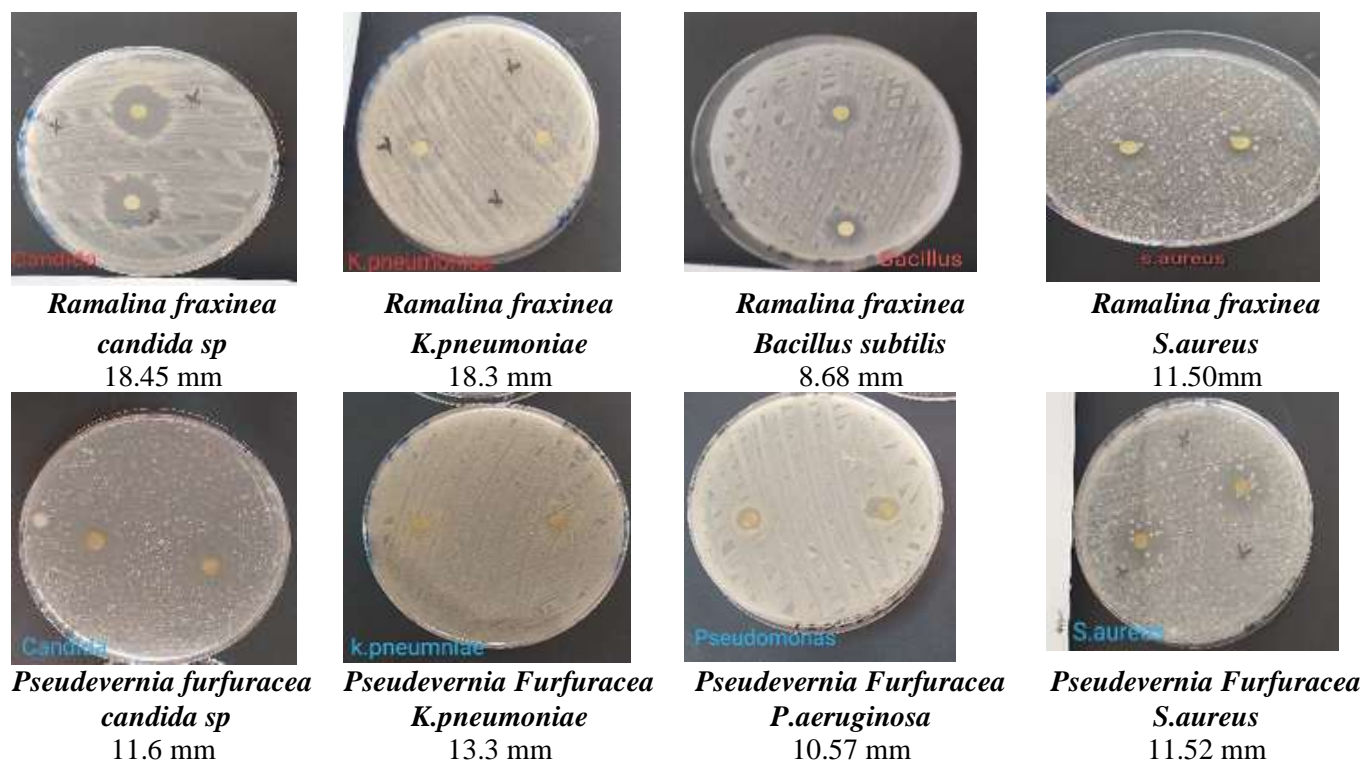


Figure (22) : Diamètre des zones d'inhibition en (mm) obtenu par les extraits méthanoliques des lichens *Ramalina fraxinea* et *Pseudevernia Furfuracea* .

L'extraits des lichens *Anaptychia ciliaris*, *xanthoria parietina* , *Collema plicatissimum* n'a provoqué aucune zone d'inhibition sur la multiplication de tous les Sept souches, alors que les les deux extraits des lichens *Pseudevernia Furfuracea*, *Ramalinafraxinea* montrent une activité anti microbienne. En effet, l'extrait préparé à partir de *Ramalina fraxinea* montre une activité antimicrobienne contre quatre souche de références des zones d'inhibitions varient entre (Tableau 04), (Figure 22,23,24), alors qu'une activité n'a été observé contre *Pseudomonas*, tandis que une faible diamètre d'inhibition a été observés contre *Bacillus subtilis*(8.56mm). Le diamètre le plus élevé a été noté contre les souches , *Klebsiella pneumoniaen*, *Candida sp.* avec un diamètre égal à 18.4-18.56 mm, respectivement.

En fonction des diamètres des zones d'inhibition des bactéries testées on a classé les extraits en trois catégories : ceux non actifs, ceux à activité moyenne et ceux à forte activité antibactérienne

(Tableau 04) .Selon les résultats obtenus on a constaté que les diamètres des zones d'inhibition varient en fonction de l'extrait et de la souche testée.

La plupart des souches Gram (+) se sont montrées une sensibilité vis-à-vis des différents extraits avec des diamètres supérieures dans la plupart des cas. Alors que les trois souches Gram (-) se sont montrées une résistance contre la majorité des extraits.

Selon **Barchan (2015)** ,29 % des extraits testés ont montré une forte activité contre les bactéries Gram (+) alors que seulement 13 % des extraits étaient actifs contre les souches Gram (-).

En effet, les activités antibactériennes des extraits de lichens varient en fonction des solvants utilisés pour les extractions ainsi que des bactéries testées et notamment de la composition de leur paroi, qui est différente chez les bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif. Les premières sont généralement plus sensibles à l'activité antimicrobienne des métabolites lichéniques que les secondes (**Rowe et al., 1989**).

L'activité antimicrobienne in vitro démontrée par ces composés notamment contre Gram positif micro-organismes, pourrait fournir la base pour le développement de nouveaux médicaments pour lutter contre la mucoviscidose Infections à *S. aureus*. Cependant, au meilleur de nos connaissances, (**Pompilio,2013**)

L'effet des lichens *Ramalina fraxinea* et *Pseudevernia Furfuracea* sur la croissance de quelques bactéries a Gram négatif et à Gram positif et *Candida spa* été déterminé à l'aide d'un histogramme (**Figure23, 24**).

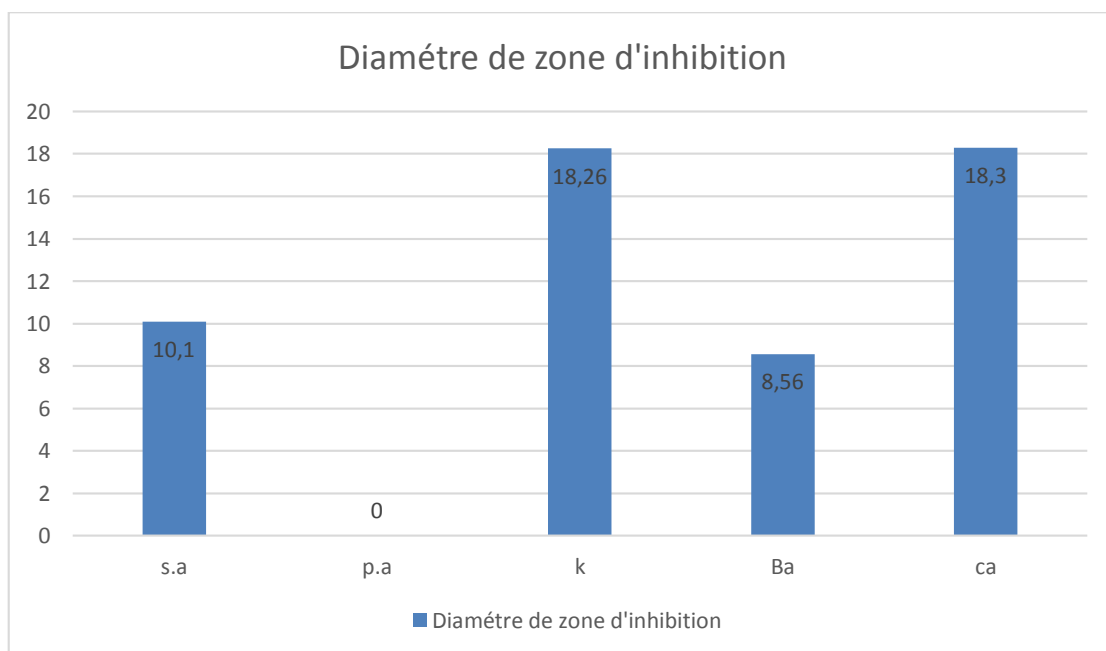


Figure (23) : Les diamètres des zones d'inhibition de *Ramalina fraxinea* vis-à-vis les cinq bactéries.

