



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE  
ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
جامعة الشاذلي بن جديد- الطارف  
UNIVERSITÉ CHADLI BENDJEDID D'EL-TARF



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de BIOLOGIE**

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention d'un Diplôme de Master**

**Spécialité : Toxicologie**

***THEME***

***CONTRIBUTION A LA VALORISATION DES METABOLITES  
SECONDAIRES DES LICHENS DANS LA REGION D'ELTARF***

***Par : Khaldoun Samra et Otmani Khawla***

**Sous la Direction de : Bendjedid El-Tarf**

**Devant le jury**

**Président (e) : Boumedris Z, grad: MCB**

**Examineur (ice): Gheid S, grad: MCA**

***Année Universitaire : 2019- 2020***

# REMERCIEMENTS

*Avant tout propos, nous remercions ALLAH*

*Le tout puissant de nous avoir donnée la capacité et la volonté jusqu'au bout*

*pour réaliser ce travail.*

*Nous remercions notre encadreur Dr. Belabed pour avoir encadré*

*Et dirigé ce travail avec une grande rigoureuse scientifique, ses précieux*

*conseils.*

# DEDICACE

*Je dédie ce travail tout d'abord à ma chère mère Houria. Merci De m'avoir soutenu tant moralement que matériellement pour que je Puisse attendre mon but, et de ses prières pour moi.*

*Mon cher père, que dieu ait pitié de lui..... Papa tu ma manques tellement... Je t'aime*

*A mon grand père,*

*A mes chères sœurs Samya, Nassima, Ahlam Hada, Imen*

*AMes frères Nour El Din, Samir, Sassi. Et leur femmes Samah et Hoda.*

*A Mes chers : Taima, jinan, Lujain, Saja, Malak, Saja, Ibrahim, Abd Almomen, Rayan,*

*Mootaz .... Et A toute ma famille.*

*A Mon Binome Khawla Et Mes Amies : Manel, Ferial, Nesrine, Amani, Chaima, Hadjer.*

*A toute la promotion de master toxicologie fondamentale et appliqué*

*2019-2020*

***KHALDOUN SAMRA***

# DEDICACE

## *JE DEDIE CE MEMOIRE ... ?*

*Je remercie ALLAH , le tout puissant pour m'avoir aidé à élaborer ce travail et qui ma donné la patience par rapport aux moments difficiles rencontrés sur mon chemin.*

### *A mon cher père Abed*

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation .*

### *A ma très chère mère Zoubeïda*

*Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi .*

*Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.*

### *A mon fiancé Fathi*

*Le source de soutien et d'amour et d'encouragement .*

### *A mes très chères soeurs et frères*

*"Ghania , Marwa , Fahima , Billel , Mohamed , Mouldi , Boumadien "*

*Vous savez que l'affection et l'amour fraternel que je vous porte sont sans limite.*

*Je remercie en vous les soeurs et les amies.*

*J'implore Dieu qu'il vous apporte bonheur et vous aide à réaliser vos voeux.*

*Je vous souhaite une vie pleine de joie.*

## *A les enfants de mes soeurs*

*Ritel , Oumayma , et Badro*

*Pour son tendresse , malgré sont petites*

## *A tous mes oncles et tantes*

*Ce travail est aussi le fruit de vos encouragements et de vos bénédictions.  
Soyez assurés de ma profonde gratitude.*

## *A mes belles amies*

*Hadjer , chaima , Samra , kholoud , chaima .Vous avez toujours été présentes  
pour les bons conseils .Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours  
au long de ma vie professionnelle et personnelle .*

## *A tous les membres de famille*

*Otmani , Ziani , et Boulanoir*

*Voulez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon affection.*

**OTMANI KHAOULA**

## Liste des abréviations

ASTM D : American Society for Testing and Materials, association élaborant des normes internationales pour le monde scientifique et industriel (<http://www.astm.org/>)

ATCC : American Type Culture Collection

CEP : Extraction assistée par champ électrique pulsé

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Diméthylsulphoxide

EA : extrait acétonique

EAE : Extraction assistée par enzyme

EAM : extrait (éther d'éthyle, acétone, méthanol)

EP : l'extrait de plante

GHz : gigahertz

MAE : Extraction assistée par micro-ondes

MH : Muller Hinton (Milieu)

MHz : mégahertz

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standards

PFE : Extraction par fluides pressurisés

SFE : Extraction par fluides supercritiques

UAE : Extraction assistée par ultrasons

## LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
Figure 01	Types de thalles lichéniques	04
Figure 02	Coupes transversales de lichens observés au microscope optique (x 400)	06
Figure 03	Schéma représentatif de la reproduction sexuée	07
Figure 04	Schéma représentatif de la reproduction asexuée par sorédies	07
Figure 05	Schéma représentatif de la reproduction asexuée par isidies	08
Figure 06	Different formes des lichens :A .leprose .B.crustose .C.Foliose .D.Fruticose	10
Figure 07	structures spécialisées associées au thalle de lichen	11
Figure 08	Structure de base des flavonoïdes	18
Figure 09	Structure des tanins hydrolysables	19
Figure 10	Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés	20
Figure 11	Structures chimiques des saponines	20
Figure 12	Structure de base d'alcaloïdes	21
Figure 13	Les différentes voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques	29
Figure 14	Extracteur de Soxhlet	32
Figure 15	Extraction par macération	33
Figure 16	montage hydro-distillation par micro-onde	34
Figure 17	Extraction au CO2 supercritique	38
Figure 18	le montage de l'entraînement à la vapeur d'eau	39
Figure 19	le montage d'extraction par micro-ondes	40
Figure 20	Représentation schématique du comportement de molécules possédant un dipôle en l'absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence	41

Figure 21	Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation	42
Figure 22	Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide	42
Figure 23	Exemple d'un test d'activité antimicrobienne par la technique des disques (à gauche) et microplaque 96 puits couramment utilisée pour la technique en milieu liquide (à droite)	46
Figure 24	Méthode de micro-dilution	47
Figure 25	Méthode de macro-dilution	47
Figure 26	Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé	48
Figure 27	Cellule de Malassez	48
Figure 28	Incubation des tubes pendant 48 heures à 37°C sous agitation continue	50
Figure 29	<i>Cladina stellaris</i>	53
Figure 30	<i>Cladina rangiferina</i>	54
Figure 31	<i>Xanthoria parietina</i> récoltée de l'université des frères Mentouri Constantine	57
Figure 32	<i>Nephroma laevigatum</i> sur son substrat avant récolte	58
Figure 33	Résultats du test anti-bactérien de l'extrait acétoniques et méthanoliques de lichens récoltés sur deux souches de bactéries <i>E.coli</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	61

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	Page
Tableau 01	Classes des metabolites secondaires dans les lichens	30
Tableau 02	Provenance et grade des réactifs et solvants	52
Tableau 03	Conditions pour les extractions au Soxhlet, par macération et par entraînement à la vapeur sur <i>Cladina stellaris</i>	54
Tableau 04	Conditions pour les extractions par Soxhlet et par macération sur <i>Cladina Rangiferina</i>	56
Tableau 05	Rendement massique % obtenus par extraction séquentielle et extraction classique de <i>Xanthoria parietina</i>	57
Tableau 06	le rendement total d'extractions RET par l'acétone des deux extraits de lichens	59

## Résumé

Cette présente étude vise à comparer et évaluer des techniques d'extraction des métabolites secondaires des lichens et les méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique visant des souches souvent multi-résistantes

Le rendement de l'extraction est très variables et ceci selon la méthode utilisé, le temps d'extraction et la nature du solvant. La variabilité de la composition des extrait est indiscutable et dépend souvent de l'espèce et des conditions environnementales. Les tests biologiques ont montrés que les extraits acétoniques, méthanolique, et éthanolique ont un effet antibactérien et antifongique sur la plupart des espèces contrairement à l'extrait aqueux qui ne provoque aucun effet inhibiteur sur la croissance des souches.

**Mots clés :** Lichen, extraction, évaluation, antibactérienne, antifongique.

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى المقارنة بين مختلف تقنيات إستخلاص المستقلبات الثانوية للأشنيات و كذا طرق تقييم النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات لهذه المستقلبات مع وجود البكتيريا لديها مقاومة متعددة تجاه المضادات الحيوية. يختلف مردود الاستخلاص باختلاف طريقة الاستخراج والوقت وطبيعة المذيب. أظهرت الاختبارات البيولوجية أن مستخلصات الأسيبتون والميثانول والإيثانول لها تأثير مضاد للجراثيم ومضاد للفطريات على معظم الأنواع بخلاف المستخلص المائي الذي لا يسبب أي تأثير مثبط لنمو السلالات.

الكلمات المفتاحية : أشنيات، استخلاص، تقييم ، جزيئات نشطة بيولوجيا ، مضاد للجراثيم ، مضاد للفطريات.

## Summary

The aim of this study is to compare and evaluate techniques for the extraction of secondary metabolites from lichens and methods for evaluating antibacterial and antifungal activity against strains that are often multi-resistant.

The extraction yield is highly variable, depending on the used method, the extraction time and the nature of the solvent. The variability in the composition of extracts is indisputable and often depends on the species and environmental conditions. Biological tests have shown that acetone, methanolic and ethanolic extracts have an antibacterial and antifungal effect on most species, unlike aqueous extracts, which have no inhibitory effect on strains growth.

Key words : Lichen, extraction, evaluation, antibacterial, antifungal.

# SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction ..... 1

## Partie bibliographique

### Chapitre I : Les Lichens

1- Description des lichens.....	3
1-1- Historique des lichens.....	3
1-2-Définition.....	3
1-3- Constituant des lichens.....	3
1-4- Morphologie des lichens.....	4
1-5- Reproduction des lichens.....	6
1-5-A- Reproduction sexuée (Champignon seul).....	7
1-5-B- Reproduction asexuée (algue associé au champignon).....	7
1-5-B-1- Reproduction asexuée par sorédies.....	7
1-5-B-2- Reproduction asexuée par isidies.....	8
1-2- Classification des lichens.....	8
1-2-1- Ascolichens.....	8
1-2-2- Basidiolichens.....	8
1-3- Ecologie des lichens.....	12
1-3-1- Facteurs édaphiques (substratiques).....	12
1-3-2- Facteurs climatiques.....	13
1-3-3- Facteurs biotiques.....	13
1-4- Mode d'association des lichens.....	14
1-4-1- Symbiose mutualiste.....	14

1-4-2- Symbiose antagoniste.....	14
1-4-3- Réactions réciproques des symbiotes.....	15
1-5- Les lichens en Algerie.....	16

## **Chapitre II : Les Métabolites Secondaires**

### **1- Les métabolites secondaires**

1-1- Définition des métabolites secondaires.....	17
1-2- Types des métabolites secondaires.....	17
1-2-1- Les composés phénoliques.....	17
1-2-1-1- Les flavonoïdes.....	17
1-2-1-2- Les Tannins.....	18
1-2-1-3- Les saponines.....	20
1-2-2- Les Alcaloïdes.....	21
1-3- Intérêt Thérapeutique.....	22
1-3-1- Les composés phénoliques.....	23
1-3-2- Les alcaloïdes.....	24
1-3-3- Les terpénoides.....	26
1-4- Conditions de production.....	26
<b>2- Métabolites secondaires des lichens.....</b>	<b>27</b>

2-1- Voies de biogenèse des métabolites secondaires.....	28
--	----

## **Chapitre III : Méthodes d'extraction des métabolites secondaires**

1.1.Méthodes d'extraction chimique.....	31
1.1.1.Extraction par solvant.....	31
1.1.1.1. Extraction par soxlet .....	31
1.1.1.2. Extraction par macération.....	32
1.1.1.3. L'hydro-distillation.....	33

A-Hydrodistillation assistée par ultrason.....	34
B-Hydrodistillation assistée par micro-onde.....	34
C-Hydrodistillation sous pression.....	35
<b>1.2 Méthodes d'extraction physique.....</b>	<b>35</b>
1.2.1 Techniques non-conventionnelles.....	35
1.2.1.1 Extractions assistée par enzymes (EAE).....	36
1.2.1.2 Extraction par champs électrique pulsé (CEP).....	36
1.2.1.3 Extractions par fluides supercritiques (SFE).....	37
1.2.1.4 Extraction par fluides pressurisés (PFE) et explosion à la vapeur.....	38
1.2.1.5 Extraction assistée par Micro-ondes (MAE).....	39
1.2.1.6 L'extraction assistée par ultrasons (UAE) et émulsions ultrasoniques.....	41
1.2.1.7 Expression à froid.....	43
1.3 Les meilleures méthodes.....	43

## **CHAPITRE IV : Méthodes d'évaluation**

<b>I. Méthodes d'évaluation de l'effet antibactérien.....</b>	<b>45</b>
I.1.Méthode de diffusion en milieu gélosé.....	46
I.1.1.Méthode de dilution.....	46
I.1.1.1.En milieu liquide.....	46
I.1.1.2.En milieu solide.....	<b>47</b>
<b>II. Méthode d'évaluation de l'effet antifongique.....</b>	<b>48</b>
II.1.Préparation de l'inoculum fongique.....	48
II.2. Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique .....	49
II.2.1. Technique de macrométhode en milieu liquide.....	49
II.2.2. Evaluation de l'activité des antifongiques classiques.....	51

III. Choix des méthodes.....	51
<b>ETUDE COMPARATIVE.....</b>	<b>52</b>

<b>CONCLUSION.....</b>	<b>66</b>
------------------------	-----------

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## INTRODUCTION

Les lichens sont des organismes singuliers résultant d'une symbiose unique dans le monde vivant entre deux entités biologiques que tout sépare sur le papier, et formant pourtant, un seul et même être vivant, confirmant le vieil adage « l'union fait la force ». Les lichens produisent des métabolites secondaires spécifiques avec un large éventail de structure possédant de multiples activités biologiques, compte tenu de la grande diversité de leur écosystème et de leur capacité à s'adapter à des conditions environnementales extrêmes. Cette capacité exceptionnelle de résistance en fait des espèces pionnières. **(Lagarde, 2017)**

De nombreuses études antérieures ont prouvé la bioactivité de ces molécules, citant les activités antitumorale, antivirale, antimicrobienne, antioxydant, anti-inflammatoire...etc. Dû l'usage des plantes renfermant ces métabolites dans diverses domaines thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires **(Thomas, 2011 ; Rispaïl *et al.*, 2005)**

Cependant, les lichens sont des organismes à croissance lente (Nash III, 2008). L'accès à leurs métabolites peut s'avérer difficile lorsque le thalle est peu développé (ex. espèces du genre *Lepraria*) ou peu abondant (ex. *Cladonia incrassata*). Ainsi, dans un contexte de protection des ressources naturelles, la recherche de nouvelles molécules bioactives à partir d'organismes cultivables s'avère être une voie prometteuse (Lagarde, 2017).

L'exploration lichénologique du territoire nord-africain est très insuffisante **(Faurel *et al.*, 1952a)**. La flore lichénique du Maroc est la plus connue en Afrique du Nord, bien qu'elle soit loin d'être suffisamment répertoriée **(Elrhzaoui *et al.*, 2016; Ajaj *et al.*, 2013; Nattah *et al.*, 2013; Ajaj *et al.*, 2007; Egea, 1996; Gattefossé et Werner, 1931)**.

En Tunisie, comme c'est le cas pour les Phanérogames, les lichens sont beaucoup moins nombreux que ceux de l'Algérie. Néanmoins, la Tunisie n'a pas été bien explorée du point de vue lichénologique **(Pitard et de Lesdain, 1909; Hue, 1897)**.

L'étude des lichens en Algérie a commencée il y a plus d'un siècle, mais sous forme d'explorations de naturalistes qui faisaient la collection des espèces lichéniques récoltées sur leur chemin et identifiées par la suite **(Ait hammou *et al.*, 2014 in kechkar et Ben Ahmad, 2018)**.

En Algérie, plusieurs recherches sur la valorisation des métabolites secondaires des lichens, l'identification de ces dernières nécessite un trajet de procédures, commençant par

l'extraction de des métabolites à partir de matériels végétale, séparation et purification de ces métabolites et enfin leur identification structurale.

L'objectif de ce travail est de faire une étude comparative entre des travaux antérieurs qui visaient les métabolites secondaires des lichens (extraction, identification, effets ...etc.). Pour cela, ce travail est scindé en deux parties essentielles la première partie contient quatre chapitres : le premier montre des généralités sur les lichens, alors que le deuxième présente les différents métabolites secondaires. Les méthodes d'extraction font l'objet du troisième chapitre et concernant le quatrième chapitre, il est réservé pour la présentation des différentes méthodes d'évaluation. En fin une étude comparative des différents travaux expérimentaux (entre les types d'extraction, le rendement, les métabolites secondaires identifié, les effets étudié, les organismes utilisés...ect) ont été illustrée dans la deuxième partie.

# 1 Les Lichens

## 1.1 Description des lichens

### 1.1.1 Historique des lichens

Jusqu'au début du 18<sup>e</sup> siècle, les lichens ont été classés dans les herbiers avec les Bryophytes (Jahns, 2007) et étaient considérés comme des êtres simples, intermédiaires entre les Champignons, pour les filaments incolores de leur thalle ou "hyphes", et les Algues, pour leurs cellules vertes ou "gonidies" (Des Abbayes, 2010) Ce n'est qu'en 1869, ou 1867 selon (Des Abbayes, 2010), que Schwendener a démontré que les lichens ne sont pas un organisme unique, mais une association de deux organismes différents vivant en relation étroite (Jahns, 2007) et durable, appelée ensuite symbiose d'une Algue avec un Champignon (Des Abbayes, 2010)

Selon Des Abbayes (2010), environ vingt mille espèces de lichens sont connues actuellement et ce nombre s'accroît chaque année.

### 1.1.2 Définition

Les lichens, qui sont intégrés dans le règne fongique, résultent de l'association symbiotique d'un champignon appelé mycobionte (du grec mykes : champignon ; bios : vie) et d'une algue verte et/ou d'une cyanobactérie appelées photobionte (du grec photo : lumière ; bios : vie). Cette symbiose confère aux lichens une structure et une reproduction spécifiques par rapport à chaque constituant seul. À la différence des plantes supérieures, ils ne possèdent ni racine, ni tige, ni feuille, mais un appareil végétatif rudimentaire : le thalle (Yuan et al., 2005).

### 1.1.3 Constituant des lichens

Les photosymbiotes : les algues représentent environ 10 % du lichen et se situent entre les deux couches du sandwich formé par le champignon.

Les mycobiontes : 98 % du lichen sont des champignons, de la classe des ascomycètes. Il en existe environ 13500 espèces peuvent se licheniser. Le champignon permet la formation des cortex supérieur et inférieur entre les quels sont hébergées les algues (Farou et Guerin, 2015).

Les bactériobiontes : des communautés bactériennes, pouvant former des structures de type biofilm sur certaines parties du thalle (Cardinale et *al.*, 2006 ; Kirkelund Hansen et *al.*, 2007).

### 1.1.4 Morphologie des lichens

Les lichens possèdent une morphologie simple, se présentent sous la forme d'un thalle qui ne possède pas de feuilles, de racines et de tiges. Le champignon est principalement responsable de la forme du thalle, mais elle est aussi influencée par le photobionte.

Les lichens sont des organismes qui poussent lentement, soit d'environ 5 à 10 mm/année et qui peuvent vivre pendant plus de 100 ans. Les lichens vont habituellement croître en hauteur pendant environ une dizaine d'années, puis lorsqu'ils ont atteint leur hauteur maximale, le bas du thalle commence à mourir alors que le pédicéon continue de pousser.

