

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تليدي 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 : Biochimie appliquée

Thème

**Evaluation de l'activité anti candida des
extraits de différents solvant de l'espèce
*Lobaria pulmonaria***

Présenté par : Melle BENMOULAI Amel
Melle BENAOUNE Maroua

Devant le jury :

Présidente :	Melle ZAKHROUF Zohra	MAA
Rapporteur :	Dr. SIFI Ibrahim	MCA
Examinatrice :	Mme NEBEG Halima	MAA

Soutenu publiquement le : septembre 2020

Remerciements

En premier lieu, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant pour nous avoir donné santé, force, courage et volonté afin de mener à bien ce travail.

Nos chaleureux remerciements vont à Dr. SIFI I.: Maître de conférences à l'UATL, pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur de ce mémoire. Nous le remercions de nous avoir guidés pas à pas à travers ses conseils pertinents et sa disponibilité. Ce modeste travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Tous nos remerciements s'adressent aux lecteurs attentifs de ce manuscrit qui nous ont fait l'honneur de juger ce travail

A Mademoiselle ZAKHROUF Z.: Maître assistante à l'UATL pour l'intérêt qu'il porte à ce travail et pour sa disponibilité à présider le jury;

A Madame NEBEG H.: Maître assistante A à l'UATL pour avoir accepté d'évaluer ce travail en dépit de ses nombreuses autres obligations.

Nous remercions profondément Madame KHACHBA F., Directrice de service bactériologie au sein du laboratoire vétérinaire régional de nous avoir accueillie dans le laboratoire qu'elle dirige et de mettre à notre disposition tout le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail. Qu'elle trouve ici nos profondes reconnaissances.

Nous exprimons nos chaleureuses reconnaissances également à Madame DJELLOULI M., Dr vétérinaire du service de santé alimentaire au sein du laboratoire vétérinaire régional, pour sa gentillesse, ses encouragements et son aide précieuse.

Nous remercions également l'équipe du laboratoire de Biologie pour l'aide qu'ils nous ont apporté en mettant à notre disposition les moyens de leur laboratoire et qui m'a assuré toutes les conditions agréables pour la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à:

Mes chers parents

Mes frères et mes sœurs

Ma très chère tante Ben djemaa Fatima

Mes amis

Toute ma famille

Mamma Amel

Dédicace

Je remercie tout d'abord, Allah, le tout puissant et clément de m'avoir aidé à
réaliser ce travail

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents : Ma mère *Fatima Zahra* et mon père *bourouba*
pour leur amour, leur sacrifice, leur encouragement, Pour tout ce qu'ils m'ont
apporté et les valeurs qu'ils m'ont enseignées Pour leur soutien et leur
confiance notamment durant mes études.

A mes sœurs *abla* et *kauthar*

A mes chères frères *fateh Eddine* et *Mohamed Laid*

Et surtout pour mes chéries amis proches, mes copines *messaouda* et *Bouchra*
Pour votre fidèles amitiés et les bons moments passés ensemble tout au long de
mes études et en dehors.

À Mon binôme *Maman Amel*, J'ai partagé avec elle les joies et les
difficultés au suivi de notre travail.

Et en fin a toute ma famille *benacoun* et *benzian* sans exception

Maroua

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد المحتويات الفينولية و الفلافونويدية من أجل قياس النشاطية المضادة للميكروبات الخاصة بنبتة *Lobaria pulmonaria*. تم استخلاص العينات بشكل منفصل عن طريق تجزئة مستخلص الأستون بواسطة استعمال ثلاث مذيبات عضوية : ماء مقطر، ميثانول-ماء 35% و الهكسان من اجل الحصول على مستخلصات جافة التي يتم تخزينها في درجة حرارة منخفضة جدا 4°C الى حين استعمالها. فكان المردود كالتالي : 0.27% ، 0.03% و 0.05% على الترتيب. كشفت الاختبارات الكيميائية النباتية عن وجود عائلات مختلفة من المركبات الكيميائية مثل التانن، الفلافونويدات والجلوكوزيدات القلبية والفينولات. تم تحديد المحتوى الفينولي الكلي باستعمال طريقة كاشف Folin-Ciocalteu, كانت النتائج كما يلي: 3.08 ، 58.36 و 4.27 mgEAG/g في مستخلصات كل من الماء، ميثانول-ماء 35% و الهكسان على الترتيب. تم تحديد محتوى الفلافونويدات الكلي باستعمال طريقة $AlCl_3$, كانت النتائج كما يلي: 0.09 ، 26.84 و 0.36 EQ/g في مستخلصات كل من الماء، ميثانول-ماء 35% و الهكسان على الترتيب. تم تقييم النشاطية المضادة للميكروبات لسلسلة فطرية واحدة باستعمال طريقة التخفيف الدقيق في وسط سائل و ذلك لتحديد التركيز الأدنى للتثبيط (CMI). جميع عينات المستخلصات المجربة في دراستنا قد تفاعلت حيث كان تباين في قيم CMI ، حيث تم تسجيل قيمة: 3.33 مجم / مل ، 5 مجم / مل و 13.33 مجم / مل للمستخلصات 35% MeOH-H₂O ، هكسان و الماء على التوالي.

الكلمات المفتاحية: *Lobaria pulmonaria*، مستخلص الأستون، مستخلص الماء، مستخلص ميثانول-ماء 35%، مستخلص الهكسان، الفينولات، الفلافونويدات، النشاطية المضادة للميكروبات.

Résumé

La présente étude était de déterminer les teneurs des polyphénols et des flavonoïdes afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de la plante de *Lobaria pulmonaria*. Les échantillons ont été extraits séparément par le fractionnement de l'extrait acétonique par trois solvants ; Eau distillée, MeOH-eau 35% et l'hexane afin d'obtenir des extraits secs, puis conservés à 4°C jusqu'à l'expérimentation. Les rendements respectifs étaient de : 0,27%, 0,03% et 0,05%. Les tests phytochimiques révélaient la présence de différentes familles de composés chimiques comme les tanins, les flavonoïdes, Glucosides cardiotoniques et les phénols. La teneur en composés phénoliques totaux a été déterminée à l'aide du réactif *Folin-Ciocalteu*, elle est de : 3,08, 58,36 et 4,27 mg EAG/g de matière sèche d'extrait aqueux, de MeOH-eau 35% et hexanique, respectivement. La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée selon la méthode du trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$), elle est de : 0,09, 26,84 et 0,36 mg EQ/g de matière sèche d'extrait aqueux, de MeOH-eau 35% et hexanique respectivement. L'activité antimicrobienne a été évaluée sur une souche fongique *Candida albicans* selon la méthode de microdilution en bouillon pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). La souche *Candida albicans* est présentée une sensibilité faible aux extraits testés, dont les valeurs de CMI sont de 3,33mg/ml, 5mg/ml et 13,33mg/ml pour les extraits, MeOH-H₂O 35%, hexanique et aqueuse respectivement.

Mots clés : *Lobaria pulmonaria*, extrait acétonique, extrait aqueux, extrait de MeOH-eau 35%, extrait d'hexane, polyphénols, flavonoïdes, activité antimicrobienne.

Abstract

The purpose of the present study was to determine phenolic and flavonoid content to evaluate antimicrobial activity of *Lobaria pulmonaria* plant. Samples were extracted separately by fractionating the acetone extract with three solvents; distilled water, MeOH-water 35% and hexane in order to obtain dry extracts, then kept at 4°C until investigation. The respective yields were 0,27%, 0,03% et 0,05%. Phytochemical tests revealed the presence of different families of chemical compounds such as tannins, flavonoids, Cardiotonic glucosides and phenols. The total content of phenolic compounds was determined using Folin-Ciocalteu reagent, it was: 3,08, 58,36 et 4,27 mg GAE/g of dry weight of the aqueous, MeOH-eau 35% and hexane extracts respectively. The total content of flavonoids compounds was determined according to the method of aluminum trichloride (AlCl₃), it was: 0,09, 26,84 et 0,36 mg QE/g of dry weight of the aqueous, MeOH-eau 35% and hexane extracts respectively. The antimicrobial activity was evaluated against *Candida albicans* by the microdilution in broth method to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). The *Candida albicans* strain is exhibited a low sensitivity to the extracts tested, the MIC values of which are 3.33 mg / ml, 5 mg / ml and 13.33 mg / ml for the extracts, MeOH-H₂O 35%, hexane and aqueous respectively.

Key words: *Lobaria pulmonaria*, acetone extract, aqueous extract, MeOH-eau 35% extract, hexane extract, polyphenols, flavonoids, antimicrobial activity.

SOMMAIRE

<i>Remerciements</i>	2
<i>Dédicace</i>	3
<i>ملخص</i>	i
<i>Résumé</i>	ii
<i>Abstract</i>	iii
<i>SOMMAIRE</i>	iv
<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	vi
<i>LISTE DES FIGURES</i>	vii
<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	viii
<i>Introduction</i>	1
<i>CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	1
<i>1. Généralités sur les plantes médicinales</i>	4
1.1. Historique.....	4
1.2. Définitions.....	4
1.3. L'étude des plantes médicinales.....	4
1.4. Intérêt de l'étude des plantes médicinales.....	5
1.5. Formes d'utilisation des extraits des plantes médicinales.....	5
<i>2. Aperçu sur les composés phénoliques</i>	6
2.1. Généralités.....	6
2.2. Principales sources alimentaires.....	6
2.3. Classification des composés phénoliques.....	8
2.4. Principaux composés phénoliques à pouvoir antimicrobien.....	9
<i>3. Notions sur la plante étudiée « <i>Lobaria pulmonaria</i> »</i>	9
3.1. Caractères botaniques.....	9
3.2. Position systématique.....	10
3.3. Usages de <i>Lobaria pulmonaria</i>	10
<i>4. Activité antimicrobienne</i>	10
4.1. Généralités.....	10
4.2. Culture des microorganismes.....	11

4.3. La concentration minimale inhibitrice CMI.....	11
4.4. Description de la souche étudiée (<i>Candida albicans</i>).....	14
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL et MÉTHODES.....	17
1. Objectifs.....	18
2. Matériels.....	18
2.1 Matériel végétal	18
2.2. Produits de laboratoire	18
2.3. Appareillage.....	19
2.4. Microorganismes testés.....	19
3. Méthodes d'extraction des métabolites secondaires	20
3.1. Séchage et broyage de la plante	20
3.2. Préparation des extraits d'acétone	20
3.3. Fractionnement de l'extrait d'acétone.....	20
3.4. Calcule de rendement d'extraction	22
3.5. Tests phytochimique	22
4. Dosages des métabolites secondaires	23
4.1. Dosage des polyphénols totaux.....	24
4.2. Dosage des flavonoïdes.....	24
5. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	25
5.1. Préparation de l'inoculum.....	25
5.2. Détermination du CMI en milieu liquide.....	26
5.3. Détermination des CMB en milieu solide.....	27
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS et DISCUSSION.....	29
1. Rendement d'extraction des composés phénoliques.....	30
2. Résultats des tests phytochimique.....	31
3. Teneur en polyphénols totaux (PPT).....	32
4. Teneur en flavonoïdes totaux (FVT).....	34
5. Activité anti-candidose des extraits.....	36
Conclusion.....	39
Références bibliographiques	41

LISTE DES ABREVIATIONS

AG : Acide gallique

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

ATCC : American Type Culture Collection

CLSI : Institut de normes cliniques et de laboratoire.