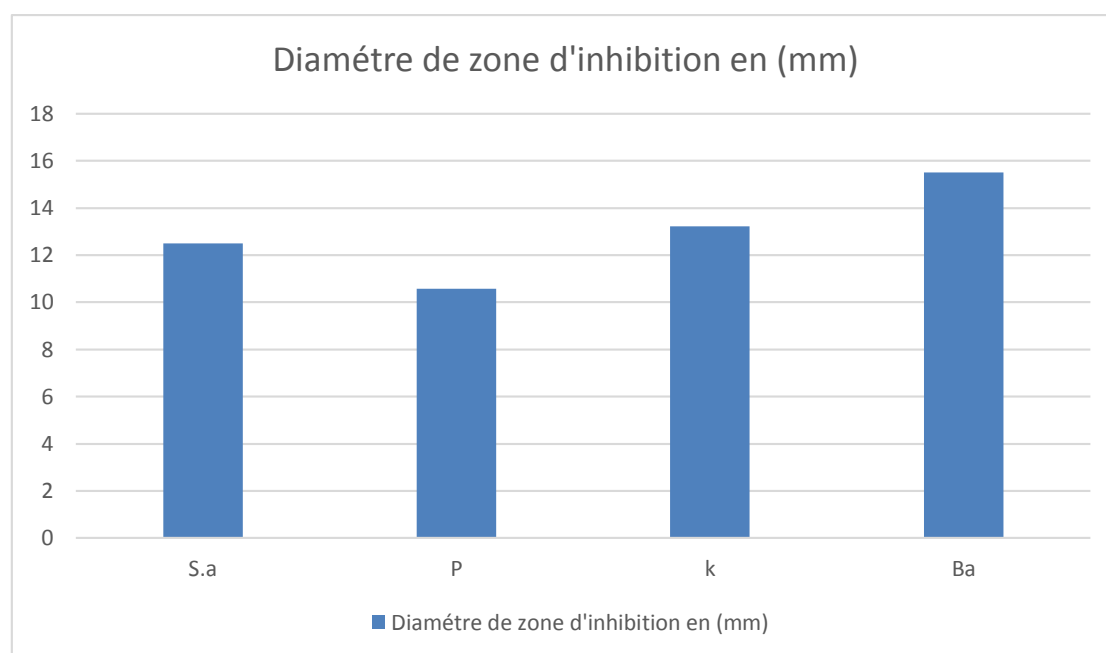


Figure (24) : Les diamètres des zones d'inhibition de *Pseudevernia Furfuracea* vis-à-vis des cinq bactéries.

II.2. Evaluation de l'activité antioxydante

Les courbes d'étalonnages et de l'activités antioxydante et antiradicalaire sont effectuées à l'aide du logiciel origine (logiciel de traitement et d'analyse des données scientifiques Microsoft Windows développé par Originlab).

II.2.1 Activité anti radicalaire contre le DPPH

Le DPPH° est un radical libre stable, largement utilisé comme outil pour estimer les activités de piégeage et nettoyage des radicaux libres par les antioxydants (Krishnaiah et al., 2010). Les courbes ci-dessous rapportent les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction de différentes concentrations de nos extraits et de l'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence.

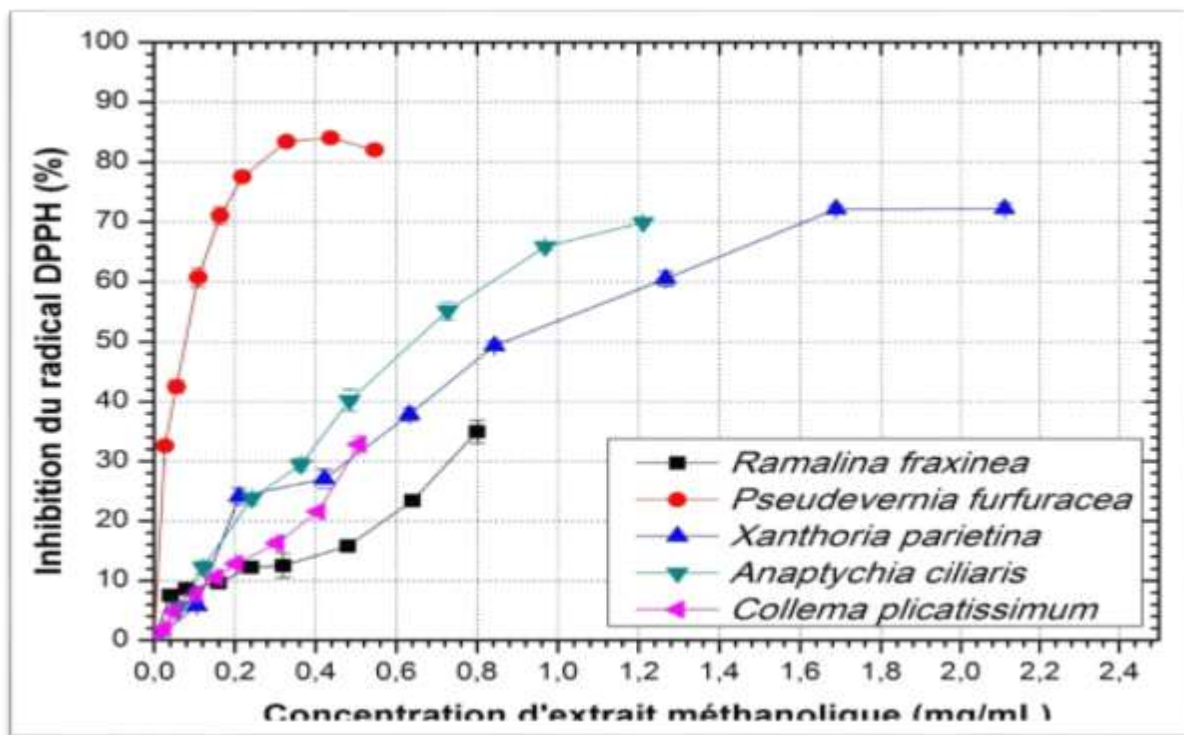


Figure (25) : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits méthanolique des lichens.

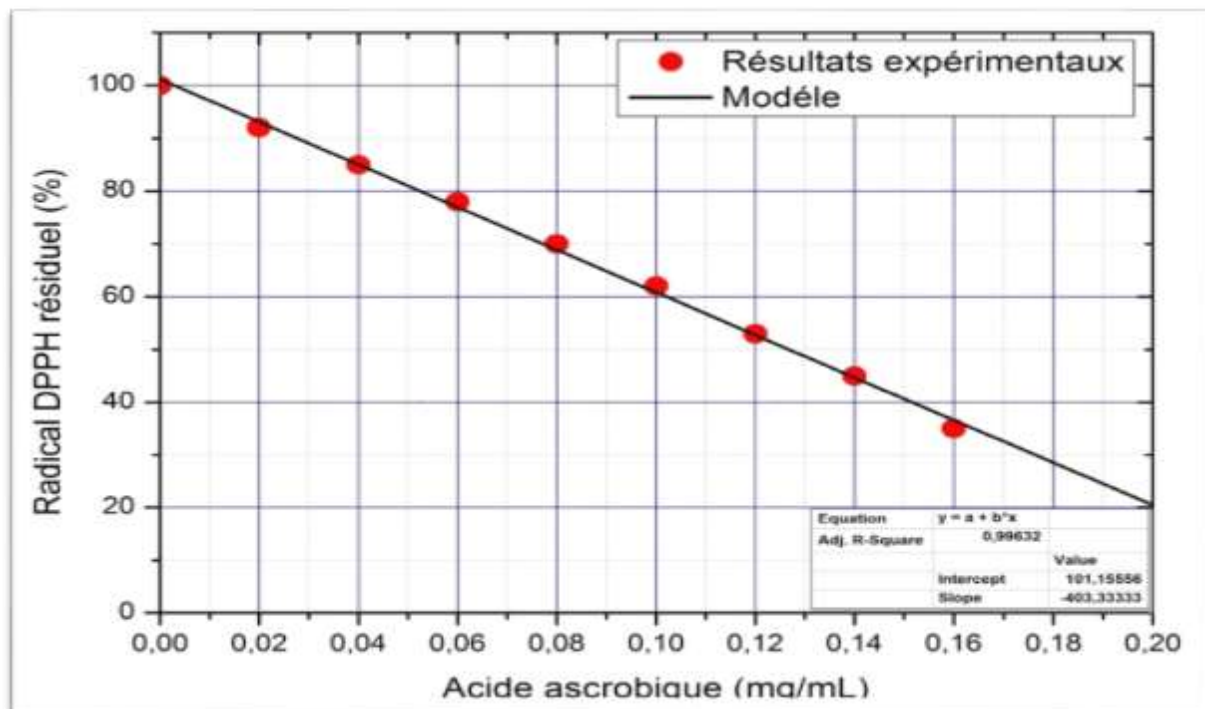


Figure (26) : pourcentage de réduction de radical DPPH en fonction de concentration d'acide ascorbique

D'après la (**figure 25**), les extraits méthanoliques présentent une capacité à piéger le radical DPPH°. Le pourcentage d'inhibition est différent d'une concentration à une autre. Le pourcentage d'inhibition le plus élevé est enregistré chez *Pseudevernia furfuracea* à la concentration de 0,547mg/ml (82,40%), puis (73,09%) pour *Xanthoria parietina* ; (70,98%) pour *Anaptychia ciliaris* à la concentration 1,23 mg/ml ; et pour les plus faibles valeurs enregistrée pour *Ramalina fraxinea* et *Collema plicatissimum* successivement (36. 54%) ;(34,50%) à la concentration de 0.8mg/ml et 0 ,5mg/ml

Pour l'extrait méthanolique (**Figure 26**) le pourcentage d'inhibition de *Pseudevernia furfuracea* est le plus élevé à celui des autres espèces et ceux enregistrés par l'acide ascorbique pour toutes les concentrations.