Les lichens sont présents sous sept formes de thalles : gélatineux, foliacés, lépreux, crustacés, fruticuleux, squamuleux et complexe.

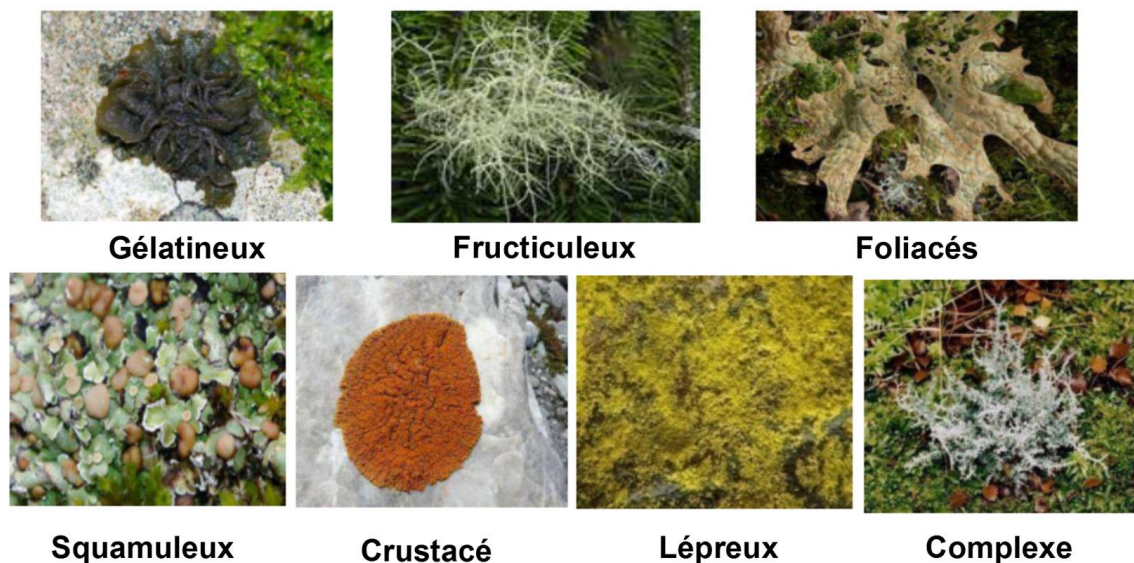


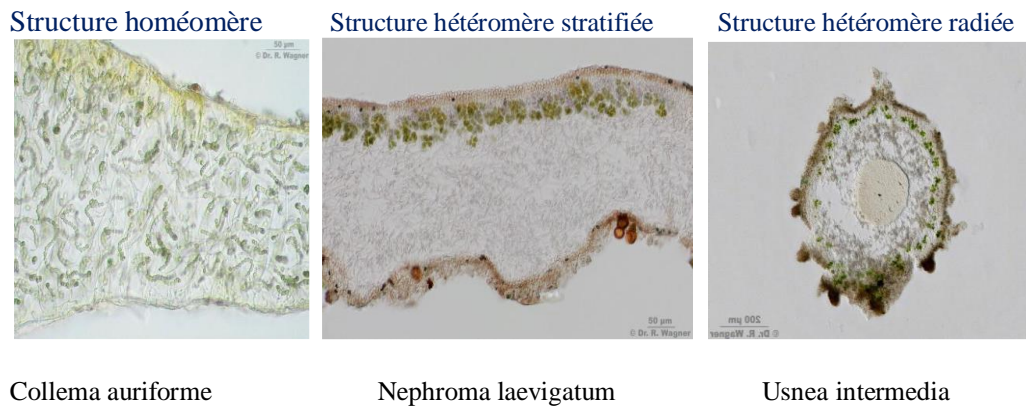
Figure 01: Types de thalles lichéniques (Dewick, 2002)

- Les **gélatineux** : lorsqu'hydratés, ils sont gélatineux tandis qu'à l'état déshydraté, ils sont cassants. Ils sont habituellement composés de cyanobactéries et sont de couleur vert foncé à noir.
- Les **foliacés** : sont apparait sous la forme de lamelles lobées. Le thalle ressemble à une feuille qui se détache de son substrat.
- Les **lépreux** : sont sous la forme de granules qui se détachent du substrat.

- Les **crustacés** : forment une croûte intégrée au substrat.
- Les **fruticuleux** : ressemble à un buisson, souvent ramifié dans toutes les directions. Ils ont habituellement un point de contact avec le substrat très restreint et le thalle se dresse à partir de cette surface de contact.
- Les **squamuleux** : constitués de petites écailles, ils forment une surface plane ou concave
- similaire aux crustacés et aux foliacés qui comporte des compartiments (squamules).
- Les **complexes** : sont formés de deux parties; d'un thalle primaire (crustacé, foliacé ou Squamuleux) qui est rattaché au substrat et d'un thalle secondaire de type fruticuleux qui se forme sur le thalle primaire (**Elix et Stocker-Wörgötter, 2008 ; Ismed, 2012 ; Vu, 2014**).

Le champignon est responsable de la structuration du thalle. En effet, l'anatomie des lichens se distingue par deux types de structures :

- Structure **homéomère** : les hyphes et les cellules algales ou cyanobactéries sont répartis de façon homogène dans toute l'épaisseur du thalle (Figure 3).
- Structure **hétéromère** : disposition par couches. Deux types de structures sont observés :
  1. *Structure stratifiée* composée de différentes couches organisées :
    - un cortex supérieur formé de filaments mycéliens jointifs ;
    - une couche algale, algues enserrées d'hyphes mycéliens ;
    - une couche médullaire ou médulle formée par des hyphes très lâches ;
    - un cortex inférieur, filaments mycéliens très denses parfois muni de rhizines pour la fixation du thalle au substrat.
  2. *Structure radiée* : mêmes couches que la structure stratifiée mais disposées de façon concentrique (symétrie centrale ; Figure2). (**Van Haluwyn et al., 2009**).



**Figure 2** : Coupes transversales de lichens observés au microscope optique (x 400)  
Source : <http://www.dr-ralf-wagner.de> (**Lagarde, 2017**)

### 1.1.5 Reproduction des lichens

Les lichens subsistent longtemps à l'état sec et deviennent cassants. Leurs fragments dispersés par le vent, les animaux ou la pluie, seront capables de régénérer un thalle. La reproduction permet au lichen de coloniser de nouveaux substrats lorsque les conditions sont favorables. Deux modes de reproduction peuvent être adoptés, sexuée et asexuée (**Bellanfant et al., 2010**).

#### A. Reproduction sexuée (Champignon seul) :

La reproduction sexuée se déroule en deux phases :

- 1) Dans le même thalle, Deux hyphes mâle et femelle fusionnent et donnent, à la surface du thalle, des structures en forme de boutons appelés les apothécies (sont des organes qui indiquent la reproduction sexuée) qui vont produire des **spores**.
- 2) Ces spores facilement transportées par le vent vont constituer de nouveaux des hyphes asexués qui devront capturer et emballer une algue présente dans le milieu pour pouvoir donner un nouveau thalle lichénique.

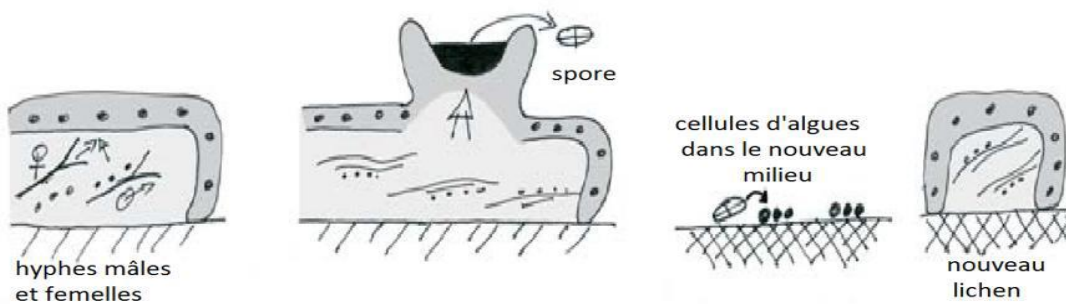


Figure 03 : Schéma représentatif de la reproduction sexuée (Bellanfant et al., 2010)

## B. Reproduction asexuée (algue associé au champignon) :

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

### B.1. Reproduction asexuée par sorédies :

Par les déchirures du thalle appelées soralles de couleur différente de la surface du thalle, il y a émission de petits "granules légers" appelés sorédies. Elles sont facilement transportées par le vent, la pluie, et permettent une dissémination de l'espèce.

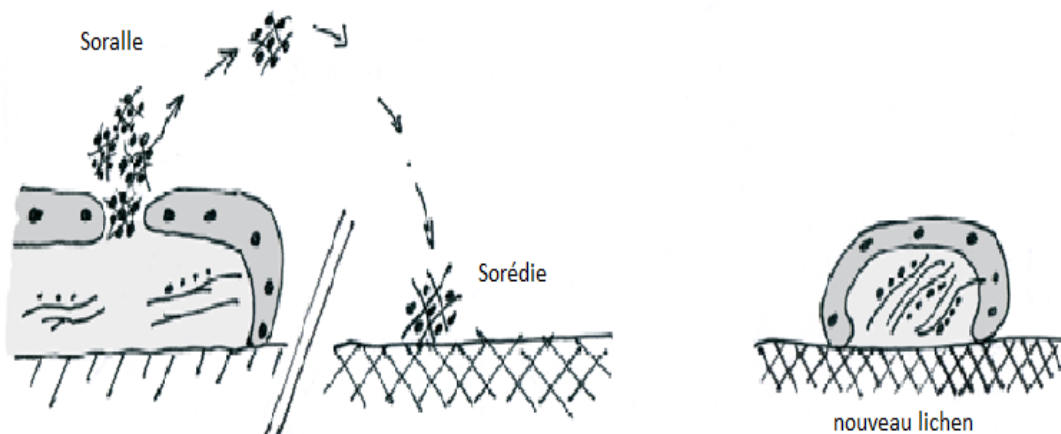


Figure 04: Schéma représentatif de la reproduction asexuée par sorédies (Bellanfant et al., 2010)

### B.2.Reproduction asexuée par isidies :

Les isidies sont de petites bourgeons formées à la surface du thalle de la même couleur que la surface du thalle et qui peuvent s'en détacher mais plus lourdes, elles assurent plutôt une colonisation du substrat (ex : parois rocheuses ou murs).

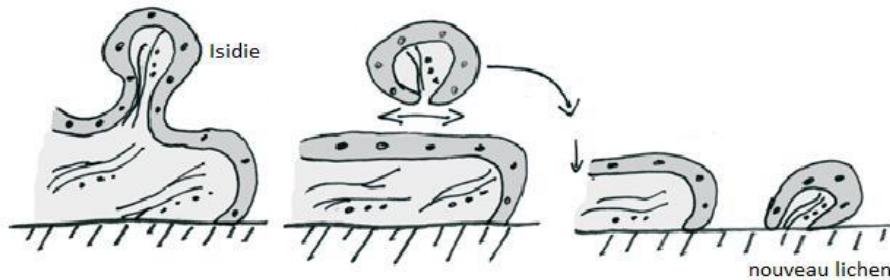


Figure 05: Schéma représentatif de la reproduction asexuée par isidies (Bellanfante et al., 2010)

## 1.2 Classification des lichens

La classification des lichens est basée sur la nature et les types de corps fruitiers du partenaire fongique.

**Zahlbruckner (1926) a classé les lichens en deux groupes principaux:**

### 1. Ascolichens:

Le membre fongique de ce lichen appartient à Ascomycotina. Ils sont divisés en deux séries selon la base de la structure du corps du fruit :

#### (i) Gynocarpeae:

Le corps du fruit est en forme de disque, c'est-à-dire de type apothécial. Il est également connu sous le nom de Discolichen (par exemple, Parmelia).

#### (ii) Pyrenocarpeae:

Le corps du fruit est en forme de flacon, c'est-à-dire de type périthécial. Il est également connu sous le nom de Pyrenolichen (par exemple, Dermatocarport).

### 2. Basidiolichens:

Le membre fongique de ce lichen appartient à Basidiomycotina par exemple, Dictyonema, Corella.

**Plus tard, Alexopoulos et Mims (1979) ont classé les lichens en trois groupes principaux:**

ii. Basidiolichen:

Le partenaire fongique appartient à Basidiomycetes par exemple, Dictyonema.

ii. Deuterolichen:

Le partenaire fongique appartient aux Deutéromycètes.

iii. Ascolichen:

Le partenaire fongique appartient à Ascomycetes par exemple, Parmelia, Cetraria.

- **Structure du thalle dans les lichens:**

Le corps végétal du lichen est thalloïde avec différentes formes. Ils sont généralement de couleur grise ou vert grisâtre, mais certains sont de couleur rouge, jaune, orange ou brune.

### **A. Structure externe du Thalle :**

Trois principaux types ou formes de lichens (crustose, foliose et fruticose) ont été identifiés sur la base de la morphologie externe, de la croissance générale et de la nature de l'attachement. Plus tard, sur la base de structures détaillées, **Hawksworth et Hill (1984) ont classé les lichens en cinq types ou formes principaux:**

#### **1. Leprose:**

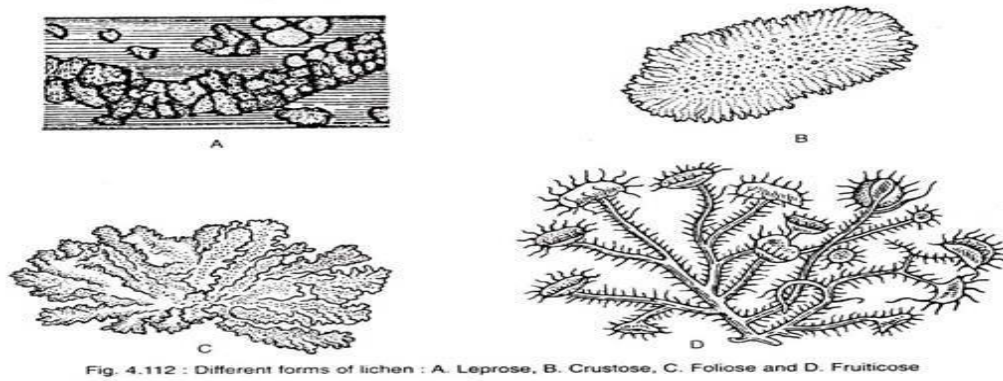
C'est le type le plus simple, où le mycélium fongique enveloppe soit un seul soit un petit groupe de cellules d'algues. La cellule algale ne s'enveloppe pas partout par les hyphes fongiques. Le lichen apparaît sous forme de masse pulvérulente sur le substrat, appelé léprose, par exemple *Lepraria incana*.

#### **2. Crustose:**

Ce sont des lichens où le thalle est peu visible (lichens encrassants), plat et apparaît comme une couche mince ou une croûte sur un substrat comme des écorces, des pierres, des roches, etc. Ils sont totalement ou partiellement intégrés dans le substrat, par exemple *Graphis*, *Lecanora*, *Ochrolechia*, *Strigula*, *Rhizocarpon*, *Verrucaria*, *Lecidia* etc.

#### **3. Foliose:**

Les lichens prennent la forme de feuilles, où le thalle est plat, s'étalant horizontalement et avec des lobes. Certaines parties du thalle sont attachées au substrat au moyen d'une excroissance hyphale, les rhizines, développées à partir de la surface inférieure, par exemple, *Parmelia*, *Physcia*, *Peltigera*, *Anaptychia*, *Hypogymnia*, *Xanthoria*, *Gyrophora*, *Collema*, *Chauduria* etc.



**Figure 06** : Different formes des lichens :A .leptose .B.crustose .C.Foliose .D.Fruticose (<http://www.biologydiscussion.com/notes/lichens/lichens-meaning-characteristics-and-classification/46549>)

#### 4. Fruticose (Frutex, arbuste):

Ce sont des lichens arbustifs, où les thalles sont bien développés, ramifiés cylindriques, ressemblant à des arbustes, poussent dressés (*Cladonia*) ou pendent du substrat (*Usnea*). Ils sont attachés au substrat par un disque basal, par exemple *Cladonia*, *Usnea*, *Letharia*, *Alectonia* etc.

#### 5. Filamenteux:

Dans ce type, les membres algaux sont filamenteux et bien développés. Les filaments d'algues restent enveloppés ou couverts par seulement quelques hyphes fongiques. le membre algal ici appelé type filamenteux et reste comme partenaire dominant, par exemple *Racodium*, *Ephebe*, *Cystocoleus* etc.).

### B. Structure interne de Thalle :

En fonction de la répartition des algues à l'intérieur du thalle, les lichens sont divisés en deux types :

#### 1. Homoisomère:

Dans cette structure, les hyphes fongiques et les cellules algales sont réparties plus ou moins uniformément dans tout le thalle. Les membres d'algues appartiennent à *Cyanophyta*. Ce type d'orientation se retrouve dans les lichens crustacés. Les deux partenaires s'entremêlent et forment une fine couche de protection externe, par exemple, *Leptogium*, *Collema* etc.

#### 2. Hétéromère:

Ici, le thalle est différencié en quatre couches distinctes: cortex supérieur, zone algale, médullaire et cortex inférieur. Les membres d'algues sont limités dans la zone d'algues uniquement. Ce type d'orientation se retrouve dans les lichens foliacés et fruticuleux par exemple, *Physcia*, *Parmelia* etc.

### C. Structures spécialisées de Thalle :

#### 1. Respiration des pores:

Dans certains lichens foliacés (par exemple, *Parmelia*), appelée pores respiratoires les échanges gazeux sont facilités par le cortex supérieur qui comporte une ouverture, appelée pores respiratoires.

#### 2. Cyphelles:

Sur le cortex inférieur de certains lichens foliacés (par exemple, *Sticta*), de petites dépressions se développent, qui apparaissent sous forme de taches blanches en forme de coupe, appelées *Cyphellae*. Parfois, les fosses qui se sont formées sans aucune frontière définie sont appelées pseudocyphelles. Les deux structures aident à l'aération.