CMB: Concentration minimale bactéricide

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CP: Composés phénoliques

DO: Densité optique

EAG: Equivalent d'acide gallique

EN: European norm

EQ: Equivalent de quercétine

FeCl₃: chlorure de fer

FVT: Flavonoïdes totaux

HCl : Chlorure d'hydrogène

ISO: International Organization for Standardization

MeOH : Méthanol

MH: Muller-Hinton

MS : Matière sèche

NaOH : Hydroxyde de sodium

OH: Radical Hydroxyle

PF : poids frais

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du noyau phénol (Macheix <i>et al.</i> , 2005).....	6
Figure 2 : Méthode de détermination de la CMI.....	12
Figure 3 : Exemple de la détermination de la CMI par la méthode de macrodilution	13
Figure 4 : Représentation graphique du protocole de micro-dilution de bouillon recommandé par CLSI (Pandey <i>et al.</i> , 2016)	13
Figure 5 : Morphologie de <i>Candida albicans</i>	15
Figure 6 : L'espèce <i>Lobaria pulmonaria</i> séché	18
Figure 7 : L'espèce <i>Lobaria pulmonaria</i> broyé.....	20
Figure 8 : Protocole expérimental d'extraction et fractionnement	21
Figure 9 :Préparation de l'inoculum à partir de culture fongique fraîche.....	26
Figure 10 : Microplaque 96 puits contenant les différentes dilutions des 3 extraits organiques de <i>Lobaria pulmonaria</i>	27
Figure 11 : Ensemencement des suspensions sur milieu de gélose sabouraud	28
Figure 12 : La courbe d'étalonnage d'acide gallique	32
Figure 13 : Teneur en polyphénols totaux des trois extraits étudiés	33
Figure 14 : La courbe d'étalonnage de la quercétine	34
Figure 15 : Teneur en flavonoïdes totaux des trois extraits de <i>Lobaria pulmonaria</i>	35

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principales sources alimentaires des polyphénols (Bessedik & Benikhlef, 2017)	7
Tableau 2 : Les principales classes des composés phénoliques (Bruneton, 2009)	8
Tableau 3 : La position systématique du <i>Candida albicans</i>	14
Tableau 4 : Produits et réactifs chimiques	18
Tableau 5 : Milieux de cultures utilisés	19
Tableau 6 : Appareils utilisés	19
Tableau 7 : Aspect, couleur et rendement des trois extraits de <i>Lobaria pulmonaria</i>	30
Tableau 8 : Résultats des tests phytochimique (+ positif, - négatif, +/- faible)	31
Tableau 9 : Résultats de la concentration minimal inhibitrice des différents extraits de <i>Lobaria pulmonaria</i>	36

INTRODUCTION

La phytothérapie est l'une des plus vieilles médecines du monde. Elle représente une alternative intéressante pour traiter et soigner sans créer de nouvelles maladies. Malgré le développement phénoménal de l'industrie pharmaceutique et chimique, l'intérêt populaire pour la phytothérapie n'a jamais cessé d'évoluer. De nos jours ces deux types de médication se retrouvent intimement liés puisque le modèle moléculaire de la plupart des médicaments mis sur le marché, a pour origine la plante (Adouane, 2016).

Les produits naturels sont utilisés depuis des millénaires pour le traitement des maladies humaines et, par conséquent, une grande partie des médicaments actuels en médecine moderne ont été développés à partir de molécules naturelles. La recherche de nouveaux produits naturels biologiquement actifs continue d'être un domaine de recherche intense (Newman *et al.*, 2015).

La mise au point des médicaments antimicrobiens, et particulièrement des antibiotiques a joué un rôle considérable dans l'importante réduction des taux de morbidité et de mortalité de bien des maladies infectieuses. Toutefois la prescription fréquente et parfois inappropriée des antibiotiques a amené à l'apparition des souches bactériennes résistantes. La solution de ce problème s'avère donc urgente et impose la recherche de nouveaux agents antimicrobiens, Le recours aux plantes médicinales aux propriétés antimicrobiennes constitue alors une des plus intéressantes pistes à explorer (Zarrouq, 2015).

Plusieurs auteurs ont publié des méthodes permettant la détermination de la CMI cependant, certaines méthodes présentent des limites et des inconvénients.

Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, se trouve le genre *Lobaria*. De nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle parce qu'elles renferment plusieurs molécules douées d'activités thérapeutiques, parmi les espèces les plus connues se trouve *Lobaria pulmonaria*. Cette plante avoir des effets thérapeutiques dans des maladies telles que l'eczéma, l'hémorragie, l'arthrite et les maladies respiratoires, y compris l'asthme ; une théière aromatique préparée à partir de *L. pulmonaria* est utilisée pour son effet laxatif (Huneck, 1999).

Dans la continuité des travaux scientifique réalisés par Boulerbaa & Maroufi (2018), et Kadiri & Helaili (2019) sur l'espèce *Lobaria pulmonaria*, dont le quel ont été évaluer

Introduction

l'activité antioxydante des extraits bruts, par la suite les différentes fractions de l'extrait acétonique de cette espèce.

Le présent travail a pour but d'étudier l'activité anti-candidose des fractions acétoniques de lichen *Lobaria pulmonaria*. La présente étude a été scindée en trois parties :

- ❖ La première partie, est consacrée à l'étude bibliographique, relative à la plante étudiée, aux composés phénoliques.
- ❖ La deuxième partie du travail est expérimentale, elle est consacrée à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'espèce *Lobaria pulmonaria*, est basée sur :
 - ⇒ L'extraction des composés phénoliques de la plante.
 - ⇒ Dosage des composés phénoliques et des flavonoïdes.
 - ⇒ Evaluation de l'effet antimicrobienne par la méthode de microdilution.
- ❖ Dans la troisième partie, nous discutons les résultats obtenus, on termine notre étude par une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE 1 :

SYNTHÈSE

BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les plantes médicinales

1.1. Historique

L'histoire des plantes médicinales est très ancienne et est rapportée dans les littératures antiques arabe, chinoise, égyptienne, hindou, grecque, et romaine (Lardry & Haberkorn, 2007). Depuis l'antiquité, les hommes ont utilisé les plantes qu'ils avaient à leur disposition à diverses fins ; massages, bains, hygiène, santé et diététique.

Les musulmans ont repris l'utilisation de ces plantes en thérapeutique, en particulier *Ibn sina* qui produit la première huile essentielle pure, il s'agissait de « *Rosa centifolia* » (Jollois & Mars, 2001).

Au cours de la dernière décennie, l'intérêt pour les médicaments issus de plantes, en particulier les phyto-thérapeutiques, a augmenté de façon expressive (Calixto, 2000).

1.2. Définitions

Plantes médicinales : On appelle plantes médicinales tout plantes renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir soulager ou guérir les maladies (Iserin, 2001).

Phytothérapie : C'est une thérapie qui consiste à utiliser les plantes ou bien ses dérivées après l'extraction de leurs principes actifs purs (Gazengel & Orecchioni, 2013).

Aromathérapie : peut se définir comme une thérapie naturelle qui utilise les extraits de plantes aromatiques pour soigner ou prévenir les maladies ; elle s'intègre dans le cadre de la phytothérapie (Lardry & Haberkorn, 2007).

1.3. L'étude des plantes médicinales

La connaissance rationnelle des plantes médicinales date de l'antiquité. C'est Hippocrate qui différencia l'usage interne et l'usage externe et qui définit la notion de dose qui permet de distinguer l'effet thérapeutique de l'effet toxique (Keller-Didier, 2004).

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer le bien-fondé des vertus thérapeutiques de la plupart des plantes médicinales utilisées (Carillon, 2000). Ce savoir traditionnel ancestral se transmet de génération en génération est devenu aujourd'hui une mine d'informations extrêmement précieuses pour les chercheurs d'industrie pharmaceutique (Fouché *et al.*, 2000).

Aujourd'hui la pharmacologie s'oriente de plus en plus vers des traitements à base de plantes, car l'efficacité de la synthèse chimique a largement atteint ses limites et n'arrive plus à être créative. L'exemple de l'antibiorésistance microbienne, à l'origine de la recrudescence des maladies nosocomiales se passe de tout commentaire (Iserin, 2001).

1.4. Intérêt de l'étude des plantes médicinales

La plupart des espèces végétales contiennent des substances qui peuvent agir, à un niveau ou un autre, sur l'organisme humain et animal. On les utilise aussi bien en médecine classique qu'en phytothérapie. Elles présentent en effet des avantages dont les médicaments sont souvent dépourvus (Iserin, 2001). La raison fondamentale est que les principes actifs végétaux proviennent de processus biotiques répandus dans tout le monde vivant, alors que l'essentiel des médicaments de synthèse sont des xénobiotiques aux effets secondaires très mal maîtrisés (Bruneton, 2009).

Les plantes médicinales sont donc importantes pour la recherche pharmaceutique et l'élaboration des médicaments, directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matière première pour la synthèse des médicaments ou comme modèle pour les composés pharmaceutiquement actifs (Decaux, 2002).

1.5. Formes d'utilisation des extraits des plantes médicinales

On estime qu'il existe entre 250 000 et 500 000 espèces de plantes sur terre. La plupart de ces types de plantes possèdent des propriétés thérapeutiques, car ils contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme (Iserin, 2001). Elles sont utilisées en nature (tisanes) ou sous forme de préparations galéniques (poudre, teinture, extraits, etc....) ; un mélange naturel de plusieurs composés (huiles essentielles...) ; soit un composé organique chimiquement pur obtenue par extraction à partir d'une plante (Gazengel & Orecchioni, 2013).

2. Aperçu sur les composés phénoliques

2.1. Généralités

Bruneton (2009), définit les composés phénoliques (CP) comme étant des molécules du métabolisme secondaire spécifiques du règne végétal, ce qui d'après Belkhiri (2009) signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales dans l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction.

L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones (figure 1), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Macheix *et al.*, 2005).

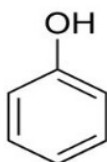


Figure 1 : Structure du noyau phénol (Macheix *et al.*, 2005)

D'après Gresele *et al.* (2011), ils sont présents dans les vacuoles des tissus, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnement UV...) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme et amertume), d'un point de vue thérapeutique, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve dans les plantes médicinales (Macheix *et al.*, 2005). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement (Gresele *et al.*, 2011).

2.2. Principales sources alimentaires

Les polyphénols sont répartis de façon ubiquitaire dans les fruits et les légumes qui en constituent les principales sources alimentaires, avec de fortes variations selon les espèces. Ainsi, la concentration en polyphénols totaux peut varier de 140 mg/kg de poids frais (PF) pour la pomme de terre à 5,5 g/kg de PF pour la cerise (Scalbert *et al.*, 2005).

Le tableau ci-dessous regroupe les principales sources alimentaires des polyphénols.


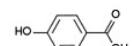
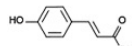
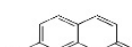
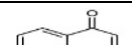
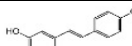

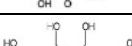
Tableau 1 : Tableau récapitulatif des principales sources alimentaires des polyphénols (Bessedik & Benikhlef, 2017)

Classe de polyphénols	Sources alimentaires	Références bibliographiques
Les stilbènes	-le raisin et son jus ; -les baies, le chou rouge, les épinards et certaines plantes médicinales ; -les cacahuètes et le beurre de cacahuètes ; -vin rouge.	(CASSIDY <i>et al.</i> ,2000). (CROZIER <i>et al.</i> ,2009).
Les flavones	-persil, céleri et le poivron rouge ; -les glycosides de flavones sont également présents dans les céréales (mil, blé) ; -sous forme glucuronidée, la lutéoline 7-diglycuronide est présente dans l'infusé de verveine odorante ; -la peau des agrumes ; -des huiles essentielles (huile essentielle de mandarine).	(MANACH <i>et al.</i> ,2004).
Les flavonols	-l'oignon, le chou frisé, le poireau, le vin rouge, le thé noir et le thé vert.	(MANACH <i>et al.</i> ,2004).
Les flavanones	-les rutinosides de flavanones dans les citrons, les mandarines, les oranges ; -les pamplemousses et les oranges amères ; -les glycosides de flavanones dans le jus d'orange ; -la tomate et certaines plantes aromatiques comme la menthe.	(TOMAS-BARBERAN et CLIFFORD,2000).
Isoflavones	-soja (les graines, la farine, le lait de soja) ; -le processus de fermentation hydrolysant les glycosides, ces composés seront principalement retrouvés sous forme d'aglycones stables dans ces aliments.	(CASSIDY <i>et al.</i> ,2000).
Chalcones dihydro-chalcones	-la tomate (la peau, le ketchup) ; -la pomme (peau, chair et pépins).	(BRUNETON, 2009).
(épi) catéchine	-l'abricot et la cerise, les pêches, les prunes, les fraises, les pommes et les poires ; -le chocolat ; -le thé vert ;	(D'ARCHIVIO <i>et al.</i> ,2007).
Pro-anthocyanidines	-le raisin, les pêches, les kakis ou les pommes ; -le vin, le cidre, le thé et la bière.	(SANTOS-BUELGA et SCALBERT, 2000). (GERHAUSER, 2008).
Les anthocyanes	-baies comme la cassis ou les mures ; -fruits rouges comme les myrtilles, fraise ou la cerise ; -les vins.	(MANACH <i>et al.</i> , 2004).
Les lignanes	-graines de lin ; -céréales (le triticale et le blé) -fruits (les poires et les prunes); -certains légumes (ail, asperge et carottes) ; -légumineuses comme les lentilles.	(ADLERCREUTZ et MAZUR, 1997).