En Algérie, Des résultats proches de ceux trouvés par **Bouladjoul A et Boumizez H 2018**, ont trouvé que l'extrait de *Pseudevernia furfuracea* qui a donné un pourcentage d'inhibition de l'ordre de **94,43 %** à une concentration de 1.15 mg/ml .

D'après **Djaber Sarra Medguedem Saliha 2019** sont trouvés une très faible capacité à piéger le radical DPPH par rapport à nos résultats ; (73,09%) pour *Xanthoria parietina* ; (70,98%) pour *Anaptychia ciliaris* à la concentration 1,23 mg/ml. Qui sont déterminés par le taux d'inhibition du *Xanthoria parietina* est égal à 38.23% à une concentration de : 2mg/ml et *Anaptychia ciliaris* une valeur de d'inhibition de 15.24% à une concentration égale à : 2 mg/ml.

- **Calcul des IC50**

L'IC50 exprime la concentration capable de piéger 50% du radical DPPH dans le milieu, est un paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydant.

Plus cette concentration est faible plus le pouvoir antioxydant est élevé (**Brand-Williams et al, 1995**), Les valeurs d'IC50 des extraits testés est représentées dans le (**tableau 05**)

Tableau (05) : Valeur d'IC50 des extraits testés. et de l'acide ascorbique de test de DPPH

Echantillon	DPPH (EC ₅₀ ; mg/ml)
<i>Ramalina fraxinea</i>	0
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	0,085
<i>Xanthoria parietina</i>	0,869
<i>Anaptychia ciliaris</i>	0,643
<i>Collema plicatissimum</i>	0
référence acide ascorbique	0,12

Les résultats obtenus sont illustrés en histogrammes représente le classement croissant EC_{50} des extraits lichénique et de l'acide ascorbique d dans la (Figure 27).

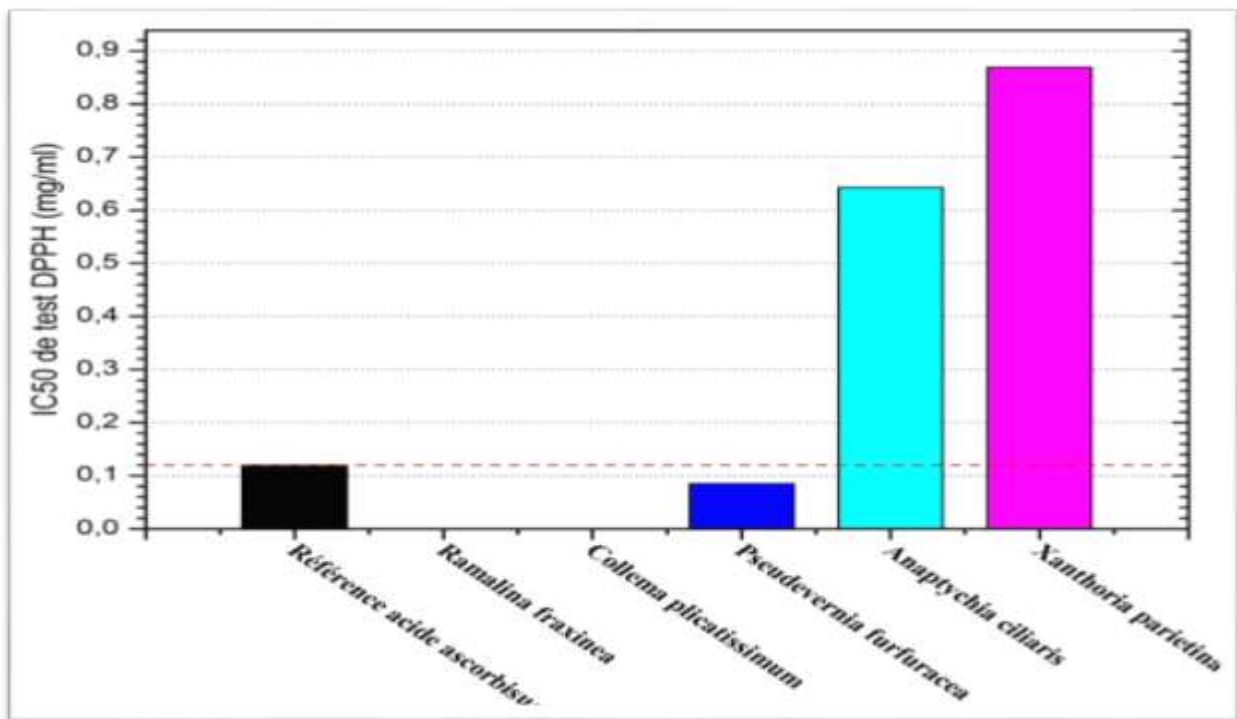


Figure (27) : Histogramme de classement croissant d'IC₅₀ de radical DPPH

Les résultats mentionnés dans la (Figure27) révèlent la capacité des extraits de ;*Pseudevernia furfuracea* , *Anaptychia ciliaris* ;,et *Xanthoria parietina* à piéger le radicale libre (DPPH).On constate que une faible concentration pour piégé 50% du radical DPPH a leure classement croissant (IC₅₀= 0.085.0.643/0.869 mg/ml successivement)par rapport les deux extraits de *Ramalina fraxinea* ;et *Collema plicatissimum* qui n'ont pas une valeur concederable.et paraport la concentration enregistrée par l'acide ascorbique(IC₅₀= 0 .12mg/ml)qui est utilisé comme antioxydant de référence.

On constate que le lichen de *Pseudevernia furfuracea* a un pouvoir antioxydant trèsélevé qu l'antioxydant déréférence (l'acide ascorbique) où sa valeur d'IC₅₀est **0,085mg /ml** inferieure a sa de l'acide ascorbique IC₅₀ **0,12mg/ml**

A la lumière de résultats précédents, Peut dire L'activité anti radicalaire et qui peut être variable en fonction de certains facteurs écologiques comme le sol, l'humidité, la sécheresse, ou en fonction de la période de la récolte de la plante, ainsi que la partie utilisée.

La capacité de piégeage du radical DPPH par l'extrait méthanolique peut être expliqué par la présence des composés plus donneur d'hydrogène ou aux composés phénoliques non polaires

comme les caroténoïdes et les tocophérols (Barros *et al.*, 2008 ; Mui *et al.*, 1998 ; Bondet *et al.*, 1997).

II.2.2 Activité de piégeage du radical libre ABTS

Le radical cation $ABTS^{•+}$ est une méthode spectrophotométrique courante pour la détermination du pouvoir antioxydant des composés. Ce chromogène (bleu vert) est facile à utiliser, possède une sensibilité élevée et permet l'analyse rapide de l'activité antioxydante d'un grand nombre d'échantillons. La formation du radical cation ABTS constitue l'une des méthodes spectrophotométrique de base pour la mesure de l'activité antioxydante des substances pures en solution, des mélanges aqueux et les boissons (Miller, 1996).

Les courbes ci-dessous rapportent les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction de différentes concentrations de nos extraits et de l'acide ascorbique utilisé comme antioxydant de référence.