#### 3. Céphalodium:

Ce sont de petites excroissances verruqueuses sur la surface supérieure du thalle. Ils contiennent des hyphes fongiques du même type que le thalle mère, mais les éléments algaux sont toujours différents. Ils aident probablement à retenir l'humidité. A *Neproma*, les Céphalodies sont endotrophes. (<http://www.biologydiscussion.com/notes/lichens/lichens-meaning-characteristics-and-classification/46549>)

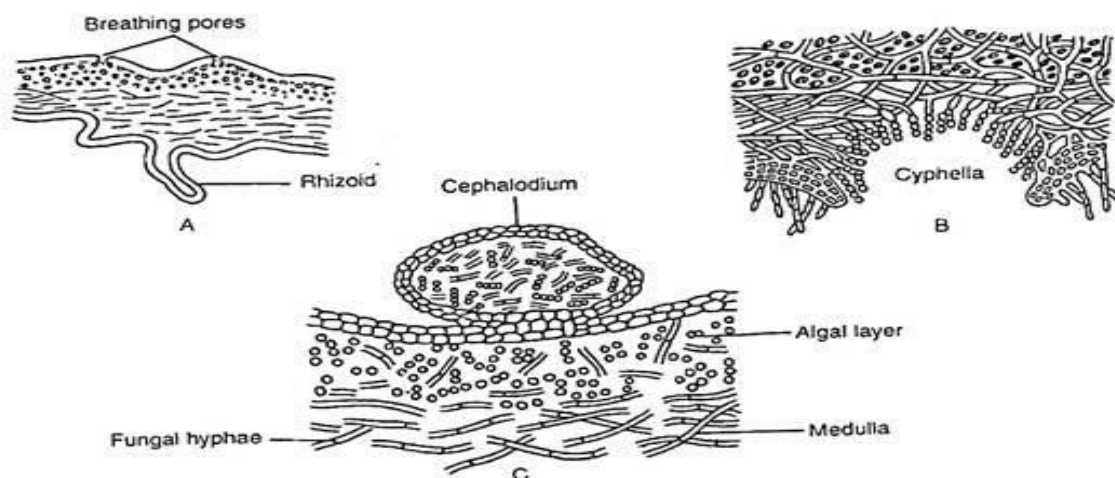


Fig. 4.114 : Specialised structures associated with lichen thallus : A. Breathing pores, B. Cyphella, C. Cephalodium

**Figure 07** : structures spécialisées associées au thalle de lichen  
(<http://www.biologydiscussion.com/notes/lichens/lichens-meaning-characteristics-and-classification/46549>)

### 1.3 Ecologie des lichens

Les lichens se trouvent au niveau de toute la planète terre. Ils composent l'ultime végétation rencontrée vers les pôles et en altitude, à la limite des neiges et des glaces permanentes. Seulement, ces végétaux, considérés dans leur ensemble, représentent un groupe très plastique, et chacun de ses espèces est influencé selon leurs exigences propres et sa répartition par le milieu de trois manières (**Clauzade et Roux, 1987**).

#### 1.3.1 Facteurs édaphiques (substratiques) :

Des caractères physiques (consistance, porosité, perméabilité...) et chimiques (réactions ioniques, teneur en calcium, en nitrates...) sont nécessaires pour établir la relation intime entre le lichen et le substrat. Ces facteurs conditionnent la pénétration du thalle dans le substrat et l'économie de l'eau (**Van Haluwyn et Lerond, 1993**).

La nature du substrat détermine plusieurs groupes d'espèces :

- **Lichens corticoles** : qui vivent sur les écorces des arbres.
- **Lichens saxicoles** : ils vivent sur les rochers calcaires, les vieux murs.

Selon **Bernard (2011)**, ils sont déterminés par la nature chimique du support et ont l'aptitude de retenir l'eau.

- **Lichens terricoles** : sont fréquents dans les landes, les pelouses le sol minéral.
- **Lichens humicoles** : vivent sur l'humus.
- **Lichens aquacoles** : comprennent les lichens hydrophiles qui colonisent les roches situées sur les berges des cours d'eau et les lichens ékroéphiles qui colonisent les roches soumises à des écoulements prolongés postérieurs aux pluies (**Coste, 2009**)

Selon le pH du support il existe différentes espèces lichéniques : certains sont acidophiles comme (*Cladonia*, *Platysma glaucum*), certains préfèrent un pH voisin de la neutralité (*Parmelia acetabulum*...), d'autres lichens sont basophiles (*Collema*...). Pour les espèces qui se développent sur les roches ou à terre, on note selon la composition chimique du substrat, la présence d'espèces calcicoles (*Collema*...), calcifuges (*Umbilicaria*) ou humicoles (*Cladonia*) (**Souchon, 1971**).

### 1.3.2. Facteurs climatiques :

Les lichens sont influencés par les facteurs écologiques de l'atmosphère qui sont important du fait que ils en absorbent une partie de l'eau, du gaz carbonique et des sels minéraux apportés par la pluies ou le vent (**Van Haluwyn et Lerond, 1993**).

- L'hydratation du thalle lichénique conditionne les fonctions vitales, pour cette raison l'eau à un rôle capital dans la répartition des lichens (**Van Haluwyn et al., 2009**).

- Le fonctionnement physiologique des lichens est influencé de façon directe par l'humidité. Ils la reçoivent soit de l'atmosphère (aérohygrophiles) soit du substrat (substratolygrophiles) (**Leblanc, 2001**).

- La respiration et la photosynthèse des lichens ce sont des fonctions métaboliques agit par la température (**Frey, 1970**).

- Le vent, est un facteur de dissémination qui comporte également une action mécanique d'arrachage qui entrave le développement des espèces fruticuleuses et espèces foliacées (**Des Abbayes, 1951**).

Les lichens sont, dans l'ensemble, des végétaux héliophiles, seul une minorité d'espèce préfèrent les habitats ombragés en relation avec l'humidité plus élevée de ces stations. Toute fois, il existe des espèces ayant des formes de soleil et des formes d'ombre ex. *Xanthoria parietina*. Comme la température, la lumière agit sur la photosynthèse ainsi que sur la respiration (**Ozenda et Clauzade, 1970**).

### 1.3.3. Facteurs biotiques :

La détermination de l'action des autres être vivants est également se fait lors de la répartition des lichens, soit parce qu'ils disputent leur place, détruisent ou modifient les conditions du milieu ou au contraire favorisent leur dissémination (**Van Haluwyn et Lerond, 1993**).

Ces actions comprennent essentiellement :

La concurrence vitale s'exerçant entre les lichens eux même, surtout entre thalles crustacés et thalle foliacés très appliqués au support, et aussi entre les lichens et les autres plantes comme les mousses, les hépatiques ainsi qu'avec certaines plantes supérieures.

L'influence de la végétation des Bryophytes et des plantes vasculaires qui modifie localement les conditions climatiques et substratiques, créant des microclimats et des microstations.

L'action des animaux et principalement de l'Homme (facteurs anthropozoïques) se manifestant surtout mécaniquement ; piétinement (fragmentation des thalles) et chimiquement (enrichissement de l'atmosphère et du substrat en ammoniac, sels, nitrates, phosphates...) (**Ozenda et Clauzade, 1970**).

### 1.4 Mode d'association des lichens

Les lichens sont des champignons associés avec des algues vertes ou des cyanobactéries (algues bleues). Cette association de différents organismes s'appelle une symbiose (**Schöller 1997**).

D'après **Des Abbayes et al., (1978)**, la symbiose lichénique se présente sous des modalités multiples. Il existe deux types de symbioses chez les lichens : symbiose mutualiste et symbiose antagoniste.

#### 4.1. Symbiose mutualiste :

Ni l'algue ni le champignon ne semblent pouvoir vivre isolément. Les algues fournissent aux hyphes du champignon les éléments hydrocarbonés dont il a besoin grâce à leur photosynthèse. En échange, le champignon leur fournit l'eau qu'il retient dans ses tissus, les sels minéraux qu'ils puisent dans le substratum. De plus il les protège contre la dessiccation (**Des abbayes et al., 1978 in Ait Hammou, 2015**).

#### 4.2. Symbiose antagoniste :

On peut en distinguer quatre modalités :

**L'hélotisme:** le champignon règne en maître sur des algues esclaves qu'il exploite. Il ne les tue pas inconsidérément, à la manière d'un parasite, mais au contraire il les ménage, favorise même leur croissance et leur multiplication pour en tirer profit (**Des Abbayes et al., 1978**).

**Le parasitisme:** la théorie du parasitisme pur et simple du champignon sur l'algue s'appuie évidemment sur l'existence des haustoria.

**L'endosaprophytisme :** les algues tuent indirectement par le champignon, souvent par asphyxie et il profiterait de leurs cadavres, à l'intérieur du thalle (**Des Abbayes et al., 1978**).

**L'algo-parasitisme** : il envisage au contraire le parasitisme de l'algue sur le champignon. On invoque le fait que les algues se développent mieux sur milieu additionné de sucre et de peptones que sur milieu purement minéral, ce qui laisse supposer que, dans le thalle des lichens, elles se nourrissent également des matières organiques du substratum par l'intermédiaire des hyphes de champignon, qui est le seul en large contact avec le substratum. A l'intérieur du thalle les deux constituants se livrent une lutte sans trêve dans laquelle aucun des adversaires n'arrive à supplanter l'autre et il en résulte un état d'équilibre (**Des Abbayes et al., 1978**).

### 4.3. Réactions réciproques des symbiotes :

A l'intérieur du thalle lichénique, les rapports entre l'algue et le champignon présentent différents degrés d'intimité . L'étude anatomique des thalles homéomères montre que l'action prépondérante dans la morphogenèse du thalle revient surtout à l'algue, à tel point que la morphologie d'un *Collema* ne diffère pas sensiblement de celle d'une Cyanophycée *Nostoc*. Alors que , chez les espèces hétéromères, la morphologie et la structure sont avant tout commandées par le champignon (**Des Abbayes et al., 1978**).

### ❖ Interaction entre les partenaires lichéniques

L'association de champignons et d'algues (ou de cyanobactéries) sa donne des structures végétales appelés les lichens vivant en symbiose vraie, chaque constituant ne pouvant vivre sans les autres. L'union de ces composants donne cette biomorphose due à l'interaction des deux composants. Chaque espèce de lichens est caractérisée par un champignon spécifique ne se rencontrant que dans ce lichen, ainsi que par au moins une espèce d'algues d'un genre bien défini. Mais cette même espèce d'algues peut se rencontrer chez différentes espèces de lichens (**Tievant, 2001**).

Selon **Legac et al., (2006)**, La proximité entre les partenaires est variable, chez certains les hyphes rampent à la surface des cellules assimilatrices, elles envoient de courtes ramifications vers le photobionte et elles peuvent les entourer étroitement. Dans ces situations, la paroi des hyphes est très fine, permettant ainsi les échanges.

Chez d'autres, les partenaires sont en contact étroit, les hyphes forment une expansion suite à une application à la surface de l'algue, l'appressorium, qui résulte à l'expansion pénètre dans la paroi de l'algue. Elles peuvent également faire un passage dans la cellule et former un

suçoir, l'haustorium. Les protéines de champignon permettent l'adhérence avec la surface du photobionte (lectine), en se fixant sur des composants glucidiques de la paroi.

La photosynthèse effectuée par la photobionte .cette dernière fournit les deux biontes en lipides, glucides et protéines. Lorsque une algue verte, Il transmet à son partenaire entre 20 et 40% des produits de sa photosynthèse, sous forme de polyol (ribitol, sorbitol, érythritol), de glucose si c'est une algue bleue. Mais aussi des vitamines (biotine, thiamine) et des enzymes. Le cyanobionte procure, grâce à ses hétérocystes, de l'ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) issu de la fixation d'azote atmosphérique. Le mycobionte apporte à son partenaire un abri contre le vent et la pluie, un ancrage, une protection contre la dessiccation. Il fait fonction de filtre contre les risques d'insolation et reflète les radiations, s'il est de teinte claire. Il accumule la chaleur s'il est de teinte sombre (**Legac et al., 2006**).

### 1.5 Les lichens en Algérie

Les recherches sur la flore lichénique algérienne restent jusqu'aujourd'hui embryonnaires. Mis à part : Semadi (1989), Djébar et Fradjia (1992), Boutabia (2000), Rahali (2000).

Les études sur les lichens de l'Algérie se sont ralenties pendant un demi-siècle. Une équipe de botaniste installée à l'université d'Alger fait des travaux sur les lichens au début des années cinquante (**Faurel et al., 1950-1954**), puis il y a eu interruption des travaux à nouveau. Ces études ont été reprises vers 1985 sous la direction de Letruit et Déruelle à Paris et Van Haluwyn à Lille. Puis vient l'équipe du Professeur Semadi qui a réalisé plusieurs travaux sur les lichens de la région d'Annaba. Il en est de même pour la région du centre nord du pays étudiée par Rahali et Djellil. Ainsi plusieurs centaines d'espèces lichéniques nouvelles ont été ajoutées à la liste établie par leurs prédécesseurs. Actuellement, le nombre de lichens recensés est de 934 espèces (**Rahali, 2006**).

# 1 Les métabolites secondaires

## 1.1 Définition

Les métabolites secondaires sont des composés non structuraux localisés dans certaines parties des végétaux (Stead *et al.*, 1998), généralement de faibles poids moléculaire, leurs 13 structures très variables dérivent des métabolites primaires (Bruneton, 1999).

## 1.2 Types des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, On recense plusieurs milliers des métabolites (au moins 30000 structures caractérisées) et sont classées selon leur appartenance chimique (Judd *et al.*, 2002). Parmi ces substances on trouve les composés phénoliques, les flavonoïdes, les tanins, les saponines, les huiles essentielles et les alcaloïdes possédant d'intérêts multiples mis à profit dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

### 1.2.1 Les composés phénoliques :

Ce sont des dérivés non azotés dont le ou les cycles aromatiques sont issus de deux grandes voies métaboliques : la voie du shikimate et celle de l'acétate (Bruneton, 1999).

La diversité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine synthétique, et elle augmente souvent avec la participation simultanée du shikimate et l'acétate conduisant à l'élaboration de composés mixtes (flavonoïdes, stilbène, xanthones, etc.). Plusieurs milliers de polyphénols ont été identifiés dans fard plantes et dans les aliments d'origine végétale.

Les composés phénoliques sont classés selon le nombre d'atome de carbone dans le squelette de base, ces structures peuvent être sous forme libres ou liées à l'ester ou hétérosides (Bruneton, 1999).

#### ► Les flavonoïdes :

Le nom flavonoïdes est dérivé du mot (*Flavus*) en latin, qui est jaune. Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires végétaux, où, le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux (Ghestem *et al.*, 2001). Les flavonoïdes sont presque

toujours hydrosolubles, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits, et parfois des feuilles. Tel est le cas des flavonoïdes jaunes (chalcones, aurones, flavonols jaunes), des anthocyanosides rouges, bleus ou violets, Ils sont présents dans toutes les parties des végétales supérieures : racines, tiges, feuilles, pollen, grains, bois, ... etc.

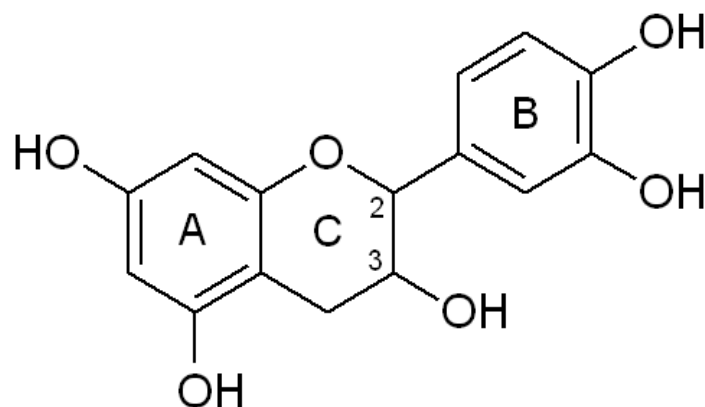


Figure 8 : Structure de base des flavonoïdes (Bruneton, 1999)

### ► Les Tannins :

Les tanins sont des substances d'origine végétale non azotée à structure poly phénoliques, donc soluble dans l'eau. Leur poids moléculaires est compris entre 500 et 3000 (PM). En plus de la réactivité usuelle des composés phénoliques, ils ont la capacité de faire précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines (Bate *et al.*, 1962).

Ils sont localisés dans les feuilles, l'écorce et les fruits de nombreux plants, ils font ainsi partie intégrante de notre alimentation (thé, divers fruits...).

Les tanins sont classés en deux groupes selon leurs structures chimiques.

#### ○ Tanins hydrolysables :

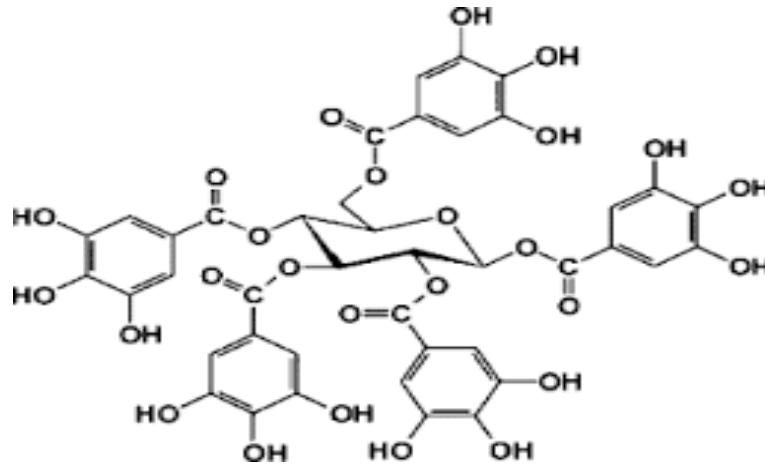
Les tanins hydrolysables ou pyrogalliques donnent à hydrolyse un ose (le glucose) et un acide phénolique, l'acide gallique ou l'acide ellagique. Ce dernier acide est une molécule polycyclique qui se compose de deux cycles benzéniques portant chacun deux fonctions hydroxyles qui sont reliés entre eux par deux fonctions quinoniques portant des cétones.

#### ○ Les tanins galliques

Sont des polymères hétérogènes constitués d'un noyau central-le glucose- et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3,4 ou 6 du glucose) comprenant 1 à n monomères d'acides gallique.

### ○ Les tanins ellagiques

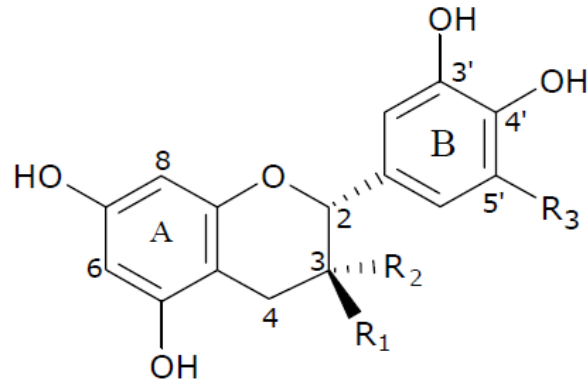
Sont des molécules complexes et rigides, constituées par des liaisons carbone-carbone entre les noyaux benzéniques de l'acide ellagique et une molécule de glucose



*Figure 9 : Structure des tanins hydrolysables (Bate et al., 1962)*

### ○ Tanins non hydrolysables ou tanins condensées :

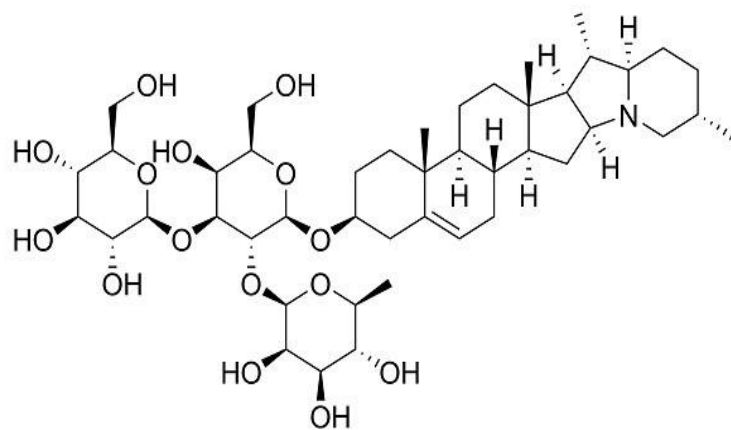
Ils sont des polymères formés par la condensation d'unités de flavonoïdes reliées par des liaisons fortes carbone-carbone, le plus souvent 4-8 ou 4-6 non hydrolysable. Ils sont également appelés proanthocyanidine de couleur rouge par rupture de la liaison interflavane en milieu acide et en conditions d'oxydation



**Figure 10 : Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés (Bate et al., 1962).**

### Les saponines :

Les saponines (du latin « *sapo* » signifiant savon) sont des tensio-actifs très répandus chez les végétaux, ce sont des glycosides terpéniques. Ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes comme les savons.