2.3. Classification des composés phénoliques

Motilva *et al.* (2013), expliquent qu'il n'existe pas de classification universelle de polyphénols. Par contre, selon Dufour & Dangles (2005), la classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux catégories : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes que le tableau 2 met bien en évidence.

Tableau 2 : Les principales classes des composés phénoliques (Bruneton, 2009)

Nombre de carbone	Squelette de base	Classe	Exemples	Structures de base	Plantes
6	C6	Phénols simples	Catéchol,hydroquinone		Busserole
7	C6-C1	Acides Phénols benzoïques	Acide gallique,Acide salysalique,Vanilline		Artichaut Saule
8	C6-C2	Acétophénones	3-acétyl 6-Méthoxybenzaldehyde Gallacetophénone	/	Saule
8	C6-C2	Acide phénylacétique	Acide phydroxyphenylacétique	/	/
9	C6-C3	Acide hydroxycinamique	Acide coumarique, Acide caféique		Romarin Marronnier d'inde
9	C6-C3	Coumarines	Esculétine		Carotte Coriandre
10	C6-C4	Naphtoquinones	Shikonine		Drosera spp
13	C6-C1-C6	Xanthones	Bellidifoline, Mangocétine	/	Racine degentiane, Centauree
14	C6-C2-C6	Stilbènes	Hydrangéol, Pinosylvine		Raisin, pin
15	C6-C3-C6	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine Roténoïde		Ginkgo Thym Camomille
18	(C6-C3)2	Lignanes	Matairésinol		Chardon
30	(C6-C3-C6)2	Bi flavonoïdes	Amentoflavone Hinokiflavone	/	Carcinia Hypericum
N	C6-C3-C6)n	Tanins condensés proanthocyanidols	Aesculitanins	/	Marronnier d'inde,vigne

2.4. Principaux composés phénoliques à pouvoir antimicrobien

De nombreuses études *in vitro* menées sur les composés phénoliques les ont confirmés comme agents antimicrobiens contre un grand nombre des microorganismes pathogènes, avec des spectres d'activités variables. En effet certaines quinones présentent un effet bactériostatique sur les bactéries à Gram positif mais pas vis à vis des bactéries à Gram négatif. Les acides-phénols ont des propriétés antiseptiques urinaires, antifongiques et antibactériennes (Bruneton, 2009).

Des récentes études ont montré que les coumarines exercent plusieurs activités antimicrobiennes (Fournier & Hooper, 1998) : inhibitions de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* et de la germination des spores d'*Aspergillus niger*. Pour l'activité antibactérienne on note qu'ils sont plus efficaces contre les Gram positifs (Benkiki, 2006).

Les flavonoïdes avec leurs différentes classes dont les plus importantes sont : les flavones, flavonols, flavonones, flavonones 3-oles, flavanes-3,4 dioles, et les anthocyanidines. Ils ont un grand potentiel antibactérien (Jones *et al.*, 1994).

D'autre part, les tanins sont largement connus par leurs propriétés inhibitrices des microorganismes et des enzymes grâce à leur pouvoir à former des complexes stables avec les protéines et en les précipitant.

Ils exercent une activité antibactérienne par interaction avec la membrane cellulaire qui induit un changement morphologique de la bactérie, en inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport et des adhésines. Des effets inhibiteurs de la réplication des virus ont été également décrits *in vitro* (Bruneton, 2009).

3. Notions sur la plante étudiée « *Lobaria pulmonaria* »

3.1. Caractères botaniques

La pulmonaire des chênes (*Lobaria pulmonaria*) est un champignon lichénée, qui peut atteindre près de 50 cm. Il est profondément divisé en lobes assez étroits, aux extrémités tronquées, dont la largeur varie de 1 à 3 cm. Par son aspect général, sa taille et sa couleur, il ressemble à une sorte de salade aux feuilles découpées, attachée par une extrémité ou par quelques points aux troncs moussus des arbres, avec des nervures tomenteuses. C'est une espèce en déclin dans de nombreuses régions et qui a été choisie comme indice de santé des forêts. Il est très sensible aux toxines environnementales. (De Vera, 2012).

3.2. Position systématique

D'après la classification de Agnan (2013), la position systématique du lichen de *Lobaria pulmonaria* est la suivante :

Règne : Fungi

Phylum : Ascomycotina

Classe : Ascomycètes

Ordre : *Lecanorales*

Sous-ordre : *Peltigerinae*

Famille : *Lobariaceae*

Genre : *Lobaria*

Espèce : *Lobaria pulmonaria*

Nom en arabe : شبيبة الشيخ

3.3. Usages de *Lobaria pulmonaria*

Remède efficace mais sous-employé, la pulmonaire recèle des propriétés expectorantes et toniques. Sous forme de décoction édulcorée au miel, elle convient à toutes les affections qui augmentent les sécrétions bronchiques (toux et bronchites).

Elle contribue à soigner l'asthme, la pleurésie et l'emphysème. Décongestionnante, elle est également purgative et apéritive. On la prescrit en cas d'ulcères pulmonaires et de troubles digestifs. La pulmonaire convient particulièrement aux enfants (Iserin, 2001).

Dans l'alimentation humaine a été utilisée sous forme de farine qui peut être incorporée au pain ou mélangée à du lait. Ainsi la population locale de la région de Laghouat a utilisé l'espèce *Lobaria pulmonaria* dans la préparation des plats culinaires traditionnels (la préparation de couscous).

4. Activité antimicrobienne

4.1. Généralités

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces

microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle (ou innés) et l'immunité acquise (Kaufmann, 1997)..

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing & Sherman, 1998).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

4.2. Culture des microorganismes

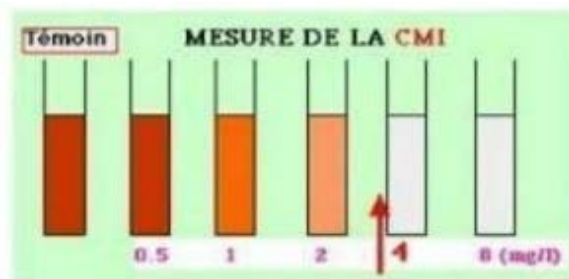
On utilise habituellement pour cultiver les microorganismes des milieux complexes à base d'extraits ou d'hydrolysats enzymatiques de viandes. Ces milieux peuvent être liquides (bouillons) ou solides. La solidification des milieux est obtenue par l'addition de l'agar, un extrait d'algues qui a la propriété de fondre à l'ébullition et se solidifier à des températures inférieures à 40°C. En milieu liquide, les bactéries se dispersent librement et leur multiplication se traduit par un trouble, le plus souvent homogène. Sur un milieu solide, lorsque la quantité de bactéries est faible, chaque bactérie va pouvoir se multiplier sur place jusqu'à former un amas de bactéries visible à l'œil nu, que l'on appelle colonie (Si la densité bactérienne est trop élevée dans l'échantillon ensemencé, les colonies sont confluentes et forment une nappe.). L'emploi de milieux solides permet ainsi le dénombrement des bactéries viables dans un échantillon (Nauciel & Vildé, 2005).

4.3. La concentration minimale inhibitrice CMI

Définition

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), correspond à la plus faible concentration d'antimicrobiens qui inhibera la croissance visible des microorganismes après une incubation durant la 18-24h (Andrews, 2001). Cette valeur permet de classer une souche

bactérienne dans les catégories : "sensible" ; "résistante" "intermédiaire" (Genne et Siegrist hans, 2003).



Dans cet exemple : CMI=4mg/L

Figure 2 : Méthode de détermination de la CMI

Méthodes de détermination de la CMI

Les méthodes de dilution sont les plus appropriées pour la détermination des valeurs de Concentration minimales CMI d'un extrait, d'une huile essentielle ou d'une substance pure. Car elles offrent la possibilité d'estimer la concentration de l'agent antimicrobien testé dans la gélose (dilution d'agar) ou dans le bouillon (la microdilution ou la macrodilution). Ces méthodes peuvent être utilisées pour mesurer quantitativement l'activité antimicrobienne *in vitro* contre les bactéries et les champignons (Balouiri *et al.*, 2016).

La méthode de macrodilution

La méthode de macro-dilution était parmi les premières à être développée et sert toujours de méthode de référence. Le principe de base de ce dosage est le même que le dosage de la micro-dilution au bouillon. Mais le test est effectué dans des tubes à essai contenant des concentrations différentes de l'agent antimicrobien avec le même volume. Les tubes sont inoculés avec des microorganismes d'essai à des concentrations standard. Tous les tubes de dosage doivent être incubés pendant 18-24 h dans un incubateur d'air ambiant à 35-37 ° C.

Après l'incubation, les tubes sont examinés pour détecter les changements de turbidité comme indicateur de croissance. La CMI de l'extrait de plante peut être déterminée par la concentration la plus faible de l'agent antimicrobien qui inhibera la croissance visible du microorganisme testé (Das *et al.*, 2010; Schwalbe *et al.*, 2007).

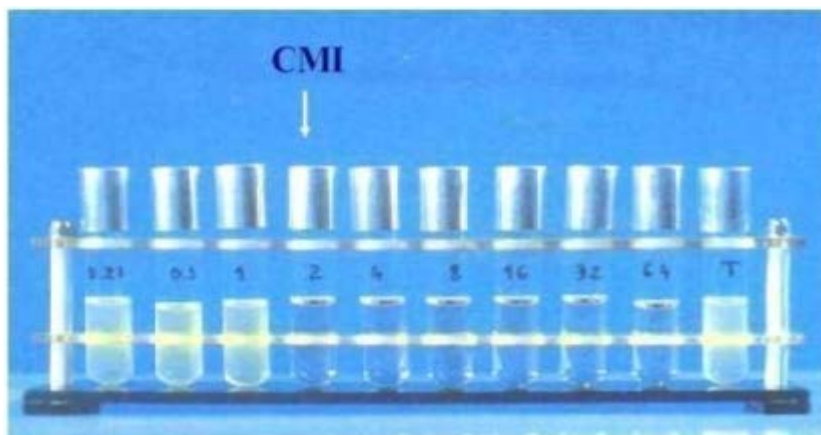


Figure 3 : Exemple de la détermination de la CMI par la méthode de macrodilution

La méthode de microdilution

C'est une méthode plus simple et plus économique que la méthode de macrodilution au bouillon. Elle est maintenant considérée comme la méthode internationale de test de sensibilité de référence. Cette technique repose sur l'utilisation d'un milieu de culture donné ou un solvant dans le milieu d'essai pour assurer le contact entre les microorganismes d'essai et l'agent antimicrobien testé pour la durée de l'expérience. Après 18-24h d'incubation, la mesure de la turbidité peuvent être déterminés visuellement, ou par spectrophotométrie, soit l'utilisation d'un indicateur de Viabilité cellulaire (ex : sels de tétrazolium ou le colorant de résa urine) (Schwalbe *et al.*, 2007).