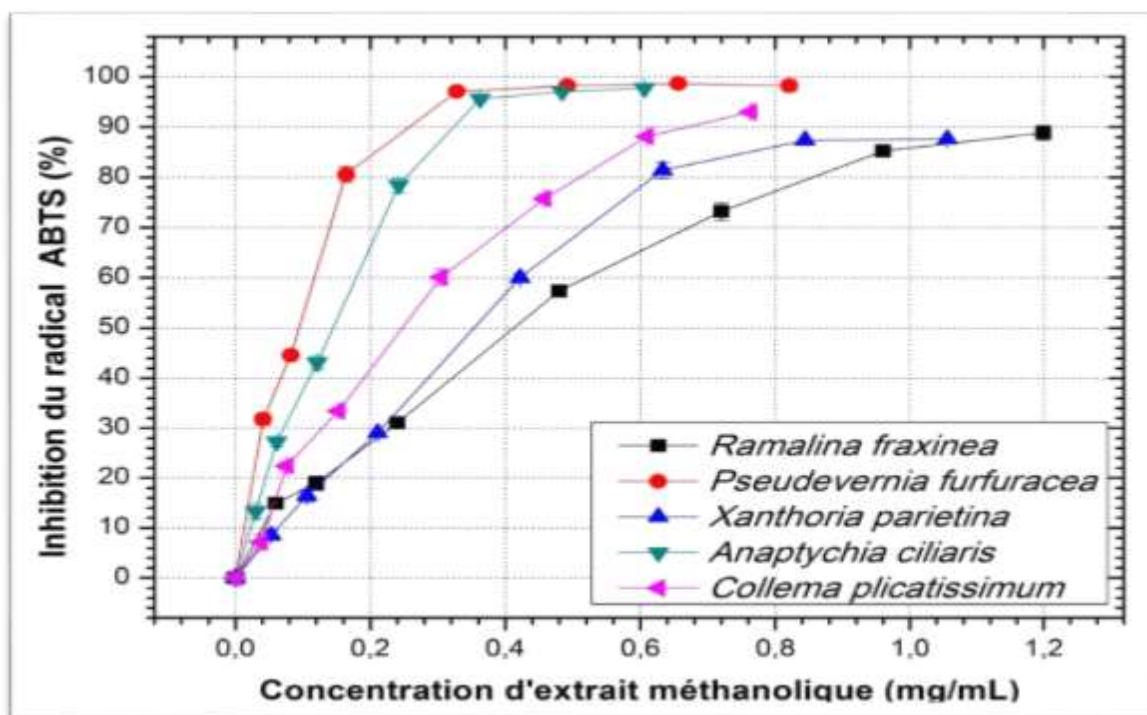


Figure (28) : Courbes de pourcentage d'inhibition d'ABTS en fonction de la concentration des extrait lichenique

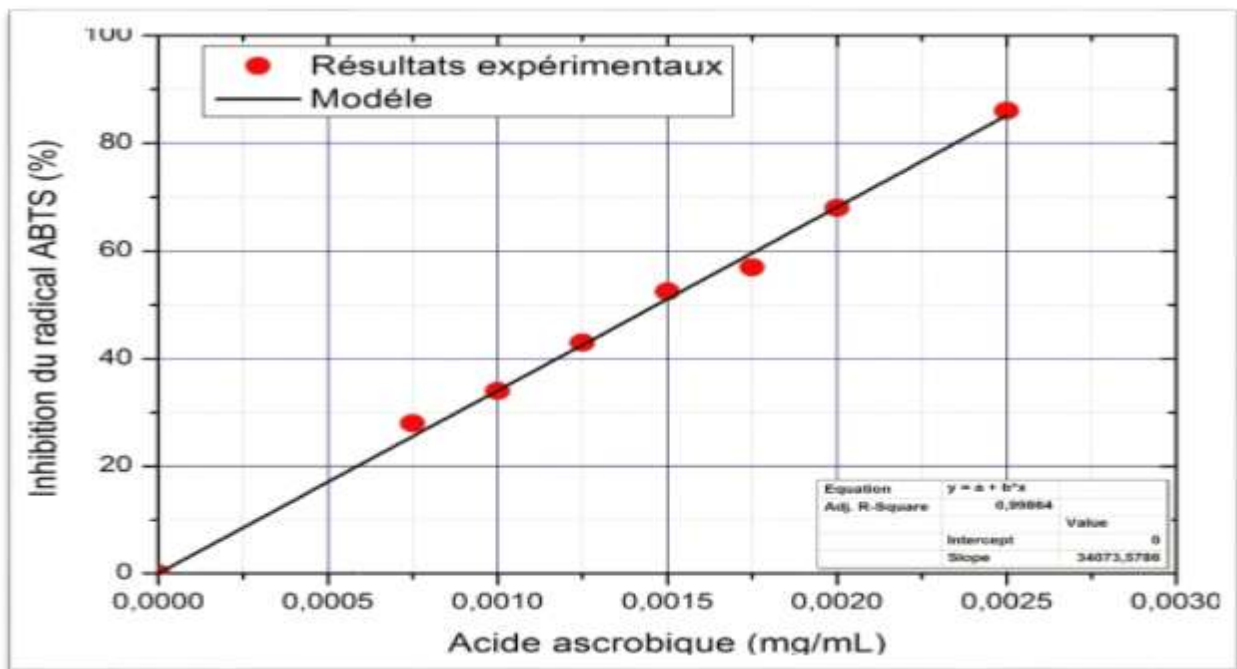


Figure (29) : pourcentage d'inhibition de radical ABT par l'acide ascorbique

L'activité de piégeage est exprimée en pourcentage d'inhibition du radical libre ABTS+ (**Figure 28**). Activité de piégeage de l'ABTS par les cinq extraits méthanoliques est faible par rapport à celle observée avec l'acide ascorbique.

Le pourcentage d'inhibition le plus élevé est enregistré chez *Pseudevernia furfuracea* à la concentration de 0,82 mg/ml (99,33%), puis (97,66 %) pour *Anaptychia ciliaris* à la concentration 0,6055 mg/ml ; et pour les valeurs enregistrées pour *Collema plicatissimum* (93,40%) ; *Ramalina fraxinea* (87,459%) et *Xanthoria parietina* (87,39%).

Pour l'extrait méthanolique (**figure 29**) le pourcentage d'inhibition de *Pseudevernia furfuracea* est le plus élevé à celui des autres espèces mais il est faible par rapport à celle observée avec l'acide ascorbique. pour toutes les concentrations.

A partir des résultats indiqués dans la (**Figure 28**), on constate aussi que la capacité de piégeage de l'ABTS⁺⁺ par l'extraits méthanolique de *Pseudevernia furfuracea* la valeur le plus élevée par rapport aux quatre autres espèces. Par conséquent, cette espèce peut être considérée donc comme une excellente source de piègeur du radical cationique.

- **Calcul des IC50**

L'IC50 exprime la concentration capable de piéger 50% du radical ABTS dans le milieu, les résultats sont résumés dans le tableau suivant ; elle est exprimée en (mg/ml).

Tableau(06) : Les résultats obtenus sont illustrés en histogrammes représente le classement croissant EC_{50} des extraits lichénique et de l'acide ascorbique

Echantillon	ABTS (EC_{50} ; mg/ml)
<i>Ramalina fraxinea</i>	0,413
<i>Pseudevernia furfuracea</i>	0,094
<i>Xanthoria parietina</i>	0,354
<i>Anaptychia ciliaris</i>	0,145
<i>Collema plicatissimum</i>	0,247
<i>référence acide ascorbique</i>	0,0016

Les résultats obtenus sont illustrés en histogrammes représente le classement croissant EC_{50} des extraits lichénique et de l'acide ascorbique d dans la (**Figure 30**).