**Figure 11 : Structures chimiques des saponines**  
(<http://fr.nextews.com/954a1681/>)

Les saponines peuvent être classées en deux groupes selon la nature de leur génine :

- **Saponines triterpéniques:**

Ce sont les plus nombreux, environ 120 ; ils sont essentiellement présents chez les angiospermes dicotylédones ; la structure de leur aglycone en C<sub>30</sub> étant le plus souvent pentacyclique.

- **Saponines stéroïdiques:**

Ils sont surtout représentés chez les angiospermes monocotylédones. La structure de leur aglycone en C<sub>27</sub> dérive uniquement de celle du stérane.

### 1.2.2 Alcaloïdes :

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine naturelle, le plus souvent végétales, azotés, basiques, douées, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées (**Paolini et al., 2003**).

Les alcaloïdes sont des composés présents essentiellement chez les Angiospermes (peu nombreux chez les Monocotylédones et très répandus chez les Dicotylédones). Ils sont exceptionnels chez les bactéries, assez rares chez les champignons, existent chez les animaux et se trouvent également chez les organismes marins (les éponges) (**Bruneton, 1999**).

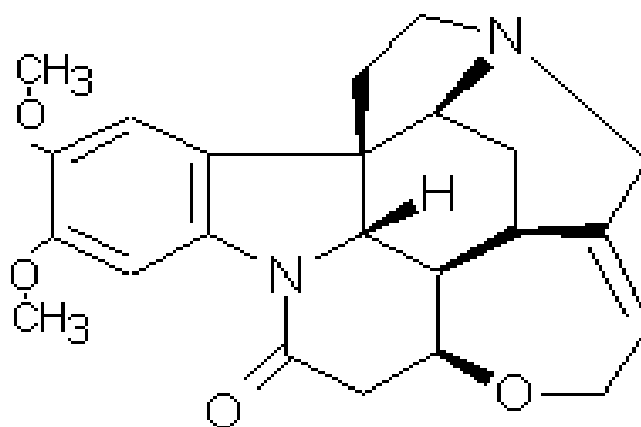


Figure 12 : .Structure de base d'alcaloïdes (**Hess, 2002**).

Par estimation, il y a plus de 10 000 alcaloïdes différents déjà isolés (ou détectés) à partir de sources végétales, animales ou de micro-organismes. Proposer une classification pour les alcaloïdes est une tâche difficile, en raison du grand nombre de composés connus et surtout à cause de la diversité structurale.

L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Une façon raisonnable

est alors de classer les alcaloïdes en groupes, selon leur précurseur biosynthétique. Il existe cependant un grand nombre d'alcaloïdes qui n'ont pas forcément un acide aminé comme précurseur. Dans ces cas-là, l'atome d'azote est incorporé à un stade avancé de la biosynthèse par réactions déamination sur des intermédiaires aldéhydes ou cétones (**Hess, 2002**).

### 1.3 Intérêt Thérapeutique

Toutes les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. Ces composés diffèrent en fonction des espèces.

Si leur rôle écologique reste encore à préciser, largement utilisés par l'homme dans de nombreuses préparations thérapeutiques. La pharmacognosie est étymologiquement la connaissance (*gnosis*) des poisons (*pharmacion*) d'origine naturelle. Ces substances toxiques possèdent, parfois à faible dose, des propriétés médicamenteuses et peuvent être utilisées à des fins thérapeutiques. Les molécules naturelles responsables de ces activités servent aujourd'hui de modèle à la créativité des chimistes pour améliorer les activités ou d'en diminuer les effets secondaires et la toxicité.

La diversité des espèces utilisées et des métabolites secondaires déjà isolés pousse la découverte de nouvelles espèces. On considère effectivement que, jusqu'à ce jour, moins de 10 % des espèces de végétaux supérieurs qui peuplent actuellement la planète ont été explorées pour leurs propriétés chimiques et biologiques (**Guignard, 1996**).

Les fonctions physiologiques précises des métabolites secondaires sont très discutées. On leur attribue des propriétés d'attraction de pollinisateur, de défense contre des agents pathogènes, des prédateurs ou encore contre des facteurs de contrainte liées à leur environnement direct : UV, température ... (**Bell, 1980**). Plus récemment, les métabolites secondaires ont été envisagés comme des molécules transductrices de signaux cellulaires. Ainsi, l'acide salicylique serait le messager impliqué dans le processus de résistance systémique acquise chez le tabac et le concombre, processus selon lequel une feuille infectée par un agent pathogène transmet un signal moléculaire à la feuille saine qui active, en réponse, des mécanismes de défense lui permettant de résister à l'infection (**Malamy et al., 1990**).

L'homme les utilise entre autres comme arômes, colorants, additifs alimentaires et commématières actives dans de nombreux médicaments.

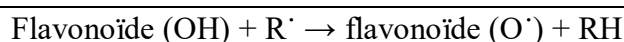
Chaque type de ces substances actifs a des applications thérapeutiques, sont les suivants :

### 1.3.1 Les composés phénoliques :

Ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, anti-oxydants et anti-radicalaires, antimicrobiens.

#### ► Les flavonoïdes :

Sont doués des vertus thérapeutiques dans diverses pathologies et présentent plusieurs activités biologiques, dont l'activité la mieux décrite est leur activité antioxydante (**Borset al, 1997 ; Montoroet al, 2005**) et leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles OH·, anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>-</sup> et radicaux peroxy lipidiques, selon la réaction suivante :



Les flavonoïdes ont une action sur les vaisseaux sanguins sous forme d'activité vitaminique « P » (**Beretz et Cazenave, 1991**), qui intervient dans le maintien d'une perméabilité vasculaire normale (**Youdimet al, 2002 ; Shihet al, 2004**). Ils exercent aussi une activité antidiabétique, comme la myricétine qui présente des effets hypoglycémiant et hypotryglycéridémiant chez les animaux diabétiques (**Ong et Khoo, 1997 ; Ong et Khoo, 2000**).

#### Propriétés pharmacologiques des flavonoïdes :

La principale activité pharmacologique attribuée aux flavonoïdes est vitaminique P, c'est-à-dire renforcé l'activité de l'acide ascorbique (vitamine C). Nombreux des cliniciens admettent leurs effets bénéfiques dans diverse pathologies circulaires (**Bruneton, 1987**).

Les drogues à flavonoïdes sont diététiques et antispasmodiques (**Makambo, 2007**). Les flavonoïdes sont très importants en pharmacologie à cause de leur propriété anticancéreuse (**Luka, 2002**).

#### ► Les tanins :

Selon (**Kombe, 2007**) les propriétés pharmacologiques des tanins sont : Antiseptique, Anti diarrhée, Antimicrobienne et antifongique, Astringente, Antibiotique, effet vason contracteur superficiel.

#### ► Les saponines :

## Chapitre II : Les métabolites secondaires

---

Elles facilitent l'absorption d'autres substances par le muqueuse de l'intestin mais elles ne sont pas absorbées, elles – mêmes. Ce sont des acides insolubles dans l'eau mais solubles dans les alcalis (**Guinter, 1983**).

Les saponines possèdent des propriétés pharmacologiques suivantes :

- ✓ Anti inflammatoire et anti rhumatismales.
- ✓ Anti microbienne et anti fongique.
- ✓ Cicatrisante, hémolytique.
- ✓ Expectorante et anti tumeur (**Makambo, 2007 ; Babady, 1986**).

### ► Les quinones :

Propriétés pharmacologiques :

- L'anthraquinone constitue le noyau de base de la plupart des médicaments purgatifs et laxatifs.
- Le naphthol quinone est un antimicrobien qui agit contre les bactéries gram – positifs. Il est également fongicide (**Kombe, 2007**).
- Les quinones trouveraient leurs importances pharmacologiques dans leur grand pouvoir énergétique et leur rôle de vecteur des vitamines liposoluble (vitamine A, D, E, K).

### 1.3.2 Les alcaloïdes :

Appelés alcalis végétaux ont souvent d'intérêt à la médecine, car leur action sur l'organisme humain est d'une force incomparable ; ils agissant à dose infinitésimale et d'une façon très précise sur une fonction de l'organisme. Au goût, les alcaloïdes sont souvent amers. Dans les cellules, sont localisés dans les vacuoles combinées à des acides ou à des tanins (**Pousset, 1989**).

D'un point de vue biologique, les alcaloïdes présentent diverses activités à faible dose, analgésiques (morphine), anesthésiques locaux (cocaïne), antibactérienne, anticancéreuse... (**Bruneton, 2009; Hocquemilleret al., 1982**).

La plupart des alcaloïdes connus, environ 12.000, ont été exploités en tant que médicaments, des stimulants, des narcotiques, et des poisons. Contrairement à la plupart des

## Chapitre II : Les métabolites secondaires

---

autres types de métabolites secondaires, les nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques uniques (**Ziegler et Facchini, 2008**).

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés :

- ✓ Au niveau du système nerveux central, qu'ils soient antidépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychnine, caféine)
- ✓ Au niveau du système nerveux autonome : sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytiques, parasymphatomimétiques, anticholinergiques et ganglioplégiques.

On notera aussi l'existence de curarisants, d'anesthésiques locaux, d'antifibrillants, d'antitumoraux, et d'antipaludiques (**Bruneton, 199**).

Beaucoup d'alcaloïdes possèdent des propriétés antibiotiques et sont actifs contre les infections microbiennes (**Yang et al., 2010; Hu et al., 2014**).

Les propriétés biologiques de ces composants, aussi variées que leurs structures, continuent à être bénéfiques dans les traitements de différentes maladies ou des dysfonctionnements de l'organisme humain. Les alcaloïdes constituent une classe de produits naturels présentant une grande diversité structurale. Parmi lesquels les pyrrolizidines et les tropanes sont les plus importants. Les pyrrolizidines, très répandues dans la nature, sont présents dans les plantes qui font partie des familles botaniques Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae et Orchidaceae.

Aussi, comme alcaloïdes naturelles, La cocaïne est un alcaloïde peu abondant présent dans les *Erythroxylum*. La source la plus importante de ce composé est l'*Erythroxylum coca*, utilisé depuis l'antiquité comme anesthésique local, dans le domaine de l'odontologie. Aujourd'hui, au cours des interventions chirurgicales des yeux, de l'appareil auditif, du nez et de la gorge, la cocaïne est encore largement utilisée et en raison de ses propriétés neurotoxiques elle a été remplacée par d'autres drogues moins toxiques.

Associée à l'héroïne, elle est également efficace pour soulager la douleur chez les patients atteints d'un cancer, en phase terminale. La lobéline, extraite de la *Lobelia inflata*, est utilisée dans les préparations pour lutter contre le tabagisme. L'extrait brut de la plante est largement employé dans le traitement de l'asthme et de la bronchite. La spartéine, isolée de *Cytisus scoparius*, est très toxique mais le sel de sulfate correspondant est utilisé en médecine comme agent stimulant du rythme cardiaque. Elle est également utilisée pour provoquer

la contraction de l'utérus au cours de l'accouchement. L'éphédrine, isolée d'*Ephedrasinica*, est utilisée avec succès dans le traitement de l'asthme bronchique et également comme médicament analgésique et anti-allergique. La papavérine, isolée de *Papaversomniferuma* une activité vasodilatatrice et des propriétés hypnotiques et analgésiques. La berbérine, isolée de *Berberisvulgaris*, a des propriétés anti-inflammatoires et antimicrobiennes. La morphine, isolée de la plante de la famille des opiacées, le *Papaver somnifère*, reste encore à ce jour un des analgésiques les plus efficaces utilisés en médecine. Enfin, la galanthamine agit en tant qu'inhibiteur compétitif de la cholinestérase, et de ce fait utile dans le traitement de la maladie d'alzheimer.

### 1.3.3 Les terpénoïdes :

Les terpénoïdes ont des activités biologiques et pharmacologiques variées : anti-inflammatoire, antivirus, analgésiques, antibactériennes et antifongiques (**Bisoliet al., 2008 ; Bruneton, 2002**).

## 1.4 Conditions de production

La photosynthèse des végétaux ne produit pas directement les métabolites secondaires (MII). Ces derniers sont synthétisés à partir des métabolites primaires et résultent des réactions chimiques ultérieures, dans une partie de la plante et sont stockés dans une autre (**Ravenet al., 2000**). Avec une structure chimique parfois complexe, ils sont très différents selon les espèces et s'accumulent le plus souvent en faible quantité. Ces molécules bioactives sont produites à différents endroits de la cellule dans des parties spécifiques de la plante en fonction du stade de développement (par exemple durant le développement de la plantule, de la fleur, du fruit, de la graine, ou de la racine). Généralement, leur rôle est en lien avec sa localisation dans la plante (**Pathaket al. 1962 ; Zobel et Brown, 1990**).

Aujourd'hui, les produits d'origine végétale passe à travers le monde et la production de métabolites secondaires par l'intermédiaire de cultures aux champs est parfois insuffisante à cause des rendements limités (maladies, ravageurs, problèmes climatiques, voire difficultés géopolitiques). Par ailleurs, beaucoup de plantes intéressantes ne peuvent être cultivées que dans des conditions pédo-climatiques particulières, d'où la nécessité d'importer ces produits, à un coût parfois élevé. De nouvelles voies de production sont portées en considérations, basées sur les techniques de cultures *in vitro* et à la production en bioréacteur (**Boitel-Conti et al., 1995 ; Bourgaud et al., 2001 ; Gontier, 2001**). Les organes, cellules ou tissus végétaux

ainsi produits sont ensuite soumis à diverses méthodologies d'extraction en vue d'obtenir les métabolites secondaires recherchés.

Ces techniques sont destructives et nécessitent de régénérer la biomasse pour assurer de nouvelles productions. Afin de diminuer le surcoût engendré par la destruction de la biomasse, des scientifiques ont développé des techniques permettant de faire libérer les métabolites secondaires dans le milieu de culture sans perte de viabilité du matériel végétal.

En culture *in vitro* (i.e. en bioréacteur), la synthèse des métabolites secondaires peut être stimulée par plusieurs paramètres : facteurs environnementaux, utilisation de précurseurs des molécules ciblées, mise en œuvre d'éliciteurs et transformation génétique du végétal pour augmenter les flux au sein des voies de biosynthèse des composés recherchés.

La majorité des végétaux, lorsqu'ils subissent une attaque par des agents pathogènes comme les insectes, les champignons produisent des métabolites secondaires toxiques pour assurer leur défense. Cette réaction de défense des plantes fait intervenir des molécules, appelées éliciteurs, qui jouent un rôle d'activateur de gènes de défenses (**Somssich et Hahlbrock, 1998**).

Les facteurs environnementaux aussi comme la lumière, la température, le rayonnement UVB, l'ozone et le CO<sub>2</sub> ont une influence directe ou indirecte sur l'élaboration des métabolites secondaires. Ces aspects ont été illustrés par (**Demeyer et Dejaegere, 1997 ; Sallaset al., 2001 ; Teglberg et Julkumen-Tiitto, 2001**) qui ont travaillé sur *Salixmyrsinifolia*, *Pinussylvestris* ou encore *Datura stramonium*. A titre d'exemple, la teneur en composés phénoliques dans les aiguilles de *Pinussylvestris* L. est ainsi augmentée de 25% sous l'effet d'une concentration élevée de CO<sub>2</sub> (**Sallaset al., 2001**).

## 2 Métabolites Secondaires Des Lichens

Jusqu'à maintenant on compte plus de 700 métabolites secondaires, dont la structure a été élucidée, sont connus chez les lichens (**Huneck et Yoshimura, 1996**). Le statut symbiotique des lichens fait en sorte que des composés uniques y sont métabolisés. Ces composés sont souvent apparentés aux produits biosynthétisés par les mycètes non symbiotiques et la majorité des composés secondaires retrouvés chez les lichens proviennent de la voie biosynthétique des acétogénines (**Fahsel, 1994**).

Cette famille représente les depsides, depsidones, dibenzofuranes, acides usniques et depsones, retrouvés spécifiquement chez ces symbiotes (organisme symbiotique) (**Culberson, 1969; Fahselt, 1981; Culberson et Ahmadjian, 1980; Fahselt, 1994**).

La production de certains composés, comme les depsides et les depsidones, nécessite que le mycosymbiote, soit en présence du photosymbiote, tel que démontré par des expériences *in vitro* (**Fahselt, 1981; Culberson et Ahmadjian, 1980; Fahselt, 1994**). La majeure partie des molécules serait produite par le mycosymbiote, tel que mis en évidence par la mise en culture d'hyphes symbiotiques isolés chez les lichens (**Fahselt, 1994**).

Les produits lichéniques peuvent être divisés en deux groupes, soit les métabolites primaires elles sont essentielles à la survie et la reproduction qui sont biosynthétisés par l'algue et le partenaire fongique sont dits intracellulaires, soit secondaires sont dits extracellulaires, comme ils se retrouvent à la surface de l'hyphes du champignon. Les composés secondaires ne sont pas essentiels à la survie de l'organisme, mais ils y jouent des rôles spécifiques. Les métabolites issus des lichens sont classés selon leur voie biosynthétique, cette classification a été proposée par **Asahina et Shibata** en **1971**, puis a été améliorée par **Culberson et Elix** en **1996**. (**Culberson et Elix, 1989 ; Elix, 1996**).