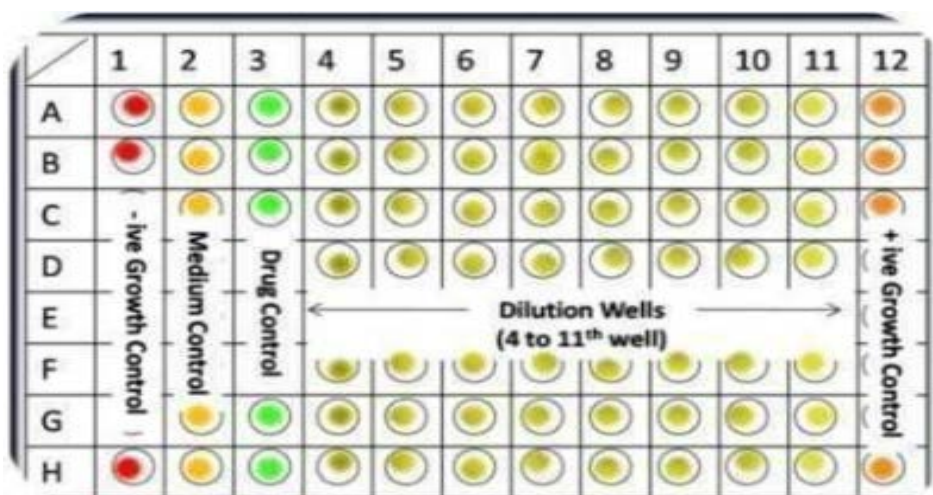


Figure 4 : Représentation graphique du protocole de micro-dilution de bouillon recommandé par CLSI (Pandey *et al.*, 2016)

4.4. Description de la souche étudiée (*Candida albicans*)

Généralités

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires se multipliant par bourgeonnement. Le *candidat albicans*, souvent associé à un champignon microscopique, est un microorganisme de la famille des levures qui se trouvent normalement dans l'organisme humain en quantité relativement limitée. Cette levure représente la cause de pathologies graves et dont la fréquence reste constante (Pfaller & Diekema, 2007) malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, en particulier chez des patients immunodéprimés (Anofel, 2007).

Taxonomie

Selon Djekema, (2007), *Candida albicans* suit l'organisation suivante :

Tableau 3 : La position systématique du *Candida albicans*

Règne	Fungi
Division	Ascomycota
Classe	Saccharomycetes
Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
Famille	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genre	<i>Candida</i>
Espèce	<i>Candida albicans</i>

Morphologie

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes (Chu *et al.*, 1993), se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (Gräser *et al.*, 1996).

Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15 µm, et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que

le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* (Sudbery, 2001) (figure 5) :

- La forme blastospore, ronde ou ovale, mesurant de 2 à 4 μm avec parfois un bourgeon de formation.
- La forme pseudomycélium, mesurant de 500 à 600 μm de longueur et de 3 à 5 μm de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien (Sudbery, 2001).
- La forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans*, où la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte (Anofel, 2007).

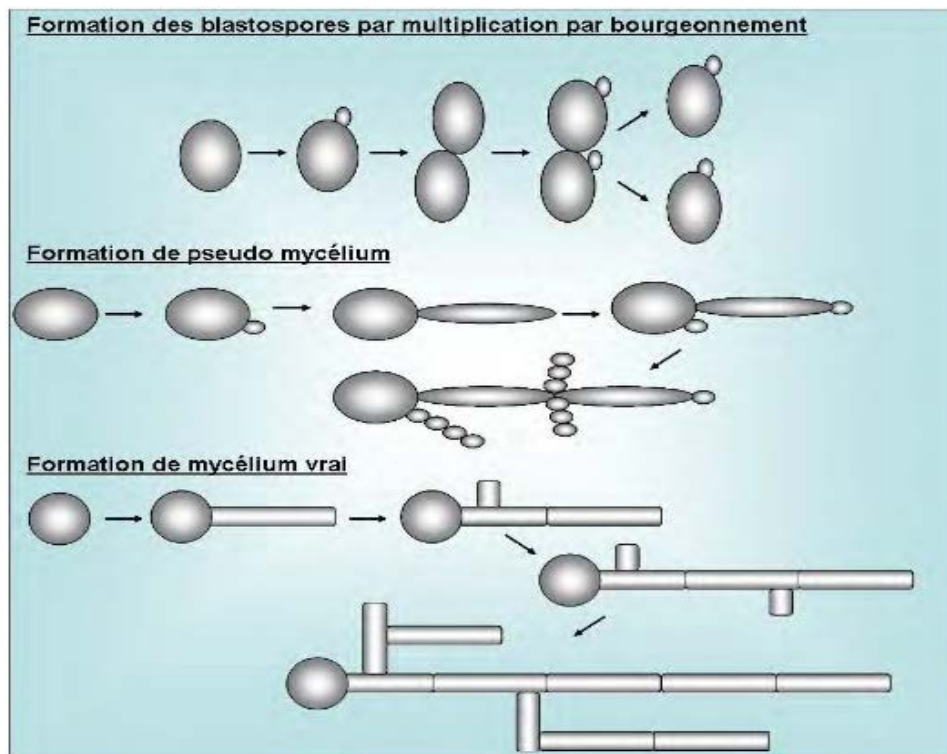


Figure 5 : Morphologie de *Candida albicans*

Epidémiologie et pouvoir pathogène

Les infections causées par les espèces *Candida* sont connues sous le nom de candidoses. Mais il existe des noms communs décrivant des pathologies spécifiques telles que le Muguet (candidose buccale), par exemple.

Chez l'Homme, les levures du genre *Candida* sont susceptibles de devenir pathogènes et d'envahir les tissus superficiels ou profonds sur certains terrains immunodéprimés comme chez les individus âgés, ou encore ceux traités par chimiothérapie, ou souffrant de désordre hématologique (HIV-positif, leucémie), ou chez les sujets ayant un traitement antibiotique à large spectre ou un déséquilibre endocrinien (diabète, grossesse). Le passage de l'état commensal à l'état pathogène est donc le plus souvent lié à une défaillance des systèmes de défense de l'hôte. *C. albicans* est capable de survivre comme commensal dans plusieurs sites anatomiques, chacun présentant ses propres pressions environnementales. Ceci explique les manifestations cliniques très diverses causées par ce champignon (Morgan, 2005; Tortorano *et al.*, 2006).

L'infection existe sous deux formes :

- Superficielle (cutanée et unguéale, digestive, génito-urinaire),
- Disséminée ou septicémique (candidose profonde ou candidémie).

La capacité de ce champignon à adhérer au tissu de l'hôte, à sécréter des protéases et des phospholipases, à changer de morphologie et à moduler la défense de l'hôte constitue les déterminants majeurs de sa pathogénicité (Anofel, 2007).

Les antifongiques sont des molécules capables d'affecter spécifiquement les différents champignons impliqués en mycologie médicale, ou au moins, de réduire leur prolifération. Contrairement au grand nombre d'antibiotiques et malgré d'importants progrès, la quantité d'antifongiques disponibles reste limitée à un petit nombre de produits (Anofel, 2007).

CHAPITRE 2 :

MATÉRIEL et MÉTHODES

1. Objectifs

La partie expérimentale de notre étude a été réalisée au sein du laboratoire vétérinaire régional ainsi qu'au niveau du laboratoire pédagogique de biochimie du département de biologie de l'université AMAR TELIDJI de Laghouat, pendant une durée d'un mois. Le présent travail a pour objectif d'évaluer l'activité anti-candidose des fractions des solvants à polarités croissantes de l'espèce *Lobaria pulmonaria* en utilisant la méthode du micro-dilution en bouillon.

2. Matériels

2.1 Matériel végétal

Les échantillons de *Lobaria pulmonaria* ont été achetés chez un herboriste.



Figure 6 : L'espèce *Lobaria pulmonaria* séché

2.2. Produits de laboratoire

Tableau 4 : Produits et réactifs chimiques

	Produit	Référence	Utilisation
Solvants	Acétone	Honeywell Fluka Allemagne	Extraction des polyphénols
	Méthanol	Sigma Aldrich Allemagne	Solubilisation et conservation des extraits
	Hexane	Riedel-de-Haën Allemagne	
Réactifs chimiques	Folin-Ciocalteu	Sigma Aldrich Allemagne	Dosage des Polyphénols totaux
	Carbonate de Sodium (Na ₂ CO ₃)	Honeywell Fluka Allemagne	
	Acide gallique C ₇ H ₆ O ₅	Sigma Aldrich Allemagne	Polyphénol standard
	Trichlorure d'aluminium (AlCl ₃)	Honeywell Fluka Allemagne	Dosage des Flavonoïdes totaux
	Quercétine C ₁₅ H ₁₀ O ₇	Sigma Aldrich Allemagne	Dosage des Flavonoïdes standard

Tableau 5 : Milieux de cultures utilisés

Milieux de culture	Utilisation
Bouillon Nutritive (BN)	Revivification des souches
Mueller-Hinton bouillon (MH)	Antibiogramme
Gélose Sabouraud	Repiquage des souches
	Isolement des souches
	Détermination du CMB

2.3. Appareillage

Tableau 6 : Appareils utilisés

Appareillage	Marque
Rota vapeur	R220 BUCHI
Spectrophotomètre UV/Visible	SHIMADZU UV 1601
Balance électronique de précision	OHAUS 10-4g
Agitateur magnétique plaque chauffante	STUART MAX 300°C
Agitateur vortex	FICHER SCIENTIFIQUE (40 Hertz)
Etuve	MEMMERT
Autoclave	HERATHERM
Broyeur électrique	BOSCH KM13
Réfrigérateur	ENIEM

2.4. Microorganismes testés

Le choix des microorganismes s'est porté sur une souche fongique fréquente en pathologie humaine, c'est *Candida albicans* ATCC12583 provenant de Laboratoire Vétérinaire Régional de Laghouat.

3. Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

3.1. Séchage et broyage de la plante

La plante *Lobaria pulmonaria* a été lavée puis conservée à l'abri de la lumière, dans un endroit sec et aéré et à température ambiante pendant 15 jours afin de préserver au maximum l'intégrité de leur composition chimique, et ce en vue d'utilisations ultérieures. Après séchage, l'échantillon est broyé en poudre fine et récupéré dans des sacs en papier.



Figure 7 : L'espèce *Lobaria pulmonaria* broyé

3.2. Préparation des extraits d'acétone

Selon les travaux menés par Boulerbaa & Maroufi (2018) et Kadiri & Helaili (2019). Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules bioactives contenues dans la plante en utilisant l'acétone comme solvants organique qui accélère et augmente le rendement d'extraction (figure 8). Vingt grammes d'échantillon finement broyé, a été macéré par 200ml d'acétone pure pendant 24 heures à température ambiante, l'extrait est séparé par filtration à l'aide de papier filtre. L'opération a été répétée deux fois pour augmenter le rendement d'extraction.

3.3. Fractionnement de l'extrait d'acétone

L'extrait d'acétone a été fractionné par la méthode d'extraction liquide-liquide par des solvant à polarité croissante décrite par Ondua *et al.* (2019). L'extraction liquide-liquide est basée sur le degré de solubilité des polyphénols dans les solvants organiques. Le fractionnement de l'extrait d'acétone a été mené en utilisant successivement 3 solvants organiques de polarités différentes : l'hexane, le méthanol-eau 35% et l'eau. Les fractions sont conservées à froid jusqu'à utilisation. La figure 8, résume les étapes de fractionnement de l'extrait brut d'acétone.