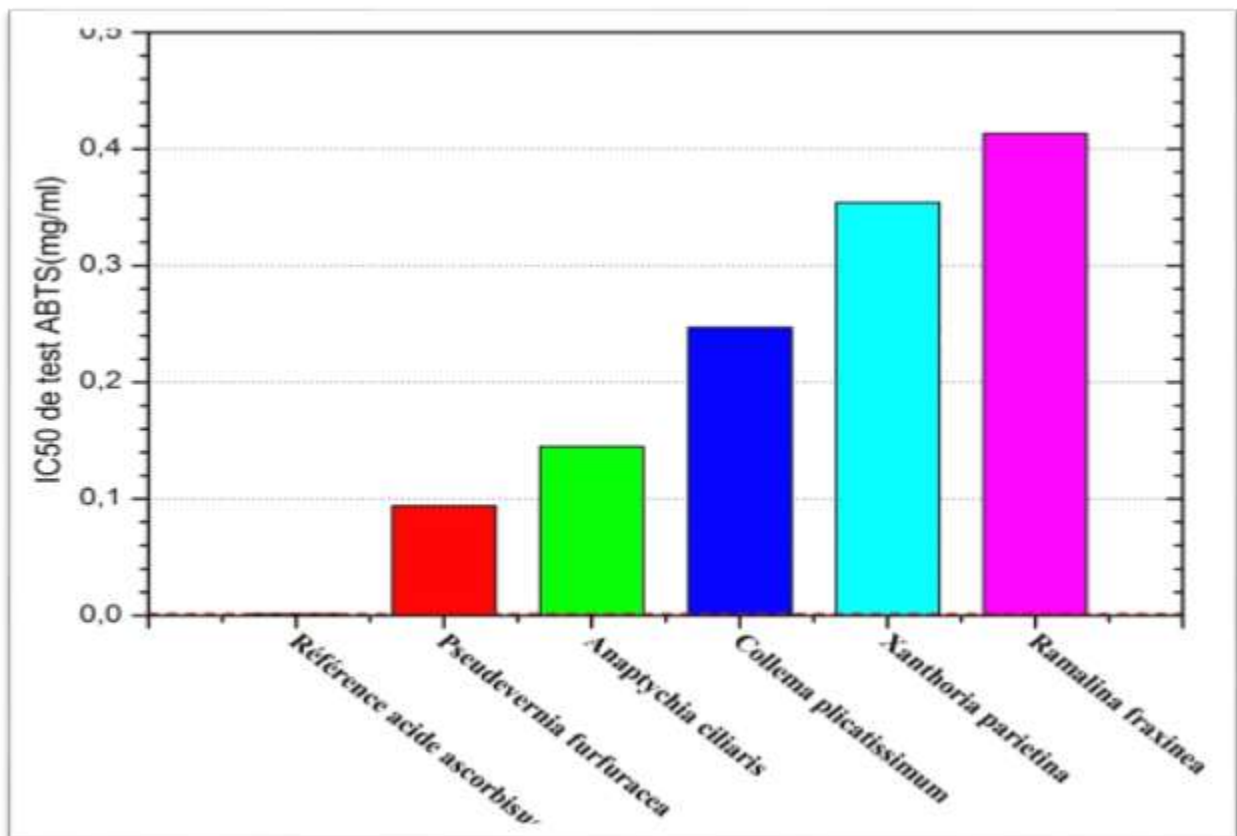


Figure (30) : Histogramme de classement croissant d'IC₅₀ de radical DPPH

Les résultats mentionnés dans la (Figure 30) représentent le classement d'ordre croissant d'IC₅₀ de différents extraits révélées la capacité des extraits de *Pseudevernia furfuracea* *Anaptychia ciliaris*, *Collema plicatissimum* *Xanthoria parietina* à piéger le radicale libre (DPPH). On constate que une faible concentration pour piégé 50% du radical DPPH a leur classement croissant (IC₅₀= 0,094 ; 0,145 ; 0,247 ; 0,354 mg/ml successivement)

par rapport l' extrait de *Ramalina fraxinea* ;et qui n'ont pas une valeur concederable.et para port la concentration enregistrée par l'acide ascorbique (IC50= 0 .0016 mg/ml)qui est utilisé comme antioxydant de référence.

II.3.Etude de l'activité antibiofilm

L'activité anti biofilm de notre extrait lichénique a été évalué par l'utilisation d'une bactérie à Gram-négatif, *Klebsiella pneumoniaen* .

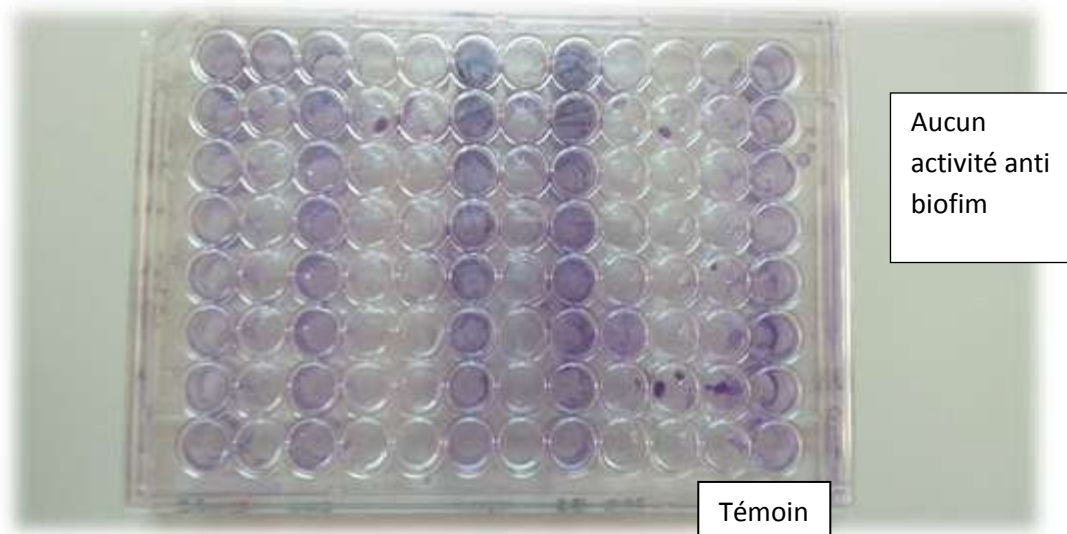


Figure (31) : Résultat de l'activité antibiofilm des lichens sur un microplaque

II.3.1.Détermination des différentes concentrations de dilution de nous extraits lichéniques

Les valeurs des concentrations et l'absorbances des différentes dilutions des extraits lichenique (Annexe 04 Protocole N°1), (Annexe 05 protocole N°2).

Aucun activité anti biofilm parce que Quelque résultats sont illogiques. Peut-être que les extraits fonctionnent dans le sens inverse, ou pour autre raison.

La classification des résultats obtenus présente sur la base du DO témoin. Les souches ont été classées comme suit : $DO \leq DO_t(\text{Témoin})$: non formatrice du biofilm, $DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$: Modérée, $DO_t \times 4 \leq DO$: Fortement formatrice du biofilm. (O'Toole ,2011)

L'élimination de la formation du biofilm par les agents antimicrobiens se traduit par une densité optique inférieure à celle de la DO initiale

Cette méthode peut être modifiée pour être utilisée avec une grande variété d'espèces microbiennes. Les microbes mobiles adhèrent généralement aux parois et/ou au fond du puits,

tandis que les microbes non mobiles adhèrent généralement au fond des puits. Les conditions optimales pour la formation de biofilm (c.-à-d. milieu de croissance, température, temps d'incubation) doit être déterminé empiriquement pour chaque microbe. Je recommande d'effectuer plusieurs répétitions pour chaque souche ou condition et comportant un contrôle positif et si possible un contrôle négatif sur chaque plaque. (O'Toole ,2011).

II.3.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de biofilm (CMIB)

La Concentration Minimale Inhibitrice de biofilm (CMIB) des 5 extraits lichéniques vis-à-vis la bactérie de *Klebsiella pneumoniae* est la plus faible concentration capable d'inhiber la formation de biofilm après un temps d'incubation de 24h.

Conclusion



La tendance mondiale dans le domaine de la recherche de nouvelles molécules bioactives est orientée vers l'exploitation du métabolisme secondaire des sources naturelles peu exploitées, dont les lichens. Pour cela, ce travail vise à évaluer l'activité biologique, notamment l'activité antioxydante, antimicrobienne et antibiofilm, des extraits méthanoliques préparés à partir de cinq espèces de lichens, dont *Pseudevernia furfuracea* ; *Ramalina fraxinea*, *Xanthoria parietina*, *Collema plicatissimum* et *Anaptychia ciliaris*), collectés à partir de trois régions différentes d'Algérie : Laghouat, Chrea et Tissemsilt.

La préparation des extraits méthanoliques a été réalisée par macération pendant 24 h dans le méthanol, le rendement le plus élevé (7,089 %), a été obtenu pour l'extrait du *Xanthoria parietina*, alors que le rendement le plus faible (0,739 %) a été obtenu pour l'extrait de *Collema plicatissimum*.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée sur sept souches bactériennes de référence, par la méthode de disque, les résultats indiquent que deux extraits de *Pseudevernia furfuracea*, *Ramalina fraxinea*, montrent une activité antimicrobienne intéressante.

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par l'utilisation de deux radicaux libres, DPPH et l'ABTS, avec l'acide ascorbique comme molécule de référence.

L'activité antioxydante la plus forte a été observée pour l'extrait de *Pseudevernia furfuracea* ($EC_{50} = 0,085$ mg/ml), en effet, ce lichen a donné une activité antioxydante plus importante que celle des autres extraits, ainsi que par rapport à la molécule de référence, l'acide ascorbique qui donne une valeur d' $EC_{50} = 0,12$ mg/ml. Le test au DPPH révèle que l'extrait actif préparé à partir de *Pseudevernia furfuracea*, peut piéger le radical libre DPPH, puisqu'il est riche en composés phénoliques, ce qui confirme leur puissante activité antioxydante (Boudjellal.N, Harouche.S (2017))., alors que le pouvoir antioxydant anti radicalaire d'ABTS a montré une activité très importante pour tous les extraits avec un meilleur pouvoir pour l'extrait de *Pseudevernia furfuracea* a une valeur d' $EC_{50} = 0,094$ mg/ml.

L'évaluation de l'activité antibiofilm indique que les cinq extraits méthanoliques ne présentent aucune activité contre le biofilm formé par la souche *K.pneumoniae*.

Les résultats obtenus à l'issue de ce travail montrent que les extraits méthanoliques des lichens étudiés ont un pouvoir antioxydant et antimicrobien intéressant. Ces activités biologiques sont liées à leur richesse en métabolites secondaires bioactives.