### 2.1 Voies de biogenèse des métabolites secondaires

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

## Chapitre II : Les métabolites secondaires

La figure13 récapitule ces différentes voies de biosynthèse pour les composés secondaires lichéniques

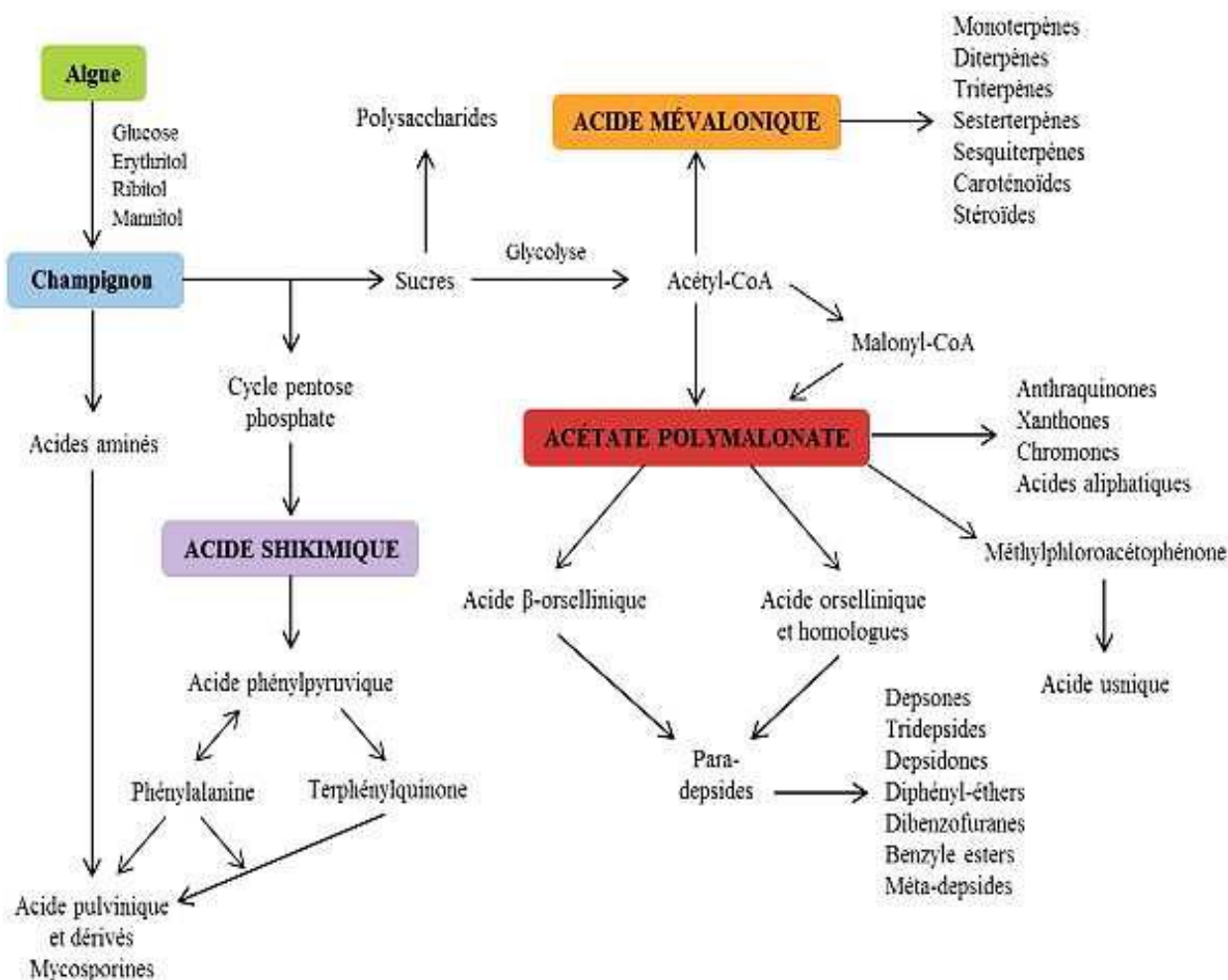


Figure 13 : Les différentes voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques (Stocker Wörgötter et al., 2013)

Les lichens produisent une grande variété de métabolites secondaires de type phénolique qui Proviennent pour la très grande majorité de la voie biosynthétique de l'acétate polymalonate. Les voies de l'acide shikimique et de l'acide mévalonique sont aussi des voies biosynthétiques par lesquelles les grands groupes de produits lichéniques sont produits.

Les différents types de composés lichéniques qui dérivent de ces trois voies métaboliques sont présentés au tableau 1, en plus du nombre approximatif de composés rapportés pour chaque type. 82 % des métabolites connus font partie de la voie des acétates polymalonates

## Chapitre II : Les métabolites secondaires

qui englobent la majorité des types de composés lichéniques. En effet, dix des quatorze types rapportés sont associés à cette voie. Parmi ces types, les depsides, depsidones et diphényléthers sont les principaux produits naturels caractéristiques des lichens avec plus de la moitié du nombre de métabolites connus. Les terpènes et les stéroïdes qui tirent leur origine biosynthétique de la voie des mévalonates et les composés associés à la voie de l'acide shikimique représentent respectivement seulement 16 % et 2 % des métabolites connus.

**Tableau 1 : Classes des métabolites secondaires dans les lichens (Stocker-Wörgötter *et al.*, 2013)**

Voie de Biosynthèse	Type de composé	Nombre de Composés	
<i>Voie des acétates</i>	Acides aliphatiques, esters et dérivés	56	
	Monoaromatique phénoliques	32	
	Depsides, tridepsides et esters benzyliques	207	
	Depsidones et diphényléthers	131	
	Depsidones	8	
	Dibenzofuranes, acide usnique et dérivés	29	
	<i>Polymalonates</i>	Anthraquinones et dérivés	52
	Chromones et chromanes	13	
	Naphtoquinones et bis naphtoquinones	10	
	Xanthonnes et bis-xanthonnes	78	
<i>Voie des Mévalonates</i>	Di-, sesquiter-, et tri-terpènes	88	
	Stéroïdes	33	
<i>Voie de l'acide Shikimique</i>	Terphénylquinones	2	
	Dérivés de l'acide pulvinique	13	

### 1 Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme végétal selon diverses techniques. Dans les domaines de la chimie des substances naturelles et de la chimie thérapeutique, L'extraction des métabolites secondaires ciblent est une phase primordiale (**Chemat, 2011**).

Le choix de la méthode d'extraction est basé sur des données préalables sur les caractéristiques physicochimiques des métabolites à extraire. Mais, il est d'usage d'appliquer différentes procédés afin de savoir le plus adéquat (**Chemat, 2011**).

Les méthodes de prétraitements de la biomasse dans les bioraffineries peuvent être physiques, chimiques, physicochimiques ou encore biologiques. Pour des raisons économiques, il est préférable d'employer des méthodes ne requérant pas l'utilisation de petites tailles de particules, nécessitant un broyage et un tamisage, ou de nombreux produits chimiques, car les déchets produits doivent être traités. Les conditions d'opérations doivent également être contrôlées pour éviter l'utilisation de hautes pressions ou températures (**Behera et al., 2014**).

#### 1.1 Méthodes d'extraction chimique

##### 1.1.1 Extractions par solvants

Les méthodes conventionnelles d'extraction des métabolites se basent le plus souvent sur l'affinité des molécules pour différents solvants et sur l'utilisation de chauffage et/ou d'agitation (**Azmir et al., 2013**).

##### 1.1.1.1 Extraction par soxhlet :

L'extraction en Soxhlet date de 1879 (**Soxhlet, 1879**) et représente la méthode de référence pour les extractions de métabolites des plantes (ASTM D1105-96 « Extractive-free wood » notamment).

Un extracteur soxhlet est une pièce de verrerie utilisée pour extraire les molécules aromatiques de la plante. Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvants passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'adducteur,

## Chapitre III : Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

faisant ainsi macérer les résidus dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés soluble. La taille du corps en verre étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives pour récupérer une quantité suffisante d'extrait (El Kalamouni, 2010).

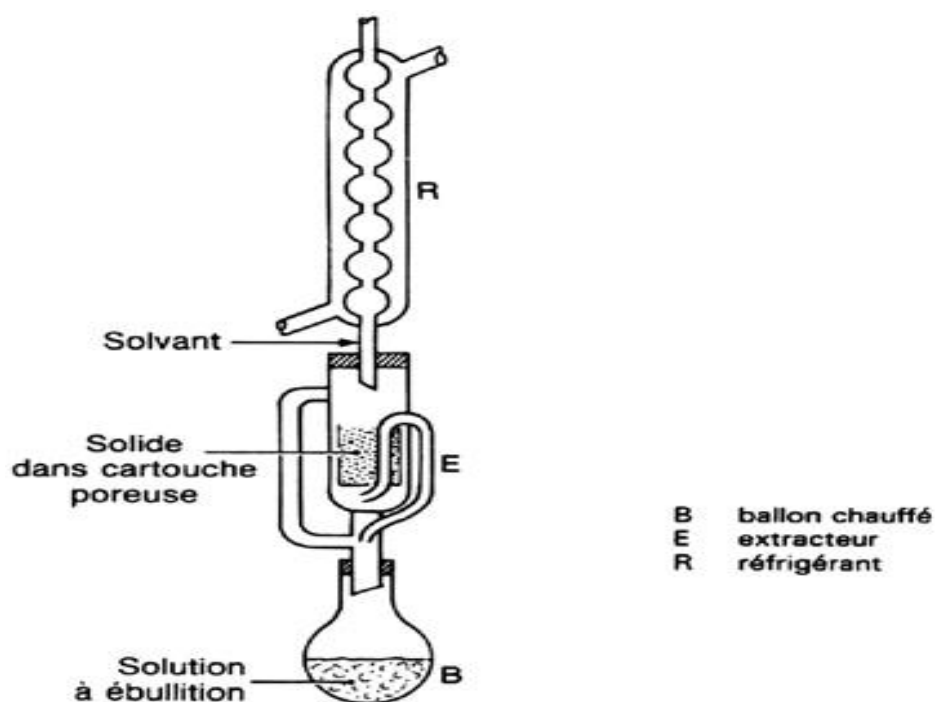


Figure 14 : Extracteur de Soxhlet (Wikipédia, 2014)

### 1.1.1.2 Extraction par macération :

La macération est une méthode qui consiste à laisser la poudre de la plante en contact prolongé avec un solvant (Lagnica, 2005). Le choix de solvant est orienté par les caractéristiques chimiques spécifiques pour chaque famille de métabolites secondaires (Rispaïl et al., 2005). Généralement les solvants les plus utilisés sont l'éthanol, le méthanol ou même l'eau pour l'extraction des composés polaires et le dichlorométhane pour l'extraction des composés non polaires (Rispaïl et al., 2005).

## Chapitre III : Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

Le méthanol et l'éthanol possèdent l'avantage d'être plus facilement éliminés, dans le cas où l'on veut concentrer l'extrait sous vide. L'utilisation de l'eau est intéressante si l'on veut fractionner la solution obtenue.

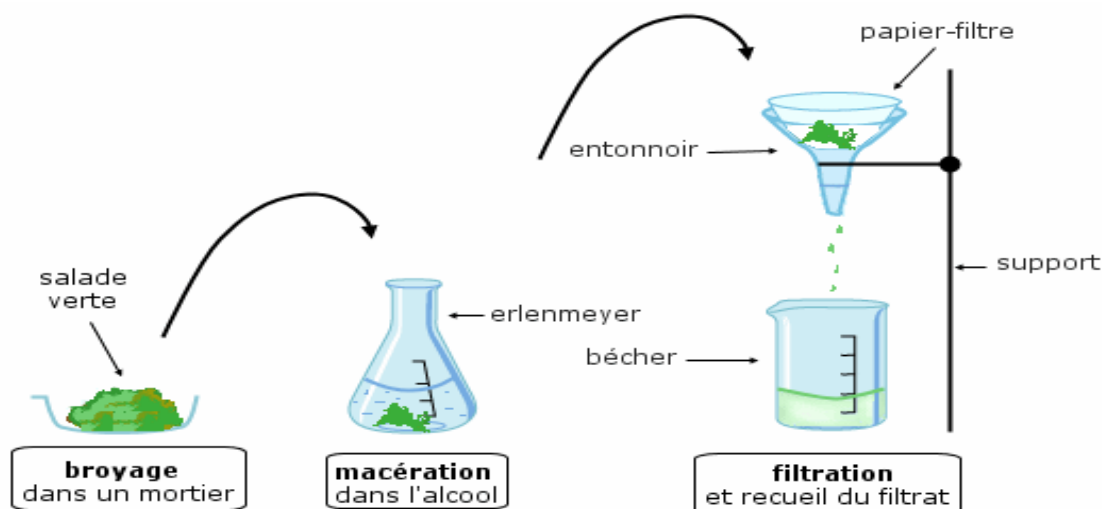


Figure 15 : Extraction par macération (Rispaïl et al., 2005)

### 1.1.1.3 L'hydro-distillation :

Est une autre méthode conventionnelle d'extraction. Il s'agit de la troisième étape d'extraction de la méthode ASTM D1105-96. Comme son nom l'indique, l'extraction se fait sans solvant organique mais avec de l'eau liquide, avec de la vapeur d'eau ou avec un mélange d'eau liquide et de vapeur d'eau (Vankar, 2004). En fonction de la méthode utilisée, la biomasse est placée dans une quantité d'eau suffisante qui est ensuite portée à ébullition, de la vapeur d'eau pouvant être ajoutée. À l'aide d'un séparateur, l'eau et les extraits sont ensuite séparés (Silva et al., 2005).

L'inconvénient de cette méthode étant la perte des composés volatils ou thermolabiles.

L'hydro-distillation est la méthode la plus employée pour l'extraction des huiles essentielles (Mohammdi, 2004). Le principe de l'hydro-distillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. Lors de la distillation des huiles essentielles, plusieurs phénomènes sont à la base d'échange de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètres sur la qualité et le rendement de la production (Hajji et al., 1985).

#### A. Hydrodistillation assistée par ultrason :

## Chapitre III : Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

Il s'agit dans ce cas précis d'un traitement de la plante «pré» ou «post» opératoire. En effet, la structure des parois des plantes et les tissus cellulaires se désorganisent, sous l'effet des ondes Ultrason et les micros cavitations générées par les ultrasons (**Romdhane, 1999**).

Ainsi, ces changements favorisent la diffusion de l'eau dans les tissus cellulaires, ce qui peut également augmenter la cinétique d'extraction des molécules aromatiques des HEs (**Romdhane, 1999**).

### B. Hydrodistillation assistée par micro-onde :

C'est une technique récente développée dans le but d'extraire des produits naturels comparables aux HEs et aux extraits aromatiques. Dans cette méthode, la plante est chauffée par un rayonnement micro-ondes dans une enceinte dont la pression est réduite de façon séquentielle. Les molécules volatiles sont entraînées dans le mélange azéotropique formé avec la vapeur d'eau propre à la plante traitée (**Marrouf et Tromblin, 2009**). Ce chauffage, en vaporisant l'eau contenue dans les glandes oléifères, crée à l'intérieur de ces dernières une pression qui brise les parois végétales et libère ainsi le contenu en huile (**Marrouf et Tromblin, 2009**).

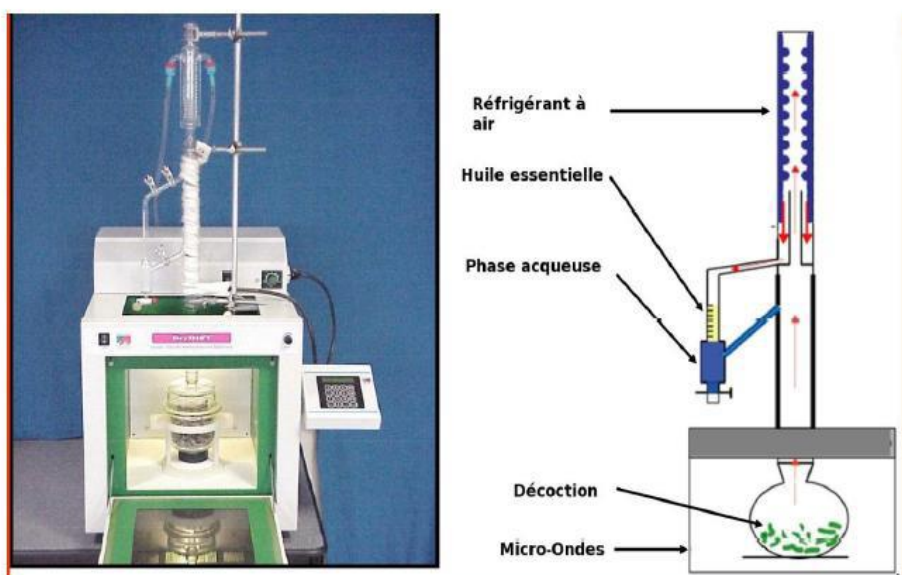


Figure 16 : montage hydro-distillation par micro-onde (Nait Achour, 2012).

### C. Hydrodistillation sous pression

C'est une technique de choix pour les essences difficilement distillables (**Bocchio, 1985**). On traite ainsi certaines matières premières dont les constituants ne peuvent être entraînés par la vapeur à la pression atmosphérique du fait de leur masse moléculaire élevée, par exemple le santal, le girofle, les rhizomes de vétiver, de gingembre ou encore d'iris (**Garnero, 1985 ; Tournaire, 1980**). Bien que le procédé sous pression conduise à une amélioration du rapport d'entraînement, donc, à des économies d'énergie (**Bocchio et Garnero, 1985**). L'influence d'une température élevée (Supérieure à 100°C) sur la qualité de l'huile donne lieu à certains artefacts. De plus, les prix et les contraintes des équipements nécessaires contribuent à freiner l'utilisation du procédé (**Tournaire, 1980**).

L'inconvénient majeur de ces méthodes est qu'elles nécessitent généralement de broyer finement la biomasse à extraire pour augmenter la surface de contact et faciliter l'action des solvants. De plus, ces méthodes nécessitent des temps d'extraction souvent longs et de grandes quantités de solvants qu'il faut ensuite traiter, ceux-ci pouvant être toxiques pour l'homme et l'environnement (**Gil-Chavez et al., 2013**). Enfin, le choix des solvants utilisés est fonction des extraits désirés et de leur polarité (**Azmir et al., 2013**).

### 1.2 Méthodes d'extraction physique

#### 1.2.1 Techniques non-conventionnelles

Pour pallier aux inconvénients des méthodes conventionnelles, comme les temps d'extraction longs et les quantités importantes de solvants utilisées, de nouvelles méthodes ont été développées. Parmi celles-ci, quelques méthodes semblent plus prometteuses comme les extractions assistées par enzymes, par micro-ondes, par fluides supercritiques, par liquide pressurisés, par champs électriques pulsés ou encore par ultrasons. Lorsque ces méthodes utilisent peu ou pas d'agents chimiques toxiques, des ressources renouvelables ou encore lorsqu'elles présentent une faible demande énergétique, elles peuvent être considérées comme des technologies « verte » (**Azmir et al., 2013**).

##### 1.2.1.1 Extractions assistée par enzymes (EAE) :

## Chapitre III : Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

---

Les extractibles pouvant se retrouver dans la cellule ou dans la matrice lignine-hémicellulosecellulose de la plante, les solvants ne sont pas toujours capables d'aller chercher l'ensemble de ces métabolites. La digestion enzymatique de la lignocellulose permet la libération du contenu intracellulaire dans le milieu et facilite l'action ultérieure des solvants (**Azmir et al., 2013**).

Deux méthodes principales sont utilisées, l'extraction aqueuse assistée par enzymes et la pression à froid assistée par enzymes (**Latif et Anwar, 2009**).

L'efficacité de ces méthodes dépend de l'enzyme utilisée, de sa concentration, de la taille des particules à traiter ainsi que du temps d'exposition entre l'enzyme et la biomasse (**Niranjan et Hanmoungjai, 2004**).

Ainsi, Wang et coll. (2012) ont démontré que la combinaison d'un prétraitement biologique et d'une extraction à l'eau chaude permet d'augmenter les rendements jusqu'à 2,7 fois par rapport à l'extraction à l'eau chaude seule. Dans un premier temps, les enzymes produites par les champignons vont hydrolyser la matrice lignocellulosique. Les composés solubles sont ensuite extraits lors de l'extraction à l'eau chaude.

Les méthodes EAE sont dites « vertes ». Elles permettent de meilleurs rendements que les méthodes n'utilisant que des produits chimiques, avec des réductions de temps, de quantités de solvants et/ou d'énergie (**Azmir et al., 2013**).

L'utilisation d'enzyme permet également d'hydrolyser la cellulose sans former d'inhibiteurs de fermentation (**Sindhu et al., 2016** ).

Cependant, le prix des enzymes est élevé, variant en fonction de la souche de microorganisme utilisée et du nombre d'unité enzymatique. Ainsi, chez Sigma Aldrich, une bouteille de cellulases en poudre d'*Aspergillus niger* de 5 000 unités enzymatiques coûte 50 \$ canadiens. Pour la même quantité, le prix est de 97,30 \$ canadiens pour des cellulases issues de *Trichoderma reesei* ATCC 26921.

### 1.2.1.2 Extraction par champs électrique pulsé (CEP) :

L'extraction par champ électrique pulsé repose sur la destruction de la paroi cellulaire pour améliorer l'extraction par solvant suivant l'exposition au champ électrique. La biomasse est exposée à un champ électrique qui vient briser les interactions entre les molécules ce qui augmente la perméabilité de la membrane cellulaire (**Bryant et Wolfe, 1987**).