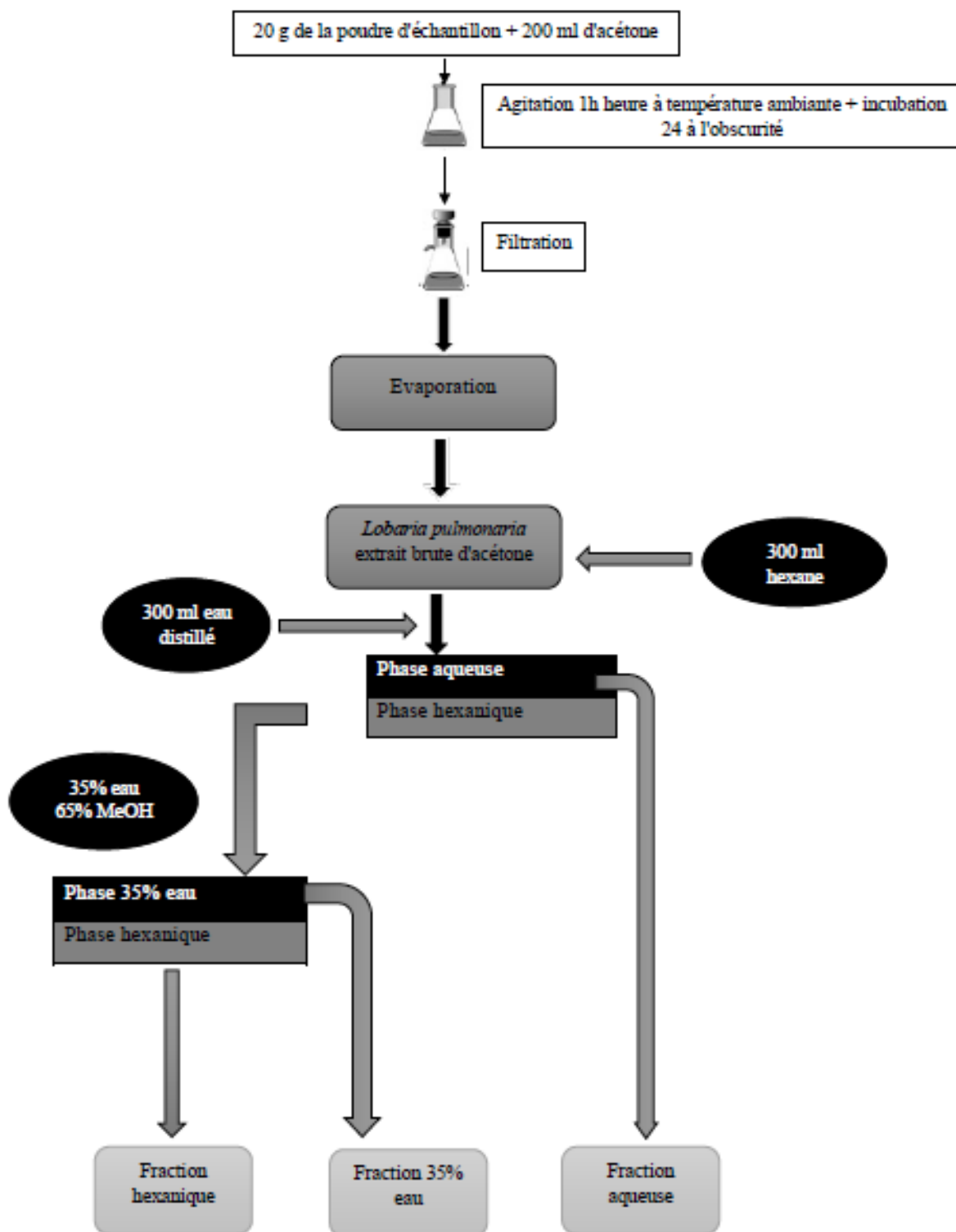


Figure 8 : Protocol expérimental d'extraction et fractionnement

3.4. Calcul de rendement d'extraction

Le rendement de l'extraction est déterminé selon Mahmoudi *et al.* (2013) à l'aide de l'équation suivante :

$$R\% = \frac{\text{masse résidu sec (g)}}{\text{masse de la poudre végétale (g)}} \times 100$$

3.5. Tests phytochimique

Les tests phytochimique consistent dans la détection des différentes familles de métabolites secondaires existant dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés (Bruneton, 2009; Hagerman *et al.*, 1998; Harbone, 1973; Trease & Evans, 1989).

Les tanins

La présence de tanins est mise en évidence en ajoutant, à 2 ml de l'extrait (50µl d'extrait + 1.95 ml méthanol) quelques gouttes (50µl) de solution de FeCl₃ (2%). Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue ou vert-noire.

Les flavonoïdes

La réaction de détection de flavonoïdes consiste à traiter 5ml de l'extrait (100µl d'extrait + 4,9ml méthanol) avec 1ml d'HCl (1%) et 100µl de NaOH. La présence des flavonoïdes est mise en évidence par l'apparition d'une coloration jaune.

Les glucosides cardiotoniques :

A 2.5 ml de chaque extrait (100µl d'extrait + 2,4 ml méthanol) ajouter 1ml d'acide acétique glaciale quelques gouttes (100µl) FeCl₃ (2%) et 0,5 ml d'acide sulfurique. La présence des glucosides cardiotoniques est confirmée par la formation de deux phases, une sous forme d'un anneau colorée en brun rouge (acide acétique) et la deuxième en bleu-vert (acide sulfurique).

Les composés réducteurs

Leur détection consiste à traiter 1ml de l'extrait (50µl d'extrait + 0,95 ml méthanol) avec 2ml d'eau distillée et 20 gouttes (500µl) de la liqueur de Fehling, puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipite rouge brique.

Les phénols

A 1ml de l'extrait (50µl d'extrait + 0.95 ml méthanol) 2ml d'eau distillée est ajouter avec quelques gouttes (50µl) FeCl₃ (10%). La présence des phénols est mise en évidence par l'apparition d'une coloration bleu ou verte.

Les résines

Leur détection consiste à traiter 5ml de l'extrait (50µl d'extrait + 4,5 ml méthanol) avec 2,5 ml d'acide acétique glaciale, puis chauffer quelques minutes et en fin ajouter 0,125 ml d'acide sulfurique. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration pourpre brillante.

Les glycosides

A 1 ml de chaque extrait (100µl d'extrait + 0,9 ml méthanol) ajouter 1 ml d'acide sulfurique (5%), chauffer pendant 1 minute puis centrifuger 5 minutes. Prendre des volumes identiques ; 1ml de surnageant mélanger avec 1ml de chloroforme, ce mélange est incubé 5min et enfin ajouter 100µl NaOH à la phase chloroforme. La présence des glucosides est confirmée par l'apparition d'une coloration jaune.

Les acides aminés

Ce test est basé sur la réaction des acides aminés avec la ninhydrine. A 10mg des résidus obtenus après évaporation de chaque solvant d'extraction solubilisés dans 1ml d'eau distillée ajouter 1ml de solution de ninhydrine préparée dans l'acétone (ou éthanol) dont la concentration est de 1%. Chauffer dans le bain marie et observer le changement de couleur. La présence des aminoacides est confirmée par l'apparition d'une couleur violette.

Les stéroïdes

A 10mg des résidus obtenus après évaporation de chaque solvant d'extraction solubilisés dans 2 ml de chloroforme. Ajouter 10 gouttes (70µl) d'acide acétique glacial puis 2 gouttes (10µl) d'acide sulfurique concentré. La solution devenue rouge puis bleu et enfin bleu claire qui indiquent la présence des stéroïdes.

4. Dosages des métabolites secondaires

Cette analyse permet d'avoir une estimation sur les teneurs en phénol totaux, les flavonoïdes.

4.1. Dosage des polyphénols totaux

Principe

Tout le contenu phénolique dans l'extrait brut a été déterminé par spectrophotomètre au biais de la méthode *Foline-Ciocalteu*, rapportée dans Slinkard & Singleton (1977), le réactif est formé d'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ et d'acide phosphomolybdique $H_3PM_{12}O_{40}$, qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène.

Mode opératoire

250 μ l de réactif de *Folin* (10 fois dilué) est ajouté à 50 μ l d'échantillon ou standard (préparé dans le méthanol) avec des dilutions convenables.

Après 2 min, 1 ml d'une solution de carbonate de sodium 4% (m/v), sont additionnés au milieu réactionnel. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 760 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et elle est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sec de la plante (mg EAG/g d'extrait sec).

La courbe d'étalonnage

Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue à partir des solutions d'acide gallique de concentrations allant de 0,05 à 0,5 g/l (même Protocole des échantillons).

4.2. Dosage des flavonoïdes

Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode citée par Djeridane *et al.* (2006) en utilisant le trichlorure d'aluminium comme réactif.

Le trichlorure d'aluminium forme un complexe acide stable avec le groupement carbonyle C-4 et aussi les groupements hydroxyles C-3 et C-5 des flavones et flavonols, en plus il forme des complexes acides labiles avec les groupements di-hydroxyles en ortho du cycle A ou B des flavonoïdes (Mabry *et al.*, 1970), ce complexe est de coloration jaune absorbe fortement à une longueur d'onde de 430 nm.

Mode opératoire

Un millilitre de chaque solution diluée dans le méthanol ou de l'extrait végétal dilué est mélangé avec 1ml du trichlorure d'aluminium 2% (m/v), ces solutions ont été maintenues à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 430nm.

La courbe d'étalonnage

La quercétine a été utilisée comme étalon pour tracer la courbe d'étalonnage. Une solution mère de concentration 0,1g/l préparé dans le MeOH a été diluée pour obtenir des solutions filles de concentrations différentes varient entre 0,01g/l et 0,1g/l.

5. Evaluation de l'activité antimicrobienne

5.1. Préparation de l'inoculum

Stérilisation du matériel

Les verreries utilisées dans la préparation des solutions fongiques ont été stérilisés à l'autoclave pendant 30 minutes à 120°C.

Revivification de la souche

On aensemencé 5ml de bouillon nutritif + quelques gouttes de BHIB liquide à partir de la souche fongique conservée. Cette dernière est incubée à une température de 37°C pendant 48h. Cette étape contribue à l'enrichissement et la revivification des souches.

Repiquage de la souche

Le repiquage est effectué sur milieu solide (gélose sabouraud) la veille de la réalisation du test anti-candidose. L'ensemble a été incubé à 37°C pendant 18 h pour avoir des cellules de levure à leur phase exponentielle de croissance.

Préparation de l'inoculum

On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de la souche de *Candida albicans*, on décharge ensuite l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile. Après homogénéisation des suspensions, la densité optique (DO) est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de 625nm. Cette DO doit être comprise

entre 0,08 et 0,1 soit équivalente à 0,5 Mc Farland, ce qui correspond à une concentration de 10⁶ à 10⁷ germes/ml. Il est à noter que l'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

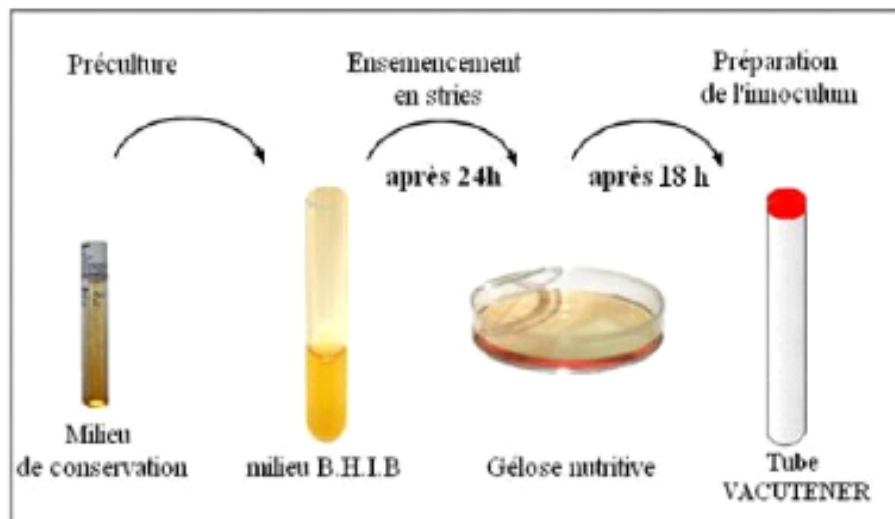


Figure 9 : Préparation de l'inoculum à partir de culture fongique fraîche

5.2. Détermination du CMI en milieu liquide

Inoculation des plaques (microdilution)

Nous nous sommes appuyés sur la Norme européenne EN ISO 20776-1 (Avril 2007) qui décrit la microdilution en bouillon pour déterminer les CMI des agents antimicrobiens.