Plusieurs perspectives peuvent être soulevés :

- Il serait intéressant de procéder à une caractérisation qualitative, par l'utilisation des méthodes spectrales, comme l'HPLC couplé à la spectrométrie de masse, afin d'identifier les molécules bioactives présentes dans les extraits brutes des cinq lichens étudiés.
- Purification et détermination de la structure des molécules bioactive intéressante.
- Mise en évidence de d'autres activité biologique, notamment l'activité anticancéreuse, antiviral, antiparasitaire ...

Références
Bibliographiques



-A-

Abuja, P. M., & Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica chimica acta*, 306(1-2), 1-17.

Agnan, Y. (2013). Bioaccumulation et bioindication par les lichens de la pollution atmosphérique actuelle et passée en métaux et en azote en France: sources, mécanismes et facteurs d'influence (Doctoral dissertation).

Al-Sohaibani, S., & Murugan, K. (2012). Anti-biofilm activity of *Salvadora persica* on cariogenic isolates of *Streptococcus mutans*: in vitro and molecular docking studies. *Biofouling*, 28(1), 29-38.

Amandine DIEU.(2015). Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique, Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique de deux composés actifs ,université de limoge, p 7

Amara I, Miled W, Slama RB, Ladhari N. (2015),Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2018 ; 57:115-30.

Amiard, J. C. (2011). Les risques chimiques environnementaux. Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Lavoisier.

antimicrobiennes d'origine lichénique : Etude phytochimique de trois lichens & approche

Aouni, M., Pelen, F., & Soulimani, R. (2013). Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. *Phytothérapie*, 11(4), 225-236.

Aurélié LAGARDE.(2017),Études phytochimiques du lichen *Nephroma laevigatum* et de ses champignons endolichéniques. Évaluation des activités antiprolifératives et anti-biofilms, ,université de limoge, p25.

Ayari, J, Barbieri, M, Agnan, Y., Sellami, A., Braham, A., Dhaha, F., & Charef, A. (2021). Trace element contamination in the mine-affected stream sediments of Oued Rarai in north-western Tunisia: a river basin scale assessment. *Environmental Geochemistry and Health*, 1-16.

-B-

Bai Y, Zhang P, Chen G, Cao J, Huang T, Chen K. (2012),Macrophage immunomodulatory activity of extracellular polysaccharide (PEP) of Antarctic bacterium *Pseudoaltermonas* sp.S-5. *International Immunopharmacology*. ; 12(4):611-7

- Barchan, A., Bakkali, M., Arakrak, A., & Laglaoui, A.** (2016). Effet antibactérien et anti-biofilm de trois espèces de Mentha: Mentha spicata, Mentha pulegium et Mentha piperita. *Phytothérapie*, 14(2), 88-96.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., & Ferreira, I. C.** (2008). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2742-2747.
- Bellenfant S., Beguinot J., Vallade J., Sirugue D., Lemmel C,** (2010).Le groupe
- Belyagoubi, N.** (2011). Antioxidant activity of extracts of phenolic compounds from ten medicinal plants from West and Southwest Algeria (Doctoral dissertation, Doctoral thesis in Biology, University of Tlemcen, Algeria).biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. ; 97 (23) : 9909-21.
- Boissiere J.C,** (1990).Les lichens saxicoles et terricoles de la forêt de Fontainebleau, Bulletin de la Société Botanique de France.137:23,175-195.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. L. W. T.** (1997).Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH.free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- Bossokpi. I.P.L,** (2002).Etude des activités biologiques de Fagaraxanthoxyloïdes LAM
- Bouharb, H. A. Y. A. T. E., El Badaoui, K. H. A. L. I. D., Zair, T. O. U. R. I. Y. A., Chakir, S., & Alaoui, T.** (2014). Sélection de quelques plantes médicinales du Zerhoun (Maroc centrale) pour l'activité antibactérienne contre Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Applied Biosciences*, 78, 6685-6693.
- Bouladjoul, A., Boumimez, H., & Lemzeri, H. E.** (2018). *Etude phytochimique et potentiel anti-oxydant de quatre lichens de la région de Jijel* (Doctoral dissertation, Université de Jijel).
- Boustie J., & GrubeM.** (2005) ,Lichens apromising source of bioactive
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T.** (1995).Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bricaude .O,** (2010). Les lichens des forets de la region méditerranéenne francaise et leur
- Bugni, T. S., Andjelic, C. D., Pole, A. R., Rai, P., Ireland, C. M., & Barrows, L. R.** (2009). Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. *Fitoterapia*, 80(5), 270-273.
- Burmølle M, Thomsen TR, Fazli M, Dige I, Christensen L, Homøe P, Tvede M, Nyvad Cardarelli .M, Serino .G, Campanella .L, Ercole .P, De CiccoNardone .F, Alesiani .O, Rossiello. F,** (1997).Cellular and molecular life sciences, 53, 667-672

Boudjellal.N ,Harouche.S(2017) Evaluation de l'activité biologique de l'extrait brut dulichen Everniaprunastri(L.) Ach 72p.

-C-

Carrión O, Delgado L, Mercade E. (2015).New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1. *Carbohydrate Polymers.* ;117 : 1028-34.

Clauzade G., Roux ,(1987). Généralités sur les lichens et leur détermination. Tome 18, Dignac, Paris. 148p

-D-

De Cremer, D., & Van Lange, P. A. (2001). Why prosocials exhibit greater cooperation than proselves: The roles of social responsibility and reciprocity. *European Journal of personality*, 15(1_suppl), S5-S18.

Downes, L., & Mui, C. (1998).Unleashing the killer app: digital strategies for market. *Harvard Business School Press, Cambridge, MA.*

-E-

Edwards SJ, Kjellerup BV. (2013) ,Applications of biofilms in bioremediation .

Elix, J. A. (1996). A revision of the lichen genus *Relicina*.

EnrizR.D, (2002).Evaluation of antifungal and antibacterialactivities of aromaticmetabolitesfromlichens.*Bol Soc ChilQui'M* 47:235-240

Evans .P, Halliwell .B, (1999).Free radicals and hearing: Cause, consequence, and criteria.*Annals of the New York Academy of Sciences.*884: 19-40.

Failure and Recurrence in Vaginal Infections. *Clin Infect Dis.*; 61 (4) : 601-6.

-F-

Fraser, M. H., Cuerrier, A., Haddad, P. S., Arnason, J. T., Owen, P. L., & Johns, T. (2007). Medicinal plants of Cree communities (Quebec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85(11), 1200-1214.

Fukuda ,K., 2014-Antimicrobial resistance Global report on surveillance, World

-G-

Gedl, P., & Worobiec, E. (2005).Organic-walled dinoflagellate cysts from Miocene deposits of Legnica 33/56 borehole (Fore-Sudetic Monocline) as indicators of marine ingressión in south-western Poland. *Studia Geologica Polonica*, 124, 395-410.

Gregory, G., & Dimijian, M. B. (2003).Fascicule enseignants.

Guignard, F., Mauel, J., & Markert, M. (1996).Phosphorylation of myeloid-related proteins MRP-14 and MRP-8 during human neutrophil activation. *European journal of biochemistry*, 241(1), 265-271.

-H-

hantal Van Haluwyn, Juliette Asta et Jean-Claude Boissière (en collaboration avec Jean-Claude Gavériaux),(2009),*Guide des lichens de France : lichens des arbres*, Paris, **Belin**, coll. « Collection des Fous de Nature / Guide des lichens de France » , 239 p.HealthOrganization, France, 256p.

Hill, D. J., & Woolhouse, H. (1966). Aspects of the Autecology of Xanthoria Parietina agg. *The Lichenologist*, 3(2), 207-214.

Humbert R.,(2012).Les lichens:Un autre monde.Isatis.N°12:182-189.

-J-

Jefferson K. (2004); What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*. 236(2) : 163-73

Joulain, D., & Tabacchi, R. (2009). Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: oakmoss. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(2), 49-61.

-K-

KAHINA, H., Touati, A., YAHIA, A. A., & Meklat, A. (2008).Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de deux séries de nitrones et d'isoxazolidines synthétisées. *Sciences & Technologie. C, Biotechnologies*, 65-72.

Kalra, R., Conlan, X. A., Areche, C., Dilawari, R., & Goel, M. (2021). Metabolite Profiling of the Indian Food Spice Lichen, *Pseudevernia furfuracea* Combined With Optimised Extraction Methodology to Obtain Bioactive Phenolic Compounds. *Frontiers in pharmacology*, 12.

Karagouml, A., Doğruouml, N., Zeybek, Z., & Aslan, A. (2009). Antibacterial activity of some lichen extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(12), 1034-1039.

Konan, E. A., Pene, C. B., & Dick, E. (2017). Caractérisation agro-climatique du périmètre sucrier de Ferké 2 au Nord de la Côte d'Ivoire. *J Appl. Biosci.* 2017b, 116, 11532-11545.

Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées (Doctoral dissertation, Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS).