## Chapitre III : Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

---

L'efficacité de ce traitement dépend donc, entre autre, de la force du champ électrique appliqué, de la température et de la biomasse à extraire (**El-Belghiti, 2005**). La CEP permet la lyse de la paroi cellulaire améliorant ainsi l'extraction tout en réduisant les temps d'opération (**Toepfl et al., 2006**). De plus, cette méthode permet de maintenir une température relativement faible, ce qui limite la dégradation de composé thermolabiles (**Ade-Omowaye et al., 2001**).

### 1.2.1.3 Extractions par fluides supercritiques (SFE) :

L'extraction par fluides supercritiques est notamment utilisée pour l'obtention de café sans caféine (**Zosel, 1964 ; Ndiomu et Simpson, 1988**). Un fluide supercritique est obtenu lorsqu'un produit est soumis à des conditions de température et de pression au-delà de son point critique (**Inczedy et al., 1998**). Au-delà de ce point, l'état gazeux n'est plus distingué de l'état liquide, ce qui fait que le fluide supercritique possède les propriétés d'un gaz (diffusion, viscosité et surface de tension) et celle d'un liquide (densité et pouvoir de solvation). Un fluide supercritique permet l'extraction de métabolites dans des temps plus courts et avec des rendements plus élevés que les méthodes conventionnelles (**Sihvonon et al., 1999**).

L'utilisation de dioxyde de carbone pour la SFE permet de travailler à des températures proches de la température ambiante, ce qui limite la dégradation des extraits mais n'est pas idéale pour tout type de composés comme ceux ayant des fins pharmaceutiques (**Azmir et al., 2013**). Cette méthode peut être hautement sélective et peut permettre l'obtention de composés de haute pureté. Ceux-ci peuvent, par la suite, être vendus à l'industrie pharmaceutique, cosmétique ou agroalimentaire (**Lang et Wai, 2001**).

Cependant, les coûts d'investissements sont relativement élevés par rapport à d'autres méthodes ce qui peut être un frein à son utilisation en bioraffinerie (**Ajila et al., 2010; Segneanu et al., 2013**). De plus, l'utilisation de fluides supercritiques nécessite des conditions de réalisation plus dangereuse, en raison des pressions d'opération élevées (**Ajila et al., 2010; Reverchon et De Marco, 2006; Wang et Weller, 2006**).

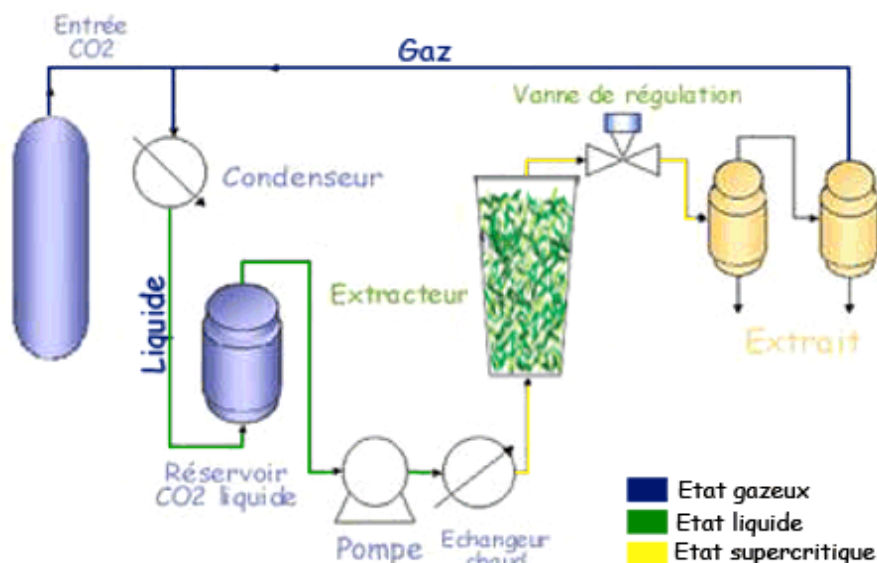


Figure 17 : Extraction au CO<sub>2</sub> supercritique (Mohammedi, 2004).

### 1.2.1.4 Extraction par fluides pressurisés (PFE) et explosion à la vapeur :

L'extraction par fluides pressurisés est une méthode récente, 1996, aussi connue sous le nom d'extraction accélérée par fluide, extraction augmentée par solvant ou extraction par solvant à haute pression (Nieto et al., 2010).

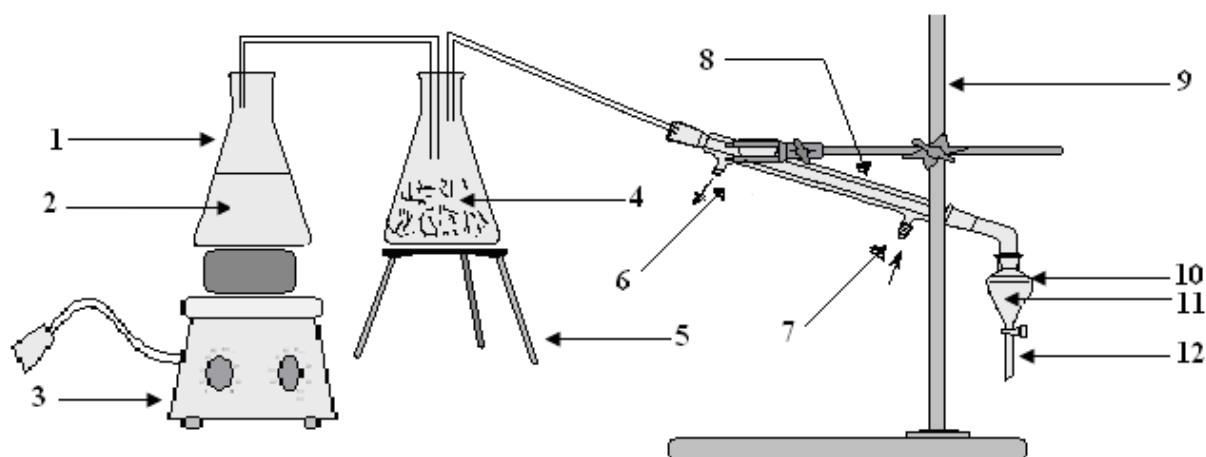
L'extraction à haute pression permet de maintenir le solvant sous forme liquide, au-delà de son point d'ébullition, et facilite l'extraction des molécules (Azmir et al., 2013). Cette méthode permet de réduire les temps d'extraction et la quantité de solvant utilisée (Ajila et al., 2010). Concernant les extractions de composés polaires, la PFE est une alternative à la SFE (Kaufmann et Christen, 2002). Les températures élevées d'opération augmente la solubilité des molécules et donc les rendements, mais peuvent dégrader les molécules thermolabiles (Ajila et al., 2010 ; Azmir et al., 2013).

L'explosion à la vapeur de biomasse lignocellulosique est un procédé physico-chimique de plus en plus utilisé. La biomasse est exposée à de la vapeur à haute température et à haute pression pendant quelques minutes, avant de passer à la pression atmosphérique. Cela permet de briser la structure de la biomasse et facilite l'hydrolyse enzymatique de la cellulose. La biomasse peut, au préalable, être imbibée d'acide pour augmenter les rendements en sucres (Behera et al., 2014; Linde et al., 2007).

Les paramètres influençant l'efficacité de la méthode sont le temps de résidence, la température, la taille de la biomasse et son humidité. L'ajout d'acide, comme l'acide sulfurique ou de dioxyde de carbone, peut diminuer les temps et les températures de

## Chapitre III : Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

traitement, tout en augmentant le taux d'hydrolyse et en diminuant la formation d'inhibiteurs. Cependant, en fonction de la biomasse utilisée, l'efficacité de la méthode diffère (**Behera et al., 2014**).



**Figure 18** : le montage de l'entraînement à la vapeur d'eau (**Luicita et lagunez rivera, 2006**)

- |                                       |                              |                      |                         |
|---------------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------|
| 1- Le Flacon Erlenmeyer               | 2- l'eau                     | 3- chauffe-ballon    | 4- la plante            |
| 5- le support de Le Flacon Erlenmeyer | 6- la sortir de l'eau        | 7- l'entrée de l'eau | 10- l'huile essentielle |
| 8- réfrigérant                        | 9- le support de réfrigérant | 11- l'eau aromatique | 12- l'ampoule décomptée |

### 1.2.1.5 Extraction assistée par Micro-ondes (MAE) :

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques, possédant un champ électrique et magnétique perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, qui se propagent dans le vide avec des fréquences situées entre 300 MHz et 300 GHz. Néanmoins, dans le but d'éviter des interférences avec les radiocommunications et les radars, les micro-ondes domestiques et industrielles sont généralement utilisées à une fréquence de 2.45 GHz (**Camel, 2001**). Les micro-ondes sont positionnées sur le spectre électromagnétique entre les infra-rouges et les radiofréquences, avec des valeurs de longueurs d'ondes comprises entre 1 m et 1 cm.

Cette méthode relativement récente combine l'utilisation de micro-ondes à la méthode conventionnelle d'extraction par solvant (**Azmir et al., 2013**). L'énergie délivrée dans le milieu est absorbée et est convertie en énergie thermique (**Gil-Chavez et al., 2013**). Les micro-ondes augmentent la température du solvant et de la plante, augmentant les cinétiques

## Chapitre III : Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

d'extraction. Dans un premier temps, grâce à l'augmentation de température et de pression au sein de l'échantillon, les extractibles se séparent de la matrice lignocellulosique, le solvant se diffusant dans la matrice peut alors les solubiliser (Alupului, 2012).

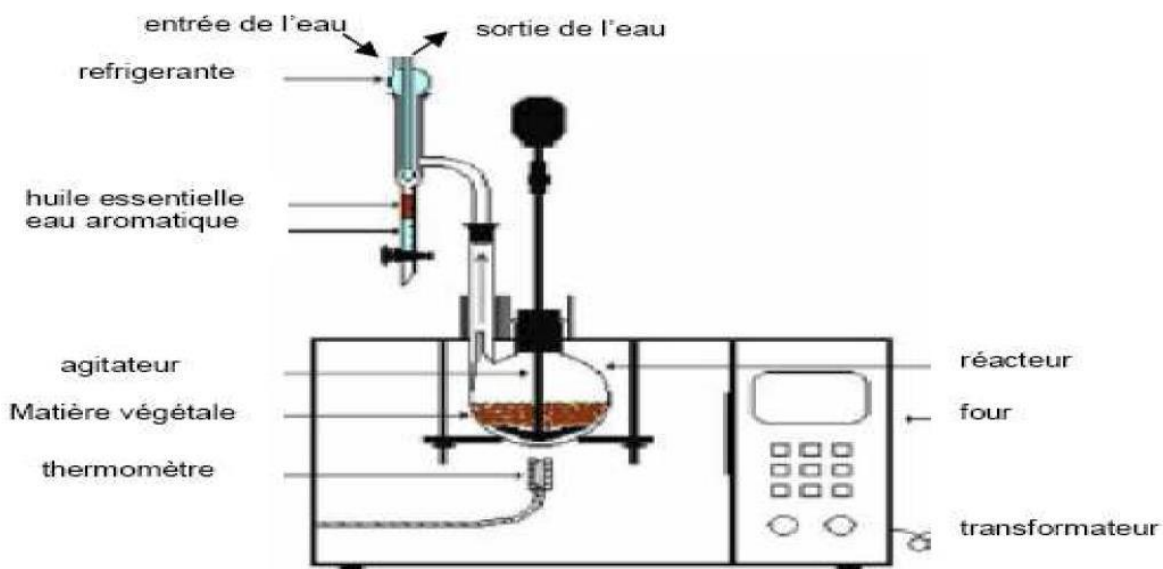


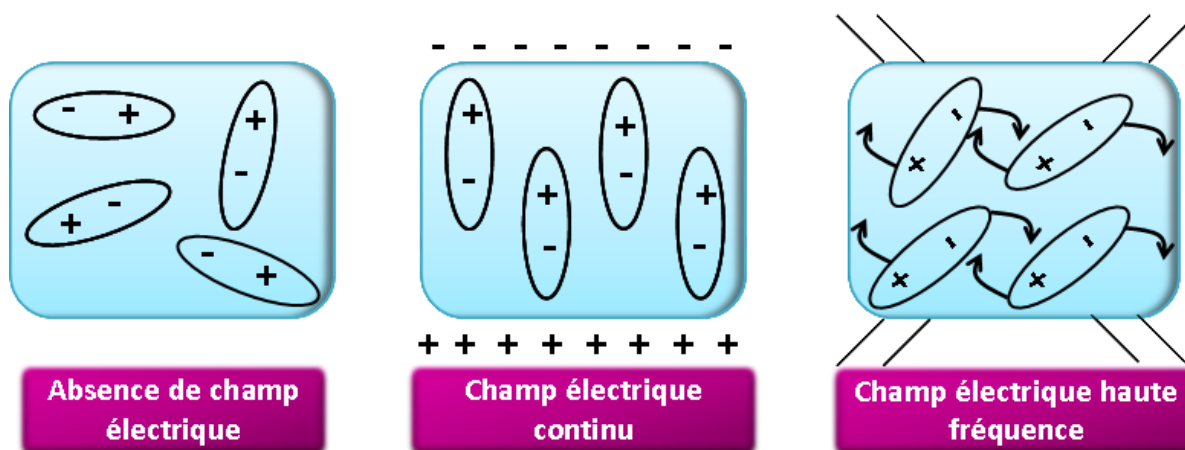
Figure 19: le montage d'extraction par micro-ondes (Luicita et lagunez rivera, 2006)

Le principe de chauffage de la matière par les micro-ondes est dû à deux phénomènes qui interviennent simultanément: la conduction ionique et la rotation dipolaire (Sparr Eskilsson et Björklund, 2000 ; Kaufmann et Christen, 2002).

- La conduction ionique est due à la migration électrophorétique des ions dans un champ électromagnétique. La résistance du milieu à ces courants ioniques induit des frictions libérant de la chaleur par effet Joule.
- La rotation dipolaire correspond au phénomène d'alignement/réalignement des molécules possédant un dipôle dans un champ électrique alternatif de haute fréquence. La figure 20 permet de mieux comprendre ce phénomène. En l'absence de champ électrique, les molécules constituées d'un dipôle diélectrique sont orientées aléatoirement. Sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules s'orientent dans la direction du champ électrique. Et lorsque les molécules dipolaires sont soumises à l'effet d'un champ électrique alternatif de haute fréquence, elles s'orientent dans la direction du champ, se désorientent lorsque le champ s'annule puis se réorientent dans l'autre sens du champ. Les mouvements de réalignement vont être perturbés par les liaisons qui existent entre les molécules (liaisons hydrogène, liaisons de

## Chapitre III : Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

Van der Waals) induisant des frictions entre molécules et par conséquent une libération d'énergie thermique.



**Figure 20:** Représentation schématique du comportement de molécules possédant un dipôle en l'absence de champ électrique, sous l'effet d'un champ électrique continu et sous l'effet d'un champ électrique de haute fréquence (Sparr Eskilsson et Björklund, 2000 ; Kaufmann et Christen, 2002).

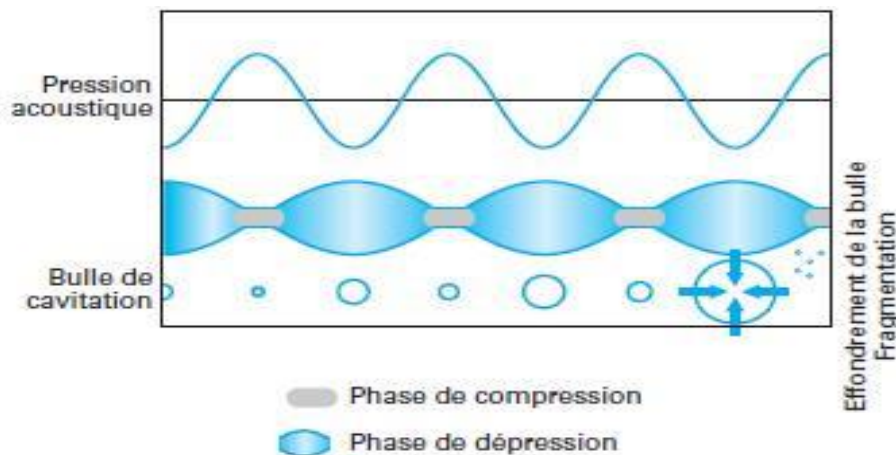
Cette méthode offre des avantages, tels que l'augmentation de la pureté des extraits, la possibilité de réduire les quantités de solvants toxiques utilisés, celle de réduire les coûts d'opération, l'énergie nécessaire et la consommation en solvants, ce qui en fait une technologie plus respectueuse de l'environnement. De plus, le temps d'opération peut être significativement réduit. De récentes applications d'extractions assistées par micro-ondes, et utilisant un procédé sous pression ou sans solvant, ont également été développées (Segneanu et al., 2013).

### 1.2.1.6 L'extraction assistée par ultrasons (UAE) et émulsions ultrasoniques :

Les ultrasons sont des ondes vibratoires acoustiques ayant des fréquences allant de 16 kHz à 1010 kHz. Ils sont donc à l'origine de sons inaudibles pour l'humain, car leurs fréquences sont en majorité supérieures au seuil d'audibilité de notre oreille (0.02 kHz à 20 kHz) (Gazanhe et Jessel, 1970; Pétrier et al., 2008; Société Française d'Acoustique, 2010). Dans un milieu liquide, la propagation des ondes va générer des cycles successifs de compression (haute pression) et de raréfaction (basse pression) (Wang et Weller, 2006).

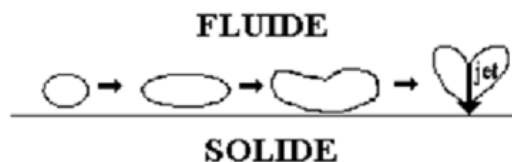
## Chapitre III : Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

Cette différence de pression va générer des mouvements moléculaires au sein du milieu. Lors d'un cycle de raréfaction la distance entre molécules est augmentée et au dessus d'une certaine distance, dépendant de chaque milieu, des bulles de cavitations vont se former. Ces bulles vont croître pendant les phases de raréfaction et diminuer pendant les phases de compression (Figure 21). La répétition de ces cycles va conduire à l'implosion des bulles de cavitation, libérant ainsi une grande quantité d'énergie (Pétrier *et al.*, 2008).



**Figure 21:** Représentation schématique de la croissance et de l'implosion d'une bulle de cavitation (Pétrier *et al.*, 2008)

Lorsque les bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide (Fig 22) elles deviennent asymétriques, et l'implosion qui en résulte produit des jets de liquide projetés à très grande vitesse vers la surface du solide, ainsi qu'une augmentation locale de la température et de la pression. Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide (Wang et Weller, 2006).