Les essais sont réalisés sur des microplaques de plastique stériles contenant 96 puits à fond rond, les puits sont alignés en 6 lignes et 10 colonnes. La méthode est basée sur la préparation de solutions de travail pour un volume total de 200 µL dans la cupule ; La norme fait référence à des volumes totaux de 100 µL, mais par souci de risque de dessèchement de la cupule, nous avons préféré doubler le volume. 100 µL de milieu de culture liquide MH sont déposés dans les 60 puits d'une microplaque. 100 µL des extraits de concentration de 30mg/ml à tester sont déposés dans les puits de 1^{ère} ligne.

Après homogénéisation des puits de 1^{ère} ligne qui contiennent 100 µL de MH et 100 µL de l'extrait à tester, des dilutions de raison 1/2 sont réalisées d'un puits à un autre pour chaque colonne, de telle sorte que tous les puits de microplaque contiennent 100 µL de l'extrait dilué avec MH, sauf les puits des deux premières rangées verticales qui sont remplis par 100 µl de bouillon Müller-Hinton + 100 µl d'eau physiologique comme témoin négatif, et les puits de les deux dernières rangée verticale qui contiennent de 100 µl de bouillon Müller-Hinton + 100 µl de la suspension microbienne comme témoin positif.

A la fin, L'inoculation a été réalisée par dépôt de 100 μL de la suspension des souches fongiques dans les puits contenant 100 μL de l'extrait dilué avec MH pour atteindre le volume de 200 μL dans toute la microplaque.

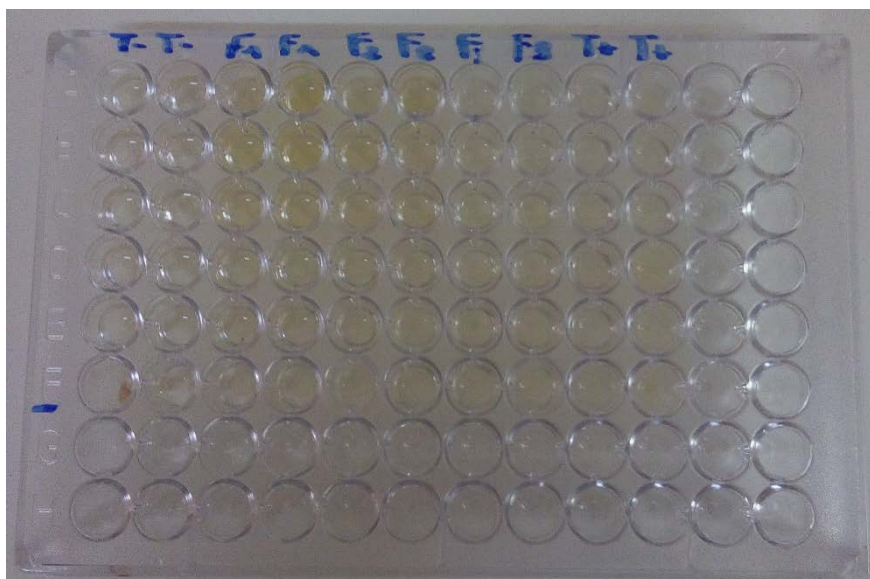


Figure 10 : Microplaque 96 puits contenant les différentes dilutions des 3 extraits organiques de *Lobaria pulmonaria*

Incubation des plaques de microdilution et lecture

Pour éviter le dessèchement, on ferme la plaque par un couvercle en plastique ou par d'autre plaque vide. Puis celle-ci est incubée à 37°C à l'étuve pendant 48h. Pour la lecture, il est important de vérifier le témoin de croissance positif auquel on comparera les autres cupules pour définir la CMI, la concentration la plus faible de l'antibiotique qui inhibe complètement la croissance visible.

5.3. Détermination des CMB en milieu solide

La CMB est la plus petite concentration d'antibiotique qui laisse un faible pourcentage de bactéries survivantes : 0.01% de survivants après 24 H de culture (Archambaud, 2000).

Après lecture de la plaque de microdilution, nous avons agité chaque suspension et prélever 10 μL de la cupule puis en repiquant par ensemencement à l'aide d'une anse, une fois sur milieu de sabouraud agar et d'autre fois sur milieu Muller-Hinton agar. Les boîtes de Pétri ont été incubées pendant 24h à 37°C à l'étuve. Après incubation, les boîtes où il n'y avait pas une croissance fongique correspondaient aux concentrations des extraits qui représentent les CMB.

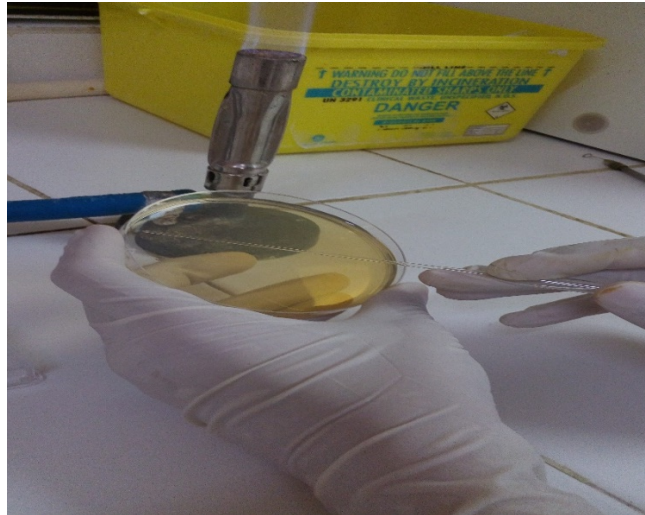


Figure 11 : Ensemencement des suspensions sur milieu de gélose sabouraud

CHAPITRE 3 :

RÉSULTATS et DISCUSSION

1. Rendement d'extraction des composés phénoliques

L'étude quantitative des extraits bruts de l'espèce *Lobaria pulmonaria* au moyen des dosages spectrophotométriques avait pour objectif la détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux. Notre choix d'étude s'est porté sur ces substances du fait que la majorité des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des plantes leur sont attribuées.

La plante de *Lobaria* broyée a été soumise à deux types d'extraction selon les méthodes décrites par Mahmoudi *et al.* (2013) et Ondua *et al.* (2019) en y effectuant quelques légères modifications. Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits : aqueux (Aq), hexanique (Hexane) et méthanol-Eau 35% (MeOH-H₂O 35%).

Il est à noter que la préparation de l'extrait acétonique a été répétée deux fois. Les différents rendements de l'extraction obtenus en pourcentage (%), la couleur ainsi que l'aspect des trois extraits sont mises en évidence dans le tableau ci-dessous.

Tableau 7: Aspect, couleur et rendement des trois extraits de *Lobaria pulmonaria*

Extrait	Couleur	Aspect	Rendement d'extraction (%)
Aqueux	Marron clair	Pâte collante	0,27
MeOH-H ₂ O 35%	Jaune	Poudre	0,03
Hexane	Vert claire	Poudre	0,05

De ces résultats, nous constatons que les solvants utilisés dans le présent travail ont été capables d'extraire les composés phénoliques de notre échantillon. En effet l'extraction à l'eau montre un meilleur rendement avec une valeur moyenne de 0,27 % contre 0,03% et 0,05% pour les extraits de MeOH-Eau 35% et l'hexane respectivement, ce qui veut dire que le solvant utilisé influence le rendement d'extraction.

Nos résultats impliquent d'une part que l'augmentation de la concentration en eau dans les solvants améliore le rendement d'extraction. D'autre part, des composés autres que les composés phénoliques peuvent avoir été extraits et contribueraient ainsi à un rendement plus élevé. D'après Zieliński & Kozłowska (2000), cela peut être attribuable à une grande solubilité des protéines et des hydrates de carbones dans l'eau et le méthanol.

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif, et semble être lié à bon nombre de paramètres tels que: l'origine géographique, les propriétés génétiques, la période de récolte, les conditions et la durée de conservation, la taille des particules des échantillons, la nature chimique des particules bioactives, la nature du solvant utilisé, les méthodes d'extraction appliquées et enfin la présence de substances interférentes.

2. Résultats des tests phytochimique

Les résultats des tests phytochimique sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 8 : Résultats des tests phytochimique (+ positif, - négatif, +/- faible)

Extraits	MeOH-H2O 35%	Hexane	H ₂ O
<i>Tanins</i>	+/-	+/-	+/-
<i>Flavonoïdes</i>	+/-	+/-	+/-
<i>Glucosides cardiotoniques</i>	+	+	+
<i>Composés réducteurs</i>	+	-	-
<i>Phénols</i>	+/-	+/-	+/-
<i>Résines</i>	+/-	+/-	+/-
<i>Glycosides</i>	-	-	-
<i>Acides amines</i>	-	-	+
<i>Stéroïdes</i>	-	-	-

Les principaux constituants chimiques présents dans les trois extraits sont identifiés par des réactions colorées. Les réactifs de caractérisation classique ont permis de mettre en évidence les groupes chimiques suivants : les composés réducteurs (réactif de *Fehling*), les tanins (réaction par FeCl_3), les flavonoïdes (réaction de la *cyanidine*), les glucosides cardiotoniques, les phénols, les résines, les glycosides, les acides aminés et les stéroïdes.

Les tests phytochimique réalisés sur les trois fractions (MeOH-H₂O 35%, Hexane et H₂O) de l'espèce *Lobaria pulmonaria* ont révélé la richesse de cette plante en métabolites secondaires.

Ces tests ont montré la richesse de cette plante en tanins, flavonoïdes, phénols et glucosides cardiotoniques, avec la présence des résines et des composés réducteurs et l'absence des glycosides et les stéroïdes.

3. Teneur en polyphénols totaux (PPT)

Le dosage des PPT de plante de *Lobaria pulmonaria* a été effectué par la méthode spectrophotométrique au réactif de *Folin-Ciocalteu* décrite par Slinkard & Singleton (1977). Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de coloration jaune. Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) (Ribereau-Gayon, 1968). La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 760 nm et est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

La teneur en polyphénols totaux est estimée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (Figure 12). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par un gramme de matière sèche (mg EAG/g MS). Ces derniers ont permis de donner des estimations sur les quantités des polyphénols totaux contenus dans notre échantillon (les trois extraits).