Krishnaiah, Y. S. (2010). Pharmaceutical technologies for enhancing oral bioavailability of poorly soluble drugs. *J Bioequiv Availab*, 2(2), 28-36.

Krismadinata, U. V., Jalinus, N., Rizal, F., Sukardi, P. S., Ramadhani, D., Lubis, A. L. &

-L-

Lacheb, C., Rechoua, A., & Lemzeri, H. E. (2017). Etude de la variation de l'activité biologique de quelques espèces bio-indicatrices (Lichens) (Doctoral dissertation).

Lang, M., Charlier, B., Saunders, M., Joël, B., Laferrière, T., & Breuleux, A. (2005). Collaboration in cross-national networks for teacher professional development. *Connecting policy and practice: Challenges for teaching and learning in schools and universities*, 99-106.

Lawrey J. D. (1986), Biological role of lichen substances. *Bryologist*, 111-122.

Leclerc V. et Floch J.Y. (2010). Les secrets des algues. Quae, France. 69p

Lee, K. M., & Rowe, R. K. (1989). Deformations caused by surface loading and tunnelling: the role of elastic anisotropy. *Geotechnique*, 39(1), 125-140.

lichendebourgonge(GLIB). Les lichens une symbiose exemplaire. Rev. Sci. Bourgogne-Nature. 45p

Loisy, C., Bénech, P., & Amandine, R. (2015). Rapport du projet DevSup Septembre 2015 (Doctoral dissertation, IFE-ENS de Lyon).

-M-

Marsh PD. (2006), Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health.*; 6 (1) : S14.

Medical Microbiology; 59 (3) : 324-36.

Magistretti, P. J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*, 55(12), 1251-1262.

Merghem, K., Akrouf, A., Martinez, A., Aubin, G., Ramdane, A., Lelarge, F., & Duan, G. H. (2009). Pulse generation at 346 GHz using a passively mode locked quantum-dash-based laser at 1.55 μ m. *Applied Physics Letters*, 94(2), 021107.

Miller, R. E., Scott, W., & Hazard, J. W. (1996). Soil compaction and conifer growth after tractor yarding at three coastal Washington locations. *Canadian Journal of Forest Research*, 26(2), 225-236.

Mitrović T., Stamenković S., Vetković V., Tosić S., Stanković M., Radjojević I., Stefanović O., Čomoć L., Đaćić D., Curčić M. et Marković S. (2011). Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International journal of molecular sciences*.

Muzny CA, Schwebke JR. (2015). Biofilms: An Underappreciated Mechanism of Treatment

-N-

Neelakantan, P., Cheng, C. Q., Mohanraj, R., Sriraman, P., Subbarao, C., & Sharma, S. (2015). Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er: YAG laser in vitro. *International endodontic journal*, 48(6), 602-610.

Nguyen K.H., Chollet-Krugler M., Gouault N., Tomasi .S, (2013). *Natural product Reports*. 30(12): 1490-1508.

Nigro, P., Pompilio, G., & Capogrossi, M. C. (2013). Cyclophilin A: a key player for human disease. *Cell death & disease*, 4(10), e888-e888.

Opal, S. M., Laterre, P. F., Francois, B., LaRosa, S. P., Angus, D. C., Mira, J. P., ... & ACCESS Study Group, F. (2013). Effect of eritoran, an antagonist of MD2-TLR4, on mortality in patients with severe sepsis: the ACCESS randomized trial. *Jama*, 309(11), 1154-1162.

-O-

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (47).

Ozenda .P, (2000). *Les végétaux organisation et diversité biologique*. 2eme Edition. Dunod. Paris. 175-190p

-P-

P.P. MOREN&O J. M. EGEA.(1992) ,Estudios SOBRE EL COMPLE JO ANEMATHYREA-PECCANIA EN EL SURESTE DE LA PENINSULA, IBERICA Y NORTE DE AFRICA.

Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2(5), 270-278.

Papazian .L., Roch .A, (2008). *Le syndrome de détresse respiratoire aiguë*. Edition Springer. 153p.

Peccoud, J., Labonne, G., & Sauvion, N. (2013). Molecular test to assign individuals within the *Cacopsylla pruni* complex. *PLoS One*, 8(8), e72454

Pellerin, L., Bouzier-Sore, A. K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., & Perraud R., Bliefert C, (2007). *Chimie de l'Environnement: Air, eau, Sol, Déchets*. 2ème Edition. De boeck. Paris. 472p.

Pierre, A., & Arias, A. C. (2016). Solution-processed image sensors on flexible substrates. *Flexible and Printed Electronics*, 1(4), 043001.

Piovano .M, Garbarino .J.A, Giannini .F.A, Correche .E.R, Feresin .G, Tapia .A, Zacchino, Pitart, C., Solé, M., Roca, I., Fàbrega, A., Vila, J., & Marco, F. (2011). First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(9), 4398-4401.

Podterob A. P, (2008). *Pharmaceutical chemistry journal*. 42 (10):582-588.

-R-

Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO.(2015), Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*. ; 7 (4) : 493-512.

relation avec la continuité écologique des boisements. Wwf, France. 118p.

Roux C. et coll ,(2017) *Catalogue des lichens et champignons lichénicoles de France métropolitaine*. 2e édition revue et augmentée (2017). Édité. Association française de lichénologie (A.F.L.), Fontainebleau, 1581 p

Rowe J.G., Saenz M.T., Garcia M. D, (1989). *Annales pharmaceutiques Françaises*. 47 (2):89-94

-S-

Sawidis, T., Breuste, J., Mitrovic, M., Pavlovic, P., & Tsigaridas, K. (2011). Trees as bioindicator of heavy metal pollution in three European cities. *Environmental pollution*, 159(12), 3560-3570.

Scerbo, R., Possenti, L., Lampugnani, L., Ristori, T., Barale, R., & Barghigiani, C. (1999). Lichen (*Xanthoria parietina*)⁻ biomonitoring of trace element contamination and air quality assessment in Livorno Province (Tuscany, Italy). *Science of the Total Environment*, 241(1-3), 91-106.

Sharnoff S. D. (1997) ,Lichens: Morethanmeets the eye.National geographic,191(2), 59-70.

Silver.L.(2011). ClinicalMicrobiology Reviews24, 71–109. –3.

SutherlandI .(2001).The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. Trends in Microbiology.2001 ; 9 (5) : 222-7.

-T-

Teitelbaum, D. H. (2005). Parenteral nutrition–associated cholestasis in neonates: multivariate analysis of the potential protective effect of taurine. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 29(5), 337-344.

Touré-Fall, A. O., Dièye, T. N. D., Sall, A., Diop, M., Seck, M., Diop, S. & Diakhate, L. (2009).Risque résiduel de transmission du VIH et du VHB par transfusion sanguine entre 2003 et 2005 au Centre national de transfusion sanguine de Dakar (Sénégal). *Transfusion clinique et biologique*, 16(5-6), 439-443.

-U-

Usher KM, Kaksonen AH, Cole I, Marney D.(2014) Critical review: Microbially influenced corrosion of buried carbon steel pipes. *International Biodeterioration & Biodegradation*. ; 93:84-106

-V-

Vilà M., Espinar JL., HejdaM., Hulme PE, Jarošík V., Maron JL., ... et PyšekP. (2011),Impacts D.SarraM. Saliha (2019).Etude Comparative de l'activité antioxydant de *Anaptychiaciliaris* et *Xanthoria parietina* de la regeon de djelfa .54P.

-W-

Wahyuono, S., & Rachman, A. (1995). Uji toksisitas beberapa tumbuhan obat Indonesia dengan brine shrimp lethality test (BST)= toxicity test on some Indonesian medicinal plants by brine shrimp lethality test (BST). *Majalah Farmasi Indonesia*, 6.

Wang H, Liu Y, Qi Z, Wang S, Liu S, Li X, Wang HJ, Xia XC. (2013) ,An Overview on Natural Polysaccharides with Antioxidant Properties. *Current Medicinal Chemistry.* ; 20 (23) : 2899-913.

Wang J, Salem DR, Sani RK.(2019), Extremophilic exopolysaccharides: A review and new perspectives on engineering strategies and applications. *Carbohydrate Polymers.* ; 205: 8-26.

Wang L, Hu Y, Liu R, Liu J, Sun W. (2017), Synergistic adsorption of DDA/alcohol mixtures at the air/water interface: A molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Liquids*; 243:1-8.

-Y-

Yılmaz.M,TürkA.O,Tay.T,Kıvanç.M,(2004).Verlag der ZeitschriftfürNaturforschung. 59: 249-254

-Z-

Zambare V. P, Christopher L. P, (2012).Pharmaceutical Biology. 50 (6): 778-798.