**Figure 22:** Evolution d'une bulle de cavitation à proximité d'une surface solide ([https://www.researchgate.net/figure/Evolution-dune-bulle-de-cavitation-a-proximite-dune-surface-solide-sous-leffet-des\\_fig4\\_37243765](https://www.researchgate.net/figure/Evolution-dune-bulle-de-cavitation-a-proximite-dune-surface-solide-sous-leffet-des_fig4_37243765))

### 1.2.1.7 Expression à froid :

C'est une technique "physique" simple où les écorces des agrumes (citron, orange,...) sont pressées à froid pour extraire leurs HEs en utilisant des rouleaux. Aucune source de chaleur n'est utilisée, laissant ainsi à l'huile une odeur très proche de l'original. Le principe de cette méthode consiste à faire éclater par différents procédés mécaniques (compression, perforation) les poches qui sont situées à la superficie de l'écorce de ces fruits renfermant l'HE. L'huile libérée est ensuite recueillie par un courant d'eau (**Marrouf et Tremblin, 2009 ; Bruneton, 1999**).

## 1.3 Les meilleures méthodes

Les méthodes conventionnelles utilisaient les solvants organiques, soit par macération (extraction discontinue) ou en utilisant certains appareils comme le Soxhlet qui est une extraction continue inventé pour la première fois en 1879 par l'allemand Franz von Soxhlet (1848-1926), mais certains inconvénients se présentent avec cet appareil à cause de la taille limitée de la cartouche qui porte la plante, et la chaleur qui peut dégrader les composés chimiques (**Wikipédia, 2014**).

Les solvants organiques sont des composés chimiques volatils et relativement inertes chimiquement et dans la plupart des applications ils jouent un rôle transitoire en facilitant le processus d'extraction, pour être ensuite évacués (**Bégin et Gérin, 2002**). Certains solvants organiques ont été remplacés ou suspendus de l'utilisation pour leurs dangers sur les organismes vivants ou sur l'environnement. Ils peuvent avoir des effets toxiques sur les systèmes nerveux, cardio-vasculaire et de reproduction, sur la peau, les yeux, les muqueuses, le foie, les reins, le sang et même des effets cancérigènes. Alors que sur l'environnement certains solvants organiques peuvent avoir des effets sur la déplétion de la couche d'ozone, la formation du smog photochimique, le réchauffement climatique, pollution de l'air, des eaux et des sols.

Pour cela, la réduction des substances toxiques est devenue une nécessité pour la protection de l'homme et son environnement et pour un développement mondial durable (**Gérin, 2002**). utilisant des conditions alternatives comme la suppression des solvants (telle que les micro-ondes), l'utilisation de solvants facilement séparables et sûrs comme les fluides

## Chapitre III : Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

---

supercritiques, l'utilisation de solvants non volatils comme les liquides ioniques ou, encore, l'utilisation de solvants n'ayant pas d'impact sur l'environnement comme l'eau (**Scherrmann et al., 2008**).

L'idée de « chimie verte » ou « chimie durable » est alors fondée vers les années 90, ce concept est introduit en 1998 par les chimistes américains Paul Anastas et John C. Warner pour être appliquée d'abord à l'industrie chimique, afin de mettre en oeuvre des principes pour Réduire et éliminer l'usage ou la génération de substances néfastes pour l'environnement, par de nouveaux procédés chimiques et des voies de synthèses propres, c'est-à-dire respectueuses De l'environnement (**Gérin, 2002; Wikipédia, 2014**).

Parmi les techniques non conventionnelles ou écologiques empruntées par la chimie verte les plus utilisées sont: l'extraction par fluides supercritiques, par eau surchauffée ou subcritique, par micro-ondes et l'extraction par ultrasons.

### 1 Méthodes d'évaluation de l'effet antibactérien

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

Les activités antimicrobiennes sont généralement déterminées par diffusion (méthode des disques, principe de l'antibiogramme) ou par dilution en milieu liquide (Figure 23), qui permettent de déterminer, pour chaque échantillon, la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), concentration la plus faible permettant l'inhibition totale de la croissance microbienne (**Andrews, 2001**).

La méthode de diffusion utilise classiquement des disques de papier filtre imprégnés de concentrations croissantes en échantillon. Il s'agit d'une technique de contact impliquant la diffusion des molécules testées dans le milieu de culture gélosé : les disques imprégnés sont déposés à la surface de géloses inoculées par le micro-organisme étudié. Après incubation, les zones d'inhibition de croissance sont mesurées et permettent d'évaluer l'activité antimicrobienne (**Rios et al., 1988**).

Concernant la méthode de dilution, l'échantillon est solubilisé dans le milieu de culture puis mis en contact directement avec l'inoculum microbien. Afin de tester un maximum de concentrations par échantillon, cette technique est souvent effectuée en microplaques 96 puits. Après incubation, l'activité antimicrobienne est estimée par mesure des densités optiques au spectrophotomètre, ou par comptage des micro-organismes après dilution et étalement sur milieu gélosé en boîte de Pétri. (**Amadine, 2015**).



**Figure 23** : Exemple d'un test d'activité antimicrobienne par la technique des disques (à gauche) et microplaque 96 puits couramment utilisée pour la technique en milieu liquide (à droite) (**Rios *et al.*, 1988**).

### 1.1 Méthode de diffusion en milieu gélosé

On a préparé des colonies jeunes de bactéries de 18h à 24h puis une suspension bactérienne a été réalisée dans l'eau physiologique stérile, on a mesuré la DO de cette suspension jusqu'à avoir la même DO de Mc Farland (une suspension de 0,1 à 0,12 nm lue à une longueur d'onde de 600 à 620nm) (**Kout et Chihel, 2018**).

- Des bactéries ont étéensemencées sur des boîtes de pétrie contenant la gélose Muller Hinton (milieu MH) : mettre quelques gouttes de la suspension de bactéries et à l'aide d'un râtelier étaler sur toute la surface.
- Les disques imprégnés de (20 µl) d'extrait sont ensuite délicatement déposés à la surface de la gélose.
- Les boîtes ont été laissées pendant 1h à température ambiante pour une rediffusion des substances.
- Incuber à 37°C à l'étuve pendant 24h.
- L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'incubation autour de chaque disque (en mm).
- Le diamètre d'inhibition a été mesuré contre le diamètre d'antibiotique de référence.

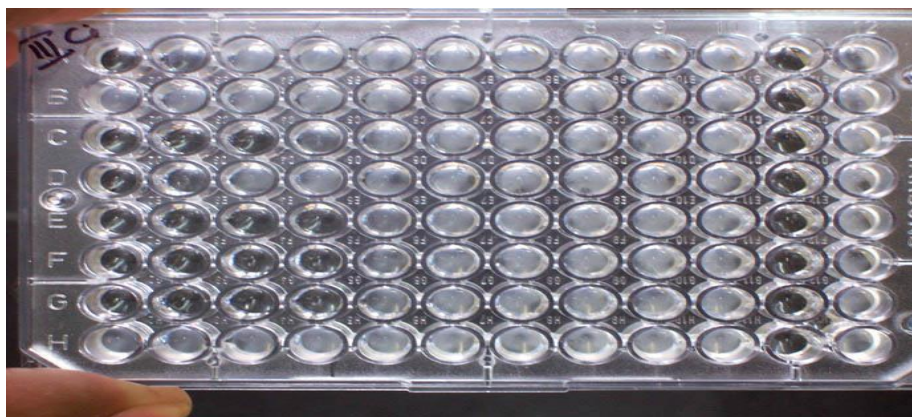
### 1.2 Méthode de dilution

Ces méthodes peuvent être appliquées en gélose ou en bouillon, à partir desquelles nous pouvons déterminer les CMI (**Prescott *et al.*, 2010 in Azzi, 2016**). Il existe une relation simple entre les diamètres des zones d'inhibition et les CMI mesurées par les techniques de dilution. Cette relation, appelée droite de concordance ou droite de régression (**Guérin-Faubleé et Carret, 1999**) dont la zone d'inhibition correspond inversement à la CMI de l'essai (**El kalamouni *et al.*, 2010**).

#### 1.2.1 En milieu liquide :

L'inoculum bactérien est distribué dans des cupules (méthode de microdilution) (Figure 24) ou dans une série de tubes (méthode de macrodilution) (Figure 25) contenant l'agent antimicrobien. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la

plus faible concentration d'agent antimicrobien ou aucune croissance n'est visible (**Euzéby, 2009**).



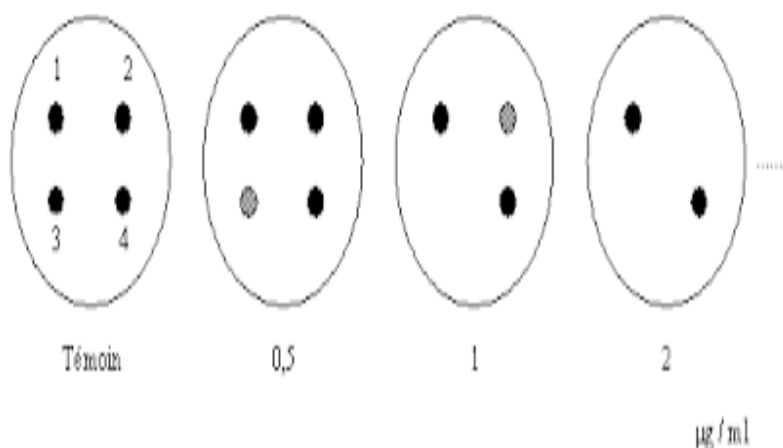
*Figure 24: Méthode de micro-dilution (Euzéby, 2009)*



*Figure 25 : Méthode de macro-dilution (Euzéby, 2009)*

### 1.2.2 En milieu solide :

L'agent antimicrobien est incorporé dans un milieu gélosé coulé en boîtes de Pétri. La surface de la gélose estensemencée avec un inoculum microbien à étudier. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'agent antimicrobien (Figure 26) (**Euzéby, 2009**).



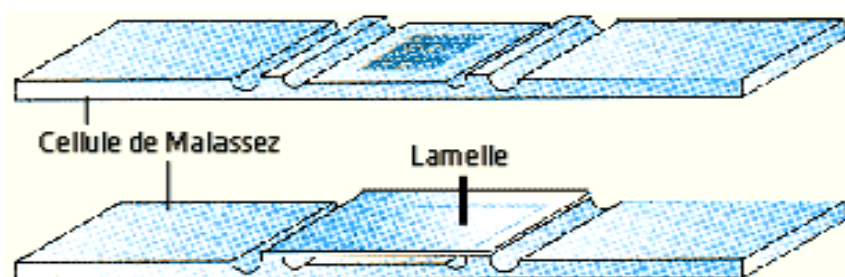
**Figure 26:** Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé (Euzéby, 2009).

## 2 Méthode d'évaluation de l'effet antifongique

### 2.1 Préparation de l'inoculum fongique

Les suspensions mères de levures sont préparées à partir d'une culture des différentes souches sur milieu SAC incubées pendant 48h à 37°C. Sur la paroi d'un tube à hémolyse contenant 5 ml de sérum glycosé à 5%, on écrase une colonie de levures mesurant 1,5 à 3 mm de diamètre, prélevée de la culture par pipette Pasteur stérile. Les suspensions sont préparées dans le sérum glycosé à 5% et ajustées à  $2.10^3$  levures/mm<sup>3</sup> après comptage à la cellule de Malassez.

#### 2.1.1. Utilisation de la cellule de Malassez : (Figure 27)



**Figure 27:** Cellule de Malassez (El Mansouri, 2013)

Une cellule de Malassez est une lame spéciale quadrillée qui permet le comptage de différents types de cellules.

- **Mode opératoire:**

Pour réaliser le remplissage de la cellule, il faut :

- Humidifier les glissières latérales sur lesquelles va reposer la lamelle
- Déposer la lamelle sur les rebords, celle-ci doit adhérer par un "effet ventouse"
- Placer l'extrémité de la pipette contre la lamelle et délivrer par capillarité le liquide en évitant tout débordement vers les rigoles.

- **Principe de comptage :**

- La totalité de la cellule est composée de 100 rectangles dont les dimensions sont:

Long.= 0,25 mm / larg.= 0,20 mm / Prof. = 0,20 mm,

- Le volume total de la cellule est de  $1 \text{ mm}^3$  (100 x 2,5x 0,2 x 0,20).

- Le quadrillage est donc constitué de 10 bandes verticales (0,25 mm) et de 10 bandes horizontales (0,20 mm) formant ainsi 100 rectangles,

- On ne compte les cellules que dans 10 des 25 rectangles non contigus pris au hasard dans la cellule.

- On totalise le nombre de cellules présentes dans chaque rectangle.

Arbitrairement, il est convenu de ne tenir compte que les cellules positionnées sur les côtés droits et inférieurs !

- On calcule le nombre moyen de cellules par rectangle (total des cellules observées dans 10 rectangles divisé par le nombre de rectangles comptés).

- On multiplie le nombre obtenu par 100 pour connaître le nombre d'entités cellulaires par  $\text{mm}^3$  (El Mansouri, 2013).

## 2.2 Méthodes d'évaluation de l'activité antifongique

### 2.2.1 Technique de macrométhode en milieu liquide

L'activité antifongique des différents extraits de plantes sur la croissance des levures a été évaluée par la technique de macrométhode en milieu liquide selon les recommandations de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) M38P pour les levures (NCCLS, 1997). Dans des tubes à hémolyse contenant 200  $\mu\text{l}$  de la suspension fongique mère, préalablement préparée et ajustée à  $2.10^3$  levures/ $\text{mm}^3$ , on ajoute 10  $\mu\text{l}$  de l'extrait de

plante (EP) à tester puis homogénéisée au mixeur Vortex. Ensuite on ajoute 10 µl de DMSO 10% puis une deuxième homogénéisation est effectuée. Enfin, les tubes sont complétés par la quantité suffisante de sérum glycosé 5% pour avoir un volume final de 1 ml pour chaque tube. Le screening des extraits a été réalisé sur *C. albicans* 5 par addition de 10 µl d'EP à 2 mL suspension fongique mère.

Les témoins négatifs ont été préparés par ajout des souches testées aux milieux adéquats sans EP. Le comptage des tubes témoins s'est fait à l'aide de la cellule de Malassez pour déterminer le nombre de levures/mm<sup>3</sup> à T<sub>0</sub>.

Chaque test a été réalisé deux fois dans les mêmes conditions expérimentales et les résultats indiqués représentent la moyenne de ces deux tests. L'ensemble des tubes à hémolyse, hermétiquement fermés, sont incubés à 37°C pendant 48 heures sous agitation continue en utilisant l'agitateur à plaques ELISA (figure 28) qui réalise des secousses vibratoires réglées à une fréquence de 1350 tours/min (El Mansouri, 2013).



**Figure 28** : Incubation des tubes pendant 48 heures à 37°C sous agitation continue (NCCLS, 1997).

Après 48h d'incubation à 37°C, chaque tube est homogénéisé au mixeur Vortex puis le nombre de levures est déterminé par comptage à la cellule de Malassez. Sont considérés comme efficaces, les extraits dont le taux d'inhibition est supérieur à 80%. Le taux d'inhibition est calculé comme suit :

$$\text{Taux d'Inhibition en (\%)} = [1 - (T_{48 \text{ extrait}} - T_0) / (T_{48 \text{ témoin}} - T_0)] \times 100$$

Où :

T<sub>0</sub> : nombre de levures dans le tube témoin à temps zéro.

T<sub>48 témoin</sub> : nombre de levures dans le tube témoin après 48h d'incubation.

T<sub>48 extrait</sub> : nombre de levures dans le tube avec extrait testé, après 48h d'incubation.

### 2.2.2 Evaluation de l'activité des antifongiques classiques

Les antifongiques usuels ont été dissous dans le DMSO à 10% afin d'évaluer leur activité antifongique dans les mêmes conditions expérimentales que celles des HE étudiées sur les levures sélectionnées. Pour la forme galénique comprimés et gélules, cas du fluconazole 150 mg et la Terbinafine 250 mg comprimé, les médicaments ont été additionnés, après broyage, à 2 ml de DMSO 10 %. Pour la forme galénique sirop, cas de l'amphotéricine B 10%, 1 ml de ce dernier est additionné à 2 ml de DMSO à 10%. L'étude de l'activité des antifongiques classiques a été faite par la technique de macrométhode en milieu liquide.

L'ensemble des résultats recueillis ont été saisis et analysés au moyen du logiciel SPSS en utilisant le test de Student (**El Mansouri, 2013**).

## 3 Choix des méthodes

Pour la méthode de diffusion en milieu solide, tous les produits peuvent être testés mais ils doivent diffuser parfaitement dans l'agar. En plus de cette conditionnalité plusieurs facteurs peuvent influencer sur les résultats : la composition du milieu gélosé, la densité de l'inoculum, les caractéristiques de croissance des souches, la température d'incubation, le temps d'application des produits à tester et la concentration des produits sur disques (**Leclerc 1975 ; Alcamo 1984 ; Rios et al. 1988**), dans les puits (**Rios et al., 1988**) ou le réservoir.

Bien que cette méthode soit simple, rapide et applicable à tout type de substance et tout organisme. Elle permet aussi d'évaluer un grand nombre d'échantillons à la fois (4 par boîtes) mais les résultats ne sont pas exprimés par une unité standard universelle permettant de quantifier les résultats (**Leclerc 1975 ; Alcamo 1984 ; Rios et al., 1988**).

Son application est aussi limitée par la différence de diffusion dans l'agar des composés chimiques végétaux de polarité variable.

Bien que la méthode de dilution soit la plus appropriée pour les évaluations quantitatives d'activité (CMI), elle reste toutefois assez fastidieuse et longue avec les procédures de dilutions en série à faire (**Ferron, 1976**).

## PARTIE II : ETUDE COMPARATIVE

### Matériel et Méthodes

Ce travail représente une étude comparative entre les différents travaux réalisés visant l'évaluation des différents caractères (antifongiques, antibactériens ... etc.) des métabolites secondaires des lichens.

Les métabolites secondaires sont des composés phytochimiques produits par les plantes qui sont généralement une source importante de molécules bioactives. En effet, ces dernières années, ces molécules bioactives devient le point de départ de toutes les études scientifiques, et l'obtention de ces dernières nécessite de nombreuses étapes souvent longues et coûteuses, telles que l'extraction (Michel, 2011), pour cela plusieurs techniques ont été mis en évidence pour les extraire (Aberkane et Bourenane, 2019).

## II. Matériel

### II.1. Les réactifs :

Le tableau 2 représente la provenance ainsi que le grade de tous les solvants, réactifs et standards utilisés dans l'extraction des métabolites secondaires :

**Tableau 2** : Provenance et grade des réactifs et solvants (Wivecke, 2003).

Produit	Provenance	Grade
Acétate d'éthyle	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.5%
Acétone	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S., 99.5%
Acide formique	Fisher Scientific	Réactif A.C.S., 99.5%
Acide usnique	Aldrich	Standard
AcOH, glacial	Fisher Scientific	Réactif A.C.S., 99.7%
Atranorine	Aldrich	Standard
Benzène	Aldrich	HPLC, 99.9%
CaOCl	Provenance inconnue	Grade inconnu
CDCI <sub>3</sub>	Aldrich	99.8%
CHCl <sub>3</sub>	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S., 99.5%
Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	J. T. Baker	102.4%
DCM	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.5%
Diéthyléther	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S., 99.5%
Dioxane	Aldrich	HPLC, 99.9%
EtOH	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.5%
FeCl <sub>3</sub> • 6H <sub>2</sub> O	BDH	98%
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Fisher Scientific	85.30%
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Anachemia	Réactif A.C.S., 95-98%

Hexane	Anachemia	HPLC, 99.9%
KOH	Fisher Scientific	86.5%
MeOH	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.8%
MeOH	Caledon Laboratories	HPLC
MoO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	J. T. Baker	85%
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Provenance inconnue	Grade inconnu
Olivetol	Aldrich	Standard
PD	Provenance inconnue	Grade inconnu
SiO <sub>2</sub>	Silicycle, 230-400 mesh, 60 A	Ultrapure
Alumine	J. T. Baker	Grade inconnu
Toluène	Anachemia	HPLC, 99.9%
Acétate d'éthyle	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.5%

### II.2. Récoltes des lichens

La méthode de récolte est presque la même pour tous les travaux consultés. Les échantillons ont été récoltés de divers endroits afin de préserver les colonies existantes, ils ont été lavés avec l'eau de robinet, puis séchés à l'air libre à température ambiante. Après séchage les lichens ont été broyés à l'aide d'un mortier jusqu'à obtenir une poudre. La poudre est conservée à basse température afin d'éviter toute détérioration.