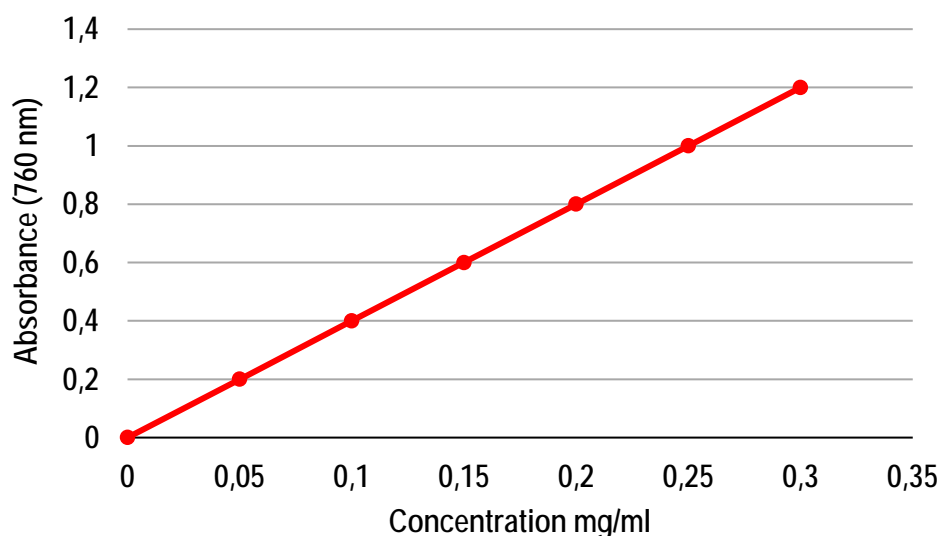


Figure 12 : La courbe d'étalonnage d'acide gallique

L'histogramme représenté en figure 13 illustre les teneurs en PPT des différents extraits de *Lobaria pulmonaria*.

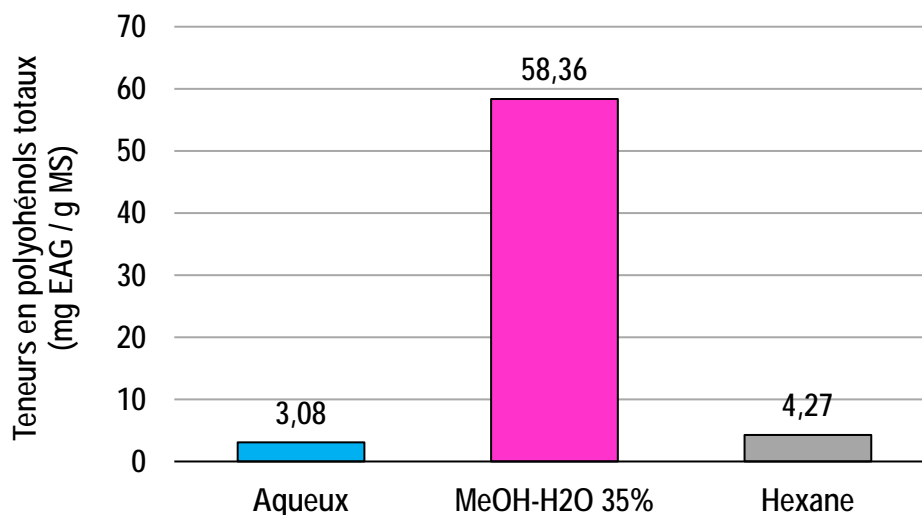


Figure 13 : Teneur en polyphénols totaux des trois extraits étudiés

Les résultats du dosage des PPT (figure 13) montrent que les teneurs varient entre 58,36, 4,27 et 3,08 mg EAG/g MS et que les taux les plus élevés ont été détectés dans l'extrait de MeOH-H₂O 35% (58,36 mg EAG/g MS) tandis que, les teneurs les plus basses sont attribuées à l'extrait aqueux (3,08 mg EAG/g MS).

Notons que la teneur en composés phénoliques de l'extrait aqueux varie dans le sens opposé que son rendement. Ces résultats veulent dire que le type de solvant utilisé influence la teneur en polyphénols totaux des différents extraits une bonne fois.

Comme déclaré précédemment les solvants d'extraction jouent un rôle clé dans la détermination de la teneur en composés phénoliques, et ce soit en augmentant ou en diminuant la teneur de ceux-ci. Ajouté à cela, la faible spécificité du réactif de Folin-Ciocalteu est l'inconvénient principal du dosage colorimétrique. D'après Gómez-Caravaca *et al.* (2006), le réactif est extrêmement sensible à la réduction de tous les groupes d'hydroxyles non seulement celles des composés phénoliques, mais également de certains sucres et de protéines.

Les composés phénoliques sont généralement solubles dans les solvants organiques polaires et les solutions aqueuses et sont peu solubles dans les solvants organiques apolaires (Bruneton, 2009). Par conséquent, afin d'obtenir des fractions plus riches en polyphénols, il est préférable d'employer des mélanges solvant(s) organique(s)/eau à des proportions bien définies, car l'addition d'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des composés phénoliques.

4. Teneur en flavonoïdes totaux (FVT)

Notre choix s'est orienté vers l'étude de cette classe de polyphénols, du fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006).

La détermination quantitative des flavonoïdes a été effectuée selon la méthode de trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) décrite par Djeridane *et al.* (2006), celle-ci est la plus employée car elle se base sur la formation d'un complexe flavonoïde-ion d'aluminium ayant une absorbance maximale à 430 nm.

La teneur en flavonoïdes totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec différentes concentrations de la quercétine, un flavonoïde très connu dans la famille des flavonols (Figure 14). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent de quercétine par un gramme de matière sèche (mg EQ/g MS). Ces résultats ont permis de donner des estimations sur les quantités des flavonoïdes totaux contenus dans la plante de *Lobaria pulmonaria* (les trois extraits).

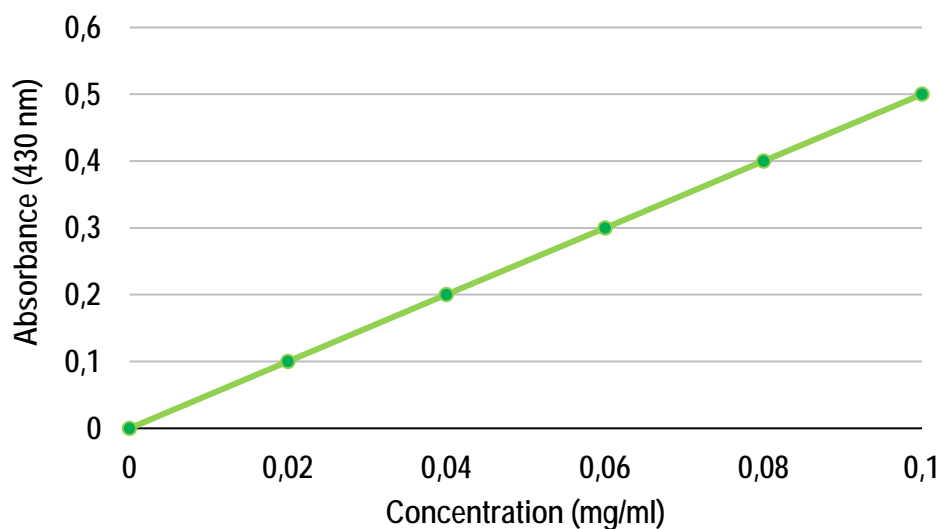


Figure 14 : La courbe d'étalonnage de la quercétine

L'histogramme ci-dessous représenté les teneurs en flavonoïdes des différents extraits de *Lobaria pulmonaria*.

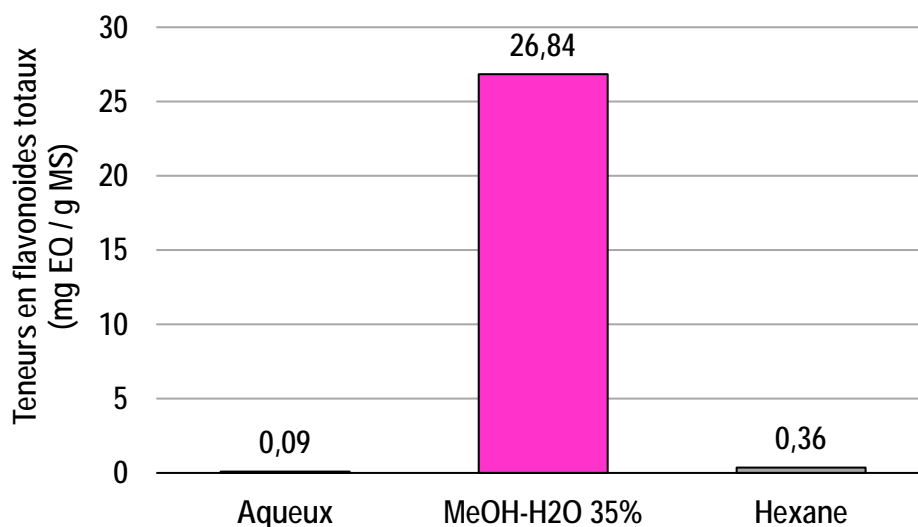


Figure 15 : Teneur en flavonoïdes totaux des trois extraits de *Lobaria pulmonaria*

Les résultats obtenus lors du dosage des flavonoïdes (figure 15) montrent que les teneurs balancent entre 26,84 mg EAG/g MS pour les fractions de MeOH-H₂O 35%, 0,36 mg EAG/g MS pour les fractions hexanique et 0,09 pour les fractions aqueuses. En comparant les teneurs en flavonoïdes à celles des composés phénoliques dans les trois extraits, nous remarquons qu'elles sont toutes plus faibles, ce qui suggère que les extraits contiennent d'autres composés phénoliques possédant d'autres structures chimiques que celles des flavonoïdes (acides phénoliques, tanins...).

A la lumière des résultats des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes rapportés dans la figure 13 et la figure 15 respectivement, il en ressort que les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes sont largement supérieures dans les fractions de MeOH-H₂O 35% et beaucoup moins importantes dans les fractions hexaniques et aqueuses.

Ces différences en teneurs peuvent être expliquées par l'influence qu'exercent les standards utilisés dans la calibration, les méthodes d'extraction ainsi que la nature des solvants utilisés.

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

L'issue de ces résultats de la caractérisation quantitative, la plante de *Lobaria pulmonaria* à travers ces constituants en polyphénols et en flavonoïdes constitue une source prometteuse en composés bioactifs bénéfiques à la santé humaine.

5. Activité anti-candidose des extraits

Les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, les flavonoïdes, les huiles essentielles et les triterpenoïdes (Rojas *et al.*, 1992), le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est tributaire de leurs compositions chimiques. D'après Basli *et al.* (2012), l'effet antibactérien des polyphénols est l'une des activités biologiques les plus étudiées.

Ce travail a pour objectif de mettre en évidence la présence ou l'absence d'un potentiel antimicrobien dans les extraits de la plante *Lobaria pulmonaria*, notre choix d'étude s'est porté sur une souche fongique possède une structure cellulaire et un métabolisme particulier c'est *Candida albicans*.

Lecture des CMI en microdilution

Pour déterminer la CMI en microdilution, il faut se référer au témoin positif pour déterminer s'il y a une pousse ou non dans chaque puit, les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 9 : Résultats de la concentration minimal inhibitrice des différents extraits de *Lobaria pulmonaria*

Témoin (-)		[C] mg/ml	Fraction MeOH-H ₂ O 35%		[C] mg/ml	Fraction Hexanique		[C] mg/ml	Fraction Aqueuse		Témoin (+)	
1 ^{ère} essai	2 ^{ème} essai		1 ^{ère} essai	2 ^{ème} essai		1 ^{ère} essai	2 ^{ème} essai		1 ^{ère} essai	2 ^{ème} essai	1 ^{ère} essai	2 ^{ème} essai
-	-	3,33	+	+	5,00	-	-	26,67	-	-	+	+
-	-	1,67	+	+	2,50	+	+	13,33	+	-	+	+
-	-	0,83	+	+	1,25	+	+	6,67	+	+	+	+
-	-	0,42	+	+	0,63	+	+	3,33	+	+	+	+
-	-	0,21	+	+	0,31	+	+	1,67	+	+	+	+
-	-	0,10	+	+	0,16	+	+	0,83	+	+	+	+

(+) : présence d'une croissance & (-) : absence d'une croissance

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus, montrent clairement une variabilité de CMI dont les valeurs sont de 3,33mg/ml, 5mg/ml et 13,33mg/ml pour les extraits, MeOH-H₂O 35%, hexanique et aqueuse respectivement. La souche *Candida albicans* est présentée une sensibilité faible aux extraits testés.