Annexes

Annexe 01: Liste du matériel et réactif utilisé dans ce travail

Produits
Le méthanol, le DDPH 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazil,acide gallique, ABTS l'acide 2'-azinobis (3-éthylbenzothiazoline)-6-sulfonique, K ₂ S ₂ O ₈ persulfate de potassium . HCl, acide acétique, acétate de sodium, acide ascorbique, cristalviolet ,BHIB,MH, BN, GNL'eau physiologie, Gélose Mak conkey : Milieu Gélosé sabouraud ; Milieu Chapmane ;
Verrerie
erlenmeyer, tubés en verre,béchers,Eprouvette, tubes a visse , fioles jaugées,flacons,ballon, pipette pasteure
Appareillage et d'autres équipements
Spectrophotomètre, , micropipette , Cuvette UV visible à usage unique en plastique , Etuve,Rota vapeur , Balance analytique ,Agitateur magnétique ,Autoclave. Centrifugeuses : bec benzène incubateur a37 C et à30 C .boites de pétries ; ecouvants ; microplaque ;

Milieu de culture utilisé

MHA ; Nous avons choisi d'utiliser le milieu de culture Muller-Hinton-Agar (MHA), qui est une gélose nutritive pour ces bactéries .

GN ; gélose nutritif

BHIB ;Brain Heart Infusion Broth

Gélose Mak conkey

Milieu Gélosé sabouraud

Milieu Chapmane

Annexe02

- **Préparation de milieu (MH)**

Pour préparer ce milieu il faut peser 38 g de poudre et la mélanger dans 1 L d'eau. Il faut homogénéiser puis chauffer en agitant. Il faut porter à ébullition pendant environ une minute. Ensuite il faut stériliser la gélose à l'autoclave durant 15 min a T de 121 °C.

- **Préparation de milieu BHIB**

Suspendre 37g dans 1 litre d'eau distillée.

Chauffer si nécessaire pour dissoudre complètement le milieu.

Distribuer 10 ml dans des tubes a visse. Puis on a Stérilisé par autoclavage à (121°C) pendant 20 minutes .

Étiquetez le côté de chaque tube avec la date de préparation et le numéro de lot.

La Préparation des pré-cultures ; Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle. La réactivation des souches est effectuée par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide bouillon nutritif (BN). Après incubation pendant 24 heures à 37 °C, un deuxième repiquage est réalisé dans des boites de pétri contenant de la gélose nutritive (GN) puis incubées à 37 °C pendant 18 heures.

- **Préparation des disques**

Les disques sont fabriqués à partir du papier Wattman, avec un diamètre de 6 mm à l'aide d'un perforateur. Ensuite, ces disques sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C, puis conservé à une température ambiante dans une boite hermétiquement fermée.

- **Préparation des boites de Pétri**

La gélose nutritive stérile prête à l'usage a été coulée dans des boites de pétri. L'épaisseur de la gélose est de 4-5mm répartie uniformément dans les boites, ces derniers sont placés à côté du bec benzène jusqu'à solidification de la gélose.

Annexe 03

Tableau(01) : Les valeurs des concentrations et l'absorbances des différentes dilution des extraits lichéniques (protocole 01)

Extrait/ les puits		Puit01	Puit02	Puit03	Puit04	Puit05	Puit06	Puit07	Puit08
<i>Collemaplic atissimum</i>	Concentration (µg/mL)	1.525	0.762	0.381	0.190	0.095	0.047	0.023	0.011
	D.O	0.467	0.249	0.162	0.179	0.129	0.185	0.179	0.157
<i>Ramalinafraxinea</i>	Concentration (µg/mL)	2.399	1.199	0.599	0.299	0.149	0.074	0.037	0.018
	D.O	0,252	0,196	0.182	0.154	0.244	0.152	0.527	0.182
<i>xanthoria parietina</i>	Concentration (µg/mL)	6.33	3.165	1.582	0.791	0.395	0.197	0.098	0.049
	D.O	1.363	0.684	1.844	0.704	0.223	2.209	0.392	0.249
<i>Anaptychia ciliaris</i>	Concentration (µg/mL)	3.633	1.816	0.908	0.454	0.227	0.113	0.056	0.028
	D.O	0.959	1.028	0.796	0.704	0.442	0.820	0.359	0.410
<i>PseudeverniaFurfuracea</i>	Concentration (µg/mL)	5.466	2.733	1.366	0.683	0.341	0.170	0.085	0.042
	D.O	0.554	0.36	0.169	0.141	0.181	0.192	0.148	0.203

Annex 04

Tableau (2): Les valeurs des concentrations et l'absorbances des différentes dilutions des extraits (protocole N°2)

Extrait/ les puits		Puit01	Puit02	Puit03	Puit04	Puit05	Puit06	Puit07	Puit08
<i>Collemaplica tissimum</i>	Concentration (µg/mL)	1.016	0.508	0.254	0.127	0.0635	0.0317	0.015	0.0079
	D.O	0,745	0,279	0,294	0,319	0,317	0,427	0,329	0,3378
<i>Ramalinafraxinea</i>	Concentration (µg/mL)	1.599	0.799	0.399	0.199	0.099	0.049	0.024	0.012
	D.O	0,477	0,313	0,358	0,245	0,324	0,286	0,310	0,326
<i>xanthoria parietina</i>	Concentration (µg/mL)	4.222	2.111	1.055	0.527	0.263	0.131	0.065	0.032
	D.O	1,448	0,437	0,295	0,531	0,407	0,257	0,174	0,2905
<i>Anaptychiaciliaris</i>	Concentration (µg/mL)	2.422	1.212	0.605	0.302	0.151	0.075	0.037	0.018
	D.O	0,972	0,388	0,205	0,314	0,254	0,287	0,297	0,3195
<i>PseudeverniaFurfuracea</i>	Concentration (µg/mL)	3.644	1.822	0.911	0.455	0.227	0.113	0.056	0.028
	D.O	1,351	1,027	0,611	0,286	0,297	0,346	0,305	0,2601

Annex 05 Les souches d'étude

Escherichia coli (Gram négative) : fait partie de la famille des entérobactéries et comprend cinq espèces dont une seule, l'*Escherichia coli*, est utilisée à titre d'indicateur de la qualité des eaux. La presque totalité des souches d'*E. coli* ne sont pas pathogènes puisque cette bactérie est un hôte normal de l'intestin des mammifères.



Figure (01) : la bactérie *E. coli* sous microscope électronique (Singleton, 1999)

Staphylococcus aureus

Les bactéries de ce genre sont les coques à gram positif de 0.5 à 1.5 µm de diamètre, qui sont associées par paire, en chaînettes de 3 à 5 coques, ou en amas irréguliers en grappe de raisins (Sutra et al, 1998).



Figure (02) : la bactérie *Staphylococcus aureus* sous microscope électronique (Sutra et al, 1998).

Pseudomonas aeruginosa

C'est une bactérie gram négative, bâtonnets. La plus part des espèces ont un ou plusieurs flagelles par cellule, habituellement polaires et non grainés, aérobies ou anaérobies facultatifs.



Figure (03) : la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* sous microscope électronique (Singleton, 1984).

Pseudomonas aeruginosa

C'est une bactérie gram négative, bâtonnets. La plus part des espèces ont un ou plusieurs flagelles par cellule, habituellement polaires et non grainés, aérobies ou anaérobies facultatifs.



Figure (04) : la bactérie *Klebsiella pneumoniae* sous microscope électronique (Singleton, 1999).

Bacillus subtilis (Gram-positive)

habituellement présentes dans le sol. Ce sont des bactéries aérobies strictes ou facultatives. (Dijon,2013)

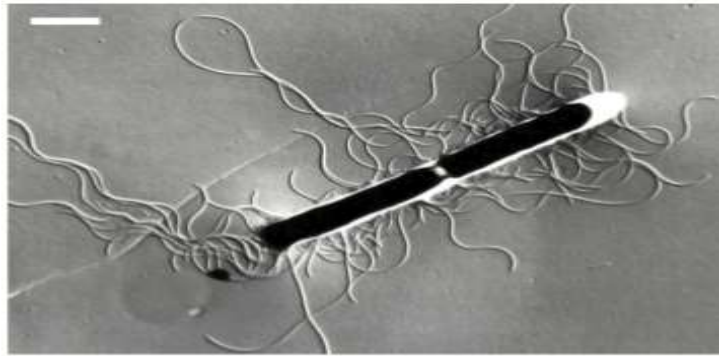


Figure (05) : la bactérie *Bacillus subtilis* sous microscope électronique

***Micrococcus* sp** est un genre de bactéries à coloration Gram positive appartenant à la famille des *Micrococcaceae*



Figure (06) : la bactérie *Micrococcus luteus* sous microscope électronique (Madigan et J. Martinko,2005)

***Candida* sp** appartiennent à la famille cryptococcaceae, Les *candida* possèdent la possibilité d'exprimer des facteurs de virulence qui favorisent la colonisation et l'invasion tissulaire en sécrétant des protéases et des phospholipases.



Figure (07) : la bactérie *Candida albicans* sous microscope électronique (Y.Tambe,2005)