Les travaux menés par Crockett *et al.* (2003), sur des molécules isolés de l'espèce *Lobaria pulmonaria* (acide stictique, acide constictique et acide norstictique) montrent une activité antibiotique significative contre *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella gallinarum* et *Serratia marcescens* respectivement.

D'autre étude réalisée par Kiran *et al.* (2013), sur les extraits de *Lobaria pulmanaria* ont montré une activité uniquement contre *Bacillus cereus* ATCC 9139, *Bacillus subtilis* ATCC 21332 et *Bacillus sphaericus* RSKK 382. En outre, l'activité antibactérienne maximale a été déterminée par l'utilisation d'extraits d'acétone à la place du chloroforme.

Une étude récente rapportée par Tas *et al.* (2019), sur des extraits d'acétone, de méthanol et d'eau, d'espèces de lichen, en utilisant la méthode de diffusion sur disque. L'étude a montré, que la majorité des espèces de lichens présentaient une activité antibactérienne contre *A. hydrophila*, *S. agalactiae*, *E. faecalis* et *L. garvieae* par les zones d'inhibition entre $7,0 \pm 0,0$ - $28,5 \pm 0,5$ (mm \pm SE).

D'après les études précédentes, l'extrait acétone montre une activité antimicrobienne plus importante que les autres extraits, mais malheureusement nous n'avons pas trouvé assez des travaux sur l'effet anti-candidose de différents extraits de l'espèce *Lobaria pulmanaria*. Donc nos résultats restent les premiers et promoteurs d'être poursuivie par des études avancées.

CONCLUSION

Les plantes médicinales demeurent à ce jour la source la plus fiable des principes actifs connus pour leurs propriétés thérapeutiques, pharmacologiques, cosmétologiques et agricoles. Au cours de ces dernières années, de nombreux chercheurs se sont intéressés aux composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes, qui sont considérés comme de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit afin de pallier aux composés d'origine synthétique.

Cette étude pouvant être perçue comme un projet préliminaire à une étude à venir plus approfondie, avait pour objectif l'estimation de la teneur en polyphénols et flavonoïdes totaux ainsi que l'activité in vitro anti-candidose des différents extraits de la plante *Lobaria pulmonaria*.

La détermination des rendements en extraits a montré une variabilité qui diffère en fonction des solvants utilisés : 0,27% pour l'extrait aqueux, 0,03% pour l'extrait de MeOH-Eau 35% et 0,05% pour l'extrait hexanique.

Les tests phytochimiques révélaient la présence de différentes familles de composés chimiques comme les tanins, les flavonoïdes, Glucosides cardiotoniques et les phénols. Cela veut dire que *Lobaria pulmonaria* est une espèce riche en principes actifs.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux a été réalisée par le réactif de Folin-Ciocalteu et a montré que l'extrait de MeOH-eau 35% est considéré comme l'extrait le plus riche en polyphénols comparé à l'extrait aqueux et l'extrait hexanique, les valeurs respectives étaient comme suit : 58,36, 3,08 et 4,27 mg EAG/g de matière sèche.

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl₃), pour l'extrait de MeOH-eau 35%, aqueux et hexanique les valeurs respectives étaient comme suit : 26,84, 0,09 et 0,36 mg EQ/g de matière sèche.

L'activité anti-candidose a été déterminée sur la souche fongique *Candida albicans*, selon la méthode de microdilution en bouillon, pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Les résultats indiquent que La souche *Candida albicans* est présentée une sensibilité faible aux extraits testés, dont les valeurs de CMI sont de 3,33mg/ml, 5mg/ml et 13,33mg/ml pour les extraits, MeOH-H₂O 35%, hexanique et aqueuse respectivement.

Au vu des résultats obtenus au cours de cette étude, des perspectives à venir s'imposent :

Élargir le spectre d'étude en étudiant la plante d'autres régions à des fins comparatives

Réaliser une étude toxicologique de cette plante

Des travaux supplémentaires seront utiles pour pouvoir identifier les molécules responsables des activités antimicrobiennes surtout au niveau des extraits les plus actifs ceci grâce à l'utilisation des méthodes chromatographiques (HPLC et CPG) et spectroscopiques (IR et RMN).

Étendre l'éventail des tests anti-candidose et pourquoi pas tester les activités anti-inflammatoire, antidiabétique, anticancéreuses et antiviellissement...etc.

- Adouane, S. (2016). *Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région méridionale des Aurès*. Université Mohamed Khider-Biskra.
- 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*.
- Anofel. (2007). *Parasitoses et mycoses: des régions tempérées et tropicales; Réussir les ECNi*: Elsevier MASSON.
- Archambaud, M. (2000). Méthode d'évaluation de l'activité des antibiotiques. *Brûlures*, 1.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.
- Basli, A., Chibane, M., Madani, K., & Oukil, N. (2012). Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10(1), 2-9.
- Belkhiri, F. (2009). *Activité antimicrobienne et antioxydante des extraits du Tymus communis L. et Carthamus caeruleus L.* (Magister), Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie.
- Benkiki, N. (2006). *Etude phytochimiques des plantes médicinales Algérienne : Ruta montana, Matricaria pubescences et Hypericum perforatum*. (Thèse de Doctorat), Université de BATNA, Batna - Algérie.
- Bessedik, M., & Benikhlef, M. T. (2017). *Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits phénoliques d'Opuntia ficus indica de Tunisie*. (Master), Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, Tizi-Ouzou - Algérie.
- Billing, J., & Sherman, P. W. (1998). Antimicrobial functions of spices: why some like it hot. *The Quarterly review of biology*, 73(1), 3-49.
- Boulerbaa, R., & Maroufi, F. (2018). *Evaluation de l'activité antioxydante des extraits bruts de lichen Lobaria pulmonaria*. (Master en Biochimie), Université amar Téliidji - Laghouat.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales* (4e ed.). Paris: Lavoisier.
- Calixto, J. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of medical and Biological research*, 33(2), 179-189.
- Carillon, E. (2000). La phytothérapie face à l'évolution médicale. *phyto*, 10-15.
- Chu, W.-S., Magee, B., & Magee, P. (1993). Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *Journal of bacteriology*, 175(20), 6637-6651.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-570.
- Crockett, M., Kageyama, S., Homen, D., Lewis, C., Osborn, J., & Sander, L. (2003). Antibacterial properties of four pacific northwest lichens. *Lichenology group, Oregon State University*.

- Das, K., Tiwari, R., & Shrivastava, D. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of medicinal plants research*, 4(2), 104-111.
- De Vera, J.-P. (2012). Lichens as survivors in space and on Mars. *fungus ecology*, 5(4), 472-479.
- Decaux, I. (2002). *Phytothérapie : Mode d'emploi: Le bien public*.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Dufour, C., & Dangles, O. (2005). Flavonoid–serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-general subjects*, 1721(1-3), 164-173.
- Fouché, J. G., Marquet, A., & Hambuckers, A. (2000). Les Plantes Médicinales, de la plante au médicament. *Observatoire du Monde des Plantes Sart-Tilman*.
- Fournier, B., & Hooper, D. C. (1998). Effects of mutations in GrlA of topoisomerase IV from *Staphylococcus aureus* on quinolone and coumarin activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(8), 2109-2112. doi: 10.1128/AAC.42.8.2109
- Gazengel, J.-M., & Orecchioni, A.-M. (2013). *Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique (2e ed.)*: Lavoisier.
- Gómez-Caravaca, A., Gómez-Romero, M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(4), 1220-1234.
- Gräser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schönian, G., Presber, W., Mitchell, T. G., & Vilgalys, R. (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(22), 12473-12477.
- Gresele, P., Cerletti, C., Guglielmini, G., Pignatelli, P., De Gaetano, G., & Violi, F. (2011). Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(3), 201-211.
- Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., & Riechel, T. L. (1998). High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J Agric Food Chem*, 46(5), 1887-1892.
- Harbone, J. (1973). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3rd Charpman and Hall: London.
- Huneck, S. (1999). The Significance of Lichens and Their Metabolites. *Naturwissenschaften*, 86(12), 559-570. doi: 10.1007/s001140050676
- Iserin, P. (2001). *Encyclopédie des plantes médicinales (2ème édition ed.)*. Paris: Larousse Bourdasse.
- Jollois, R., & Mars, J. (2001). *L'aromathérapie exactement: encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles: fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle* (R. Jollois Ed.): Jollois.

- Jones, G. A., Mcallister, T. A., Muir, A. D., & Cheng, K. J. (1994). Effects of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Condensed Tannins on Growth and Proteolysis by Four Strains of Ruminant Bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 60(4), 1374-1378. doi: 10.1128/AEM.60.4.1374-1378.1994
- Kadiri, I., & Helaili, K. (2019). *Etude de l'activité antioxydante des fractions de solvant à polarité différente d'un Lichen à usage culinaire*. (Master en biochimie), Université Amar Télidji - Laghouat.
- Kaufmann, S. H. E. (1997). *Host response to intracellular pathogens*: Springer et R.G. Landes, New York.
- Keller-Didier, C. (2004). LES PLANTES MÉDICINALES. *Aryana Libris*, 8.
- Kiran, F., Yildiz, A., & Osmanağaoğlu, Ö. (2013). Determination of antimicrobial properties of some lichen samples. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 43(3), 97-103.
- Lardry, J.-M., & Haberkorn, V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles. *Kinésithérapie, la revue*, 7(61), 14-17.
- Mabry, T., Markham, K., & Thomas, M. (1970). *The systematic identification of flavonoids*. 1970. Paper presented at the Library of Congress Catalog Card.
- Macheix, J.-J., Fleuriot, A., & Jay-Allemand, C. (2005). *Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique* (Presses polytechniques et universitaires romandes ed.).
- Mahmoudi, S., Khali, M., & Mahmoudi, N. (2013). Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*(9), 35.
- Morgan, J. (2005). Global trends in candidemia: review of reports from 1995–2005. *Current infectious disease reports*, 7(6), 429-439.
- Motilva, M.-J., Serra, A., & Macià, A. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A*, 1292, 66-82.
- Nauciel, C., & Vildé, J.-L. (2005). *Bactériologie médicale*: Elsevier Masson.
- Newman, A. M., Liu, C. L., & Green, M. R. (2015). Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *12*(5), 453-457. doi: 10.1038/nmeth.3337
- Ondua, M., Njoya, E. M., Abdalla, M. A., & Mcgaw, L. J. (2019). Anti-inflammatory and antioxidant properties of leaf extracts of eleven South African medicinal plants used traditionally to treat inflammation. *J Ethnopharmacol*, 234, 27-35.
- Pandey, M. M., Khatoon, S., Rastogi, S., & Rawat, A. K. S. (2016). Determination of flavonoids, polyphenols and antioxidant activity of *Tephrosia purpurea*: a seasonal study. *Journal of integrative medicine*, 14(6), 447-455.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical microbiology reviews*, 20(1), 133-163.
- Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R., & Mata, R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 35(3), 275-283.

- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.
- Schwalbe, R., Steele-Moore, L., & Goodwin, A. C. (2007). *Antimicrobial susceptibility testing protocols*: Crc Press.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
- Sudbery, P. E. (2001). The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. *Molecular microbiology*, 41(1), 19-31.
- Tas, I., Yildirim, A., Ozyigitoglu, G., Turker, H., & Turker, A. (2019). Lichens as a promising natural antibacterial agent against fish pathogens. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 39(1), 41.
- Tortorano, A. M., Kibbler, C., Peman, J., Bernhardt, H., Klingspor, L., & Grillot, R. (2006). Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents*, 27(5), 359-366.
- Trease, G., & Evans, W. (1989). *Pharmacognosy*. 11th edn. Brailliar Tiridel Can: Macmillian publishers.
- Zarrouq, B. (2015). *Mémoire: Etude phytochimique et activité antibactérienne d'Anabasis aretioides*.
- Zieliński, H., & Kozłowska, H. (2000). Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J Agric Food Chem*, 48(6), 2008-2016.