### II. Etude comparative des techniques d'extraction

La technique d'extraction est une étape très importante dans l'isolement et la récupération des composés phytochimiques existants dans le matériel végétal (**Quy Diem Do et al, 2014**). Elle est influencée par sa nature chimique, la méthode utilisée, la taille d'échantillon étudié, ainsi que la présence de substances interférentes (**Stalikas, 2005**).

Une étude publiée en **2003**, réalisée par **Wivecke** portant sur l'extraction de deux espèces léchéniques *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina* (figure 29 ,30) a utilisée trois méthodes d'extraction : Soxhlet ou macération d'une durée variant entre 24 et 72 heures, par entraînement à la vapeur d'eau sont effectuées sur des périodes de temps variant entre 2 et 3



Figure 29 : *Cladina stellaris*  
(<https://www.fs.fed.us/database/feis/lichens/claspp/classte.jpg>)

heures, le **tableau 3** représente les conditions d'extraction par Soxhlet, par macération et par entraînement à la vapeur sur *Cladina stellaris*.

**Figure 30** : *Cladina rangiferina* (<https://alchetron.com/cdn/cladonia-rangiferina-d40ec56e-0ba6-4162-b558-21260a4d997-resize-750.jpeg>)



**Tableau 3** : Conditions pour les extractions au Soxhlet, par macération et par entraînement à la vapeur sur *Cladina stellaris* (Wivecke, 2003).

Extrait (#)	Solvant	Type d'extraction	Durée (heures)	Rendement (%)
1	Hexane	Soxhlet	24	12.20
2	CHCl <sub>3</sub>	Soxhlet	24	5.70
3	CHCl <sub>3</sub>	Soxhlet	24	2.50
4	CHCl <sub>3</sub> -MeOH(1:1)	Soxhlet	24	9.70
5	BOH	Soxhlet	24	7.90
6	Pentane	Macération	24	0.37
7	DCM-MeOH(1:1)	Macération	24	4.70
8	Acetone-CHCl <sub>3</sub> (1:1)	Macération	24	0.68
9	H <sub>2</sub> O-EtOH (4:1)	Macération	72	0.29
10	H <sub>2</sub> O-EtOH(1:1)	Macération	72	0.24
11	H <sub>2</sub> O-EtOH(1:4)	Macération	72	0.87
12	H <sub>2</sub> O	Macération	72	0.32
13	H <sub>2</sub> O	Ent, vapeur	2	0.01
14	H <sub>2</sub> O	Ent, vapeur	3	0.09

Chez *Cladina stellaris*, la mise à l'essai de différentes conditions d'extraction au Soxhlet, montre que parmi les meilleurs rendements figurent ceux obtenus avec l'EtOH (no 5) et le mélange CHCl<sub>3</sub>-MeOH (no 4) (Huneck et Yoshimura, 1996 ; Fahselt, 1994 ; Huovinen et al., 1985). Mais le meilleur rendement est observé avec l'extrait à l'hexane (no 1). Les solvants peu polaires sont considérés comme peu efficaces pour l'extraction des acides

lichéniques (**Huneck et Yoshimura, 1996 ; Fahselt, 1994**). Il est cependant possible que le lichen contienne des lipides ou d'autres composés susceptibles de passer en solution dans ces conditions (**Stead et al., 1998**). Outre cette différence dans le conditionnement de l'extrait à l'hexane (no 1), le rendement élevé peut être en lien avec l'âge des lichens et les conditions environnementales de la colonie avant la récolte.

Ce sont d'ailleurs des facteurs pouvant influencer la quantité de métabolites secondaires chez les lichens (**Fahselt, 1981 ; Culberson et Ahmadjian, 1980 ; Fahselt, 1994 ; Huovinen, 1985 ; Culberson et al., 1977 ; Mirando et Fahselt, 1978 ; Schultz et Mosbach, 1971 ; Stephenson et Rundel, 1979**).

Cependant, certains auteurs avancent que la concentration intrathalline de certains composés, comme l'acide usnique (21), ne soit pas significativement influencée par la température (**Huovinen, 1985**). Une augmentation de l'activité enzymatique pourrait expliquer le rendement élevé de l'extrait obtenu avec ces lichens, puisqu'ils proviennent d'un site montagneux très exposé à la lumière.

Les extractions par macération (no 6, 8, 9, 10, 11 et 12) donnent des rendements moins intéressants par rapport à ceux obtenus par Soxhlet, à l'exception du mélange DCM-MeOH (no 7). Le mélange DCM-MeOH cible une plus grande variété de composés, tel que le suggère la solubilité des acides lichéniques connus chez *Cladina stellaris*. Le composé majeur, l'acide usnique (21), est d'ailleurs très soluble dans les solvants chlorés (**Huneck et Yoshimura, 1996**).

Concernant les rendements obtenus pour les extractions par entraînement à la vapeur (no 13 et 14), ils figurent parmi les plus faibles. Ces rendements indiquent que les produits volatiles sont très peu abondants chez *Cladina stellaris*.

Les rendements des extraits obtenus avec *Cladina rangiferina* sont faibles à l'exception de celui à l'EtOH (no 1 au **tableau 4**) qui est le plus élevé. Les extractions au CHCl<sub>3</sub> et à l'acétone (no 2 et 3 au **tableau 4**) donnent des rendements plus faibles qu'avec PEtOH. Ces résultats sont attribuables à des différences dans le conditionnement de ces deux extraits.

**Tableau 4** : Conditions pour les extractions par Soxhlet et par macération sur *Cladina Rangiferina* (Wivecke, 2003)

Extrait (#)	Solvant	Type d'extraction	Durée (heures)	Rendement (%)
1	EtOH	Soxhlet	24	5.6
2	CHCl <sub>3</sub>	Soxhlet	24	1.0
3	Acétone	Soxhlet	24	1.6
4	EtOH-H <sub>2</sub> O (1:4)	Macération	72	0.2
5	EtOH-H <sub>2</sub> O(1:1)	Macération	72	0.3
6	EtOH-H <sub>2</sub> O(4:1)	Macération	72	0.2

Concernant les extraits no 4, 5 et 6 obtenus par macération avec les mélanges EtOH-H<sub>2</sub>O, ils sont équivalents et donnent des rendements faibles par rapport à ceux des extraits no 1, 2 et 3 obtenus par Soxhlet. Le même écart entre les rendements des mélanges EtOH-H<sub>2</sub>O avec les extraits obtenus par Soxhlet a été observé chez *Cladina stellaris* (voir Tableau 3).

L'écart s'explique par le fait que beaucoup de composés, connus chez les lichens, présentent un nombre de carbones et de chaînes alkyles élevés ce qui leur confèrent un caractère hydrophobe (Huneck et Yoshimura, 1996 ; Bruice, 1998 ; Fahselt, 1994 ; Culberson et Elix, 1989 ; Elix, 1984).

Une grande variété des composés obtenue par l'analyse des extraits au soxhlet de l'espèce *Cladina stellaris* (Hydrocarbure oxygéné (23), Hydrocarbure oxygéné (24), Hydrocarbure oxygéné (25), pOrcinolméthyl- carboxylate (5), Olivétol (3), bis(2-éthylhexyl)- adipate (26), Inconnu (27), Acide usnique (21) ...etc), et de *Cladina rangiferina* (2,4-dihydroxy-6-méthyl-benzaldéhyde (59), Méthylhaematommate (7), p-orcinolméthyl- carboxylate (5), Ethyl haematommate (8), bis-(2-éthylhexyl)- adipate(26) ...etc )(Wivecke, 2003).

Cependant, une autre étude réalisé par Kechkar et Ben Ahmad (2018), où il a réalisé une extraction du lichen *Xanthoria parietina* (figure 3) par macération selon deux méthodes : la première c'est une extraction classique par l'acétone et deuxième extraction successive utilisant des solvants de polarité croissante.



**Figure 31 :** *Xanthoria parietina* récoltée de l'université des frères Mentouri Constantine (Kechkar et Ben Ahmad, 2018)

L'extraction avec trois solvant de polarité croissante a permis d'avoir un rendement plus au moins important par rapport à l'acétone (11,2% vs 10% (tableau 5)) est plus élevé que les rendements obtenues dans la première étude.

**Tableau 05 :** Rendement massique % obtenus par extraction séquentielle et extraction classique de *Xanthoria parietina* (Kechkar et Ben Ahmad, 2018)

	Extrait EAM	Extrait A
Poids sec (g)	2.24	2
RE %	11.2	10

EAM : éther d'éthyle + acétone + méthanol

A: acétone

Les composées secondaires des lichens sont de natures très variée et de polarité différente, l'emploi d'extraction séquentiel permet d'optimiser l'extraction des métabolites secondaires bioactifs (Kechkar et Ben Ahmad, 2018).

Le screening phytochimique de *Xanthoria parietina* a révélé la présence de stérols, poly phénols et tanins catéchiques (Kechkar et Ben Ahmad, 2018), mais il y a une autre étude réalisé par **Derdane et Khelifi** qui montre qu'il y a 187 molécules thermostables dont 37 ont été identifiées et appartenant principalement à 3 familles chimiques qui sont : les hydrocarbures, les Alcools et les lipides. En effet, entre 1996 et 2001, Huneck avait déjà compté environ 800 molécules différentes (Huneck, 2001;Huneck et Yoshimura, 1996). Actuellement, le nombre de métabolites lichéniques identifiés avoisinerait les 1050 (Stocker-Wörgötter, 2008). Cette liste est loin d'être exhaustive, beaucoup d'autres molécules restent à identifier (Derdane et Khelifi, 2017).

**Lagarde (2017)**, a réalisé une extraction de lichen *Nephroma laevigatum* et il s'est opté pour l'extraction séquentielle qui était privilégiée par rapport à une extraction classique (une seule étape d'extraction), dans le but d'optimiser les rendements et d'extraire le plus grand nombre de métabolites lichéniques.

**Corrèze**



**Gironde**



**Figure 32** : *Nephroma laevigatum* sur son substrat avant récolte (**Lagarde, 2017**).

L'extrait dichlorométhanique (DCM) et l'extrait acétonique (AC) ont donné un rendement massique de 5,86% et 1,26% soit une masse de 2,92 g et 0,63 g respectivement, ce sont des rendements plus faibles par rapport aux rendements des extraits des autres espèces lichéniques.

Différents composés connus de *Nephroma laevigatum* : l'émodyne, 7-chloro-1,6-di-O méthylémodyne, l'hopane-6 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,22-triol, 7-chloro-1-O-méthyl- $\omega$ -hydroxyémodyne...ect (**Lagarde, 2017**).

D'autre part, d'après les résultats obtenus par **Kout et Chihel** en **2018** sur l'extraction des lichens d'arbre et du mur, L'extraction acétonique des lichens récoltés a donné un rendement d'extraction RE% allant de 42.1% jusqu'à 53.1 % pour les lichens provenant des murs et du tronc d'arbre respectivement ce sont des rendements plus élevés que les rendements des extraits des espèces mentionnés dans les études précédentes (*Nephroma laevigatum*, *Xanthoria parietina*) (voir le tableau 6).

**Tableau 06** : le rendement total d'extractions RET par l'acétone des deux extraits de lichens (Kout et Chihel, 2018)

	lichen du mur	lichen de l'arbre
Poids sec (g)	<b>10</b>	<b>10</b>
RET %	<b>42.1</b>	<b>53.1</b>

Les résultats du screening chimiques des extraits indiquent la présence des tanins et des poly phénols et l'absence d'anthocyane. Dans l'extrait de lichen d'arbre indique la présence de stérol et de polyterpène par contre l'extrait de lichen de mur montre une absence de stérol et de polyterpène donc Il ya une grande diversité des métabolites secondaires des lichens. Certains de ces métabolites de lichen sont impliqués dans le maintien de l'équilibre symbiotique (Huneck, 1999), tandis que d'autres dissous roches (rocks) pour le meilleur attachement (pièce jointe) de lichens (Seaïeunrd, 1997).

D'après ces résultats, nous pouvons déduire que :

Le rendement d'extraction est le rapport de la quantité de substances naturelles extraites par l'action extractive d'un solvant à la quantité de ces substances contenues dans la matière végétale. Il dépend de plusieurs paramètres tels que : le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction, l'âge et la composition de l'échantillon.

Le désavantage majeur d'utiliser des solvants polaires et peu volatiles lors de l'extraction au Soxhlet est qu'ils nécessitent de chauffer durant l'extraction à plus de 70 °C. Certains travaux montrent qu'une température de 85 °C est suffisante pour dégrader certains composés lichéniques.

La différence dans la composition des extraits n° 2 et n° 3, serait attribuable à une différence entre l'origine et/ou l'âge des échantillons de lichens ; tel que, le vieillissement des lichens implique une diminution du métabolisme, qui conduit non seulement à une baisse de la concentration de certains métabolites, mais peut aussi avoir un impact sur leur production (Stephenson et Rundel, 1979).

Dans ce contexte wivecke, 2003 a observé que les meilleurs rendements ont été obtenus avec les solvants organiques mais ceux-ci diminuent considérablement lorsque l'eau est utilisée. En plus du type de solvant utilisé, les principaux facteurs pouvant faire varier la quantité de métabolites pourraient être liés aux conditions environnementales et à l'origine des lichens.

L'extraction des métabolites secondaires est réalisée en tenant compte de la nature du solvant, du temps et de la température d'extraction. (**Kechkar et Ben Ahmad, 2018**)

Les lichens résultent d'une association, stable et indépendante, entre un mycosymbiote et un photosymbiote, dans laquelle le mycosymbiote est le partenaire englobant l'autre dans une structure originale appelée : thalle lichénique (**Raven, 2003**). Cette structure varie selon les espèces et constitue l'une des principales clés de détermination de ces organismes.

La science moderne, a déjà révélé que les lichens sont des organismes qui produisent une large variété de métabolites naturels spécifiques, dont le nombre ne cesse de croître.

### Etude de l'activité antimicrobienne

Pour déterminer l'activité antibactérienne des extraits de lichen **Boukaaba et Touati , (2018)** ont utilisé la méthode de diffusion en milieu gélosé et ont choisi deux souches de bactéries de gram négatif *Escherichia coli* , commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, (**Kaper et al., 2004**). De forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$ .

L'autre est *Pseudomonas aeruginosa*, qui a une forme bacillaire, non sporulée, aérobies, mobiles ; ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (**Percival, 2004**). Comme résultats, ils ont remarqué que l'extrait acétonique de lichens ne provoque aucune zone inhibition (croissance bactérienne normale) en comparaison aux contrôles positifs (l'antibiotique approprié).

*Escherichia coli*



*Pseudomonas aeruginosa*

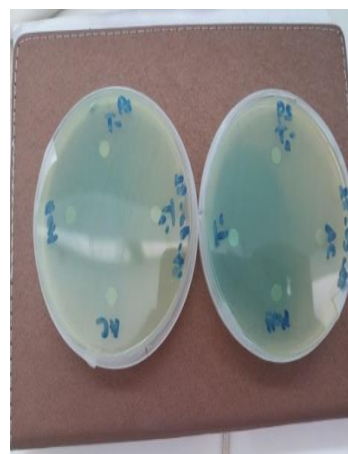


Premier essai



Pas de zone inhibition

Il y a une croissance bactérienne



Deuxieme essai

pas de zone inhibition

Il y a une croissance bactérienne

**Figure 33:** Résultats du test anti-bactérien de l'extrait acétoniques et méthanoliques de lichens récoltés sur deux souches de bactéries *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Selon (**Basile et al., 2015**) l'extrait acétonique des lichens récoltés possède une activité antibactérienne contre neufs souches bactériennes représentatives des classe Gram(+) et Gram (-) ( *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *P.vulgaris*, *P.mirabilis*, *S.typhi*, *E.cloacae*, *E. aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ) aux concentrations de 7.8-62.5 µg/ml.

l'extrait acétonique de lichens récoltés n'a pas montré d'activité antibactérienne contre des bactéries testées ( *Bacillus subtilis* , *Escherichia coli* , *Enterococcus faecalis* , *Klebsiella pneumoniae* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Staphylococcus aureus* , *Staphylococcus epidermidis* ) (**Felczykowska et al., 2017**).

**Derdane et Khelifi (2017)** ont adopté deux méthode pour évaluer l'activité antibactérienne ; la première est la dilution sur milieu liquide et l'autre que la technique de diffusion standard (diffusion sur milieu gélosé) avec sept germes pathogènes les plus réponsus dans le milieu hospitalier (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (R), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (S), *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Salmonella sp* et *Proteus sp*).

Les résultats de la première méthode montrent que les métabolites de l'extrait éthanolique de l'espèce *Xanthoria parietina* semblent stimuler, d'une part, la croissance des *Klebsiella*

(+22.16%), *Serratia* (+19.65%) ainsi que la forme sensible de *Staphylococcus* (+9.42%) et *Salmonella* (+4.78%) et inhibent, d'autre part, la multiplication des *Proteus* (-12.61%), *E-coli* (-7.25%) et *Staphylococcus* en forme résistante (-8.48%). Alors que les métabolites obtenus par extraction à l'éther diéthylique présentaient un effet positif uniquement sur les *Proteus* en stimulant leur croissance à environ 174.25% ! Soit une augmentation de 74.25% par rapport au témoin. Toutes les autres souches étudiées ont présenté un ralentissement de la croissance cellulaire suggérant un effet bactériostatique. Les valeurs enregistrées sont respectivement de -24.2% et -22.15% pour la forme sensible de *Staphylococcus* et *Salmonella* et de -11.36%, -10% et -7.3% pour les autres bactéries : *Serratia*, *Staphylococcus* en forme résistante et *E-coli*.

Concernant la deuxième méthode, les extraits acétoniques des différentes espèces lichéniques montrent une faible diffusion pour tous les échantillons. Une faible sensibilité de l'extrait d'espèce *Pseudovernia furfuracea*. Pour *Staphylococcus aureus* et *Salmonella* avec de zones d'inhibition de  $0,233 \pm 0,208$  et  $0,133 \pm 0,115$  cm, respectivement. Pour les autres bactéries aucune zone d'inhibition n'a été remarqué. Les extraits de *Lobaria virens* et *Lepraria elobata*, seule *E-coli* qui est sensible avec des zones d'inhibition entre  $0,267 \pm 0,115$  et  $0,3 \pm 0,1$  cm. En ce qui concerne *Palatismatia glauca* et *Xanthoria parietina*, les résultats obtenus montrent qu'elles ont toutes les deux une efficacité sur la forme résistante de *Staphylococcus aureus*  $0.2 \pm 0.173$  et  $0.467 \pm 0.115$  cm, et *Salmonella*  $0.1 \pm 0,10$  et  $0.3 \pm 0.265$  cm. Il montre que les *Proteus* sont aussi sensibles envers l'extrait de *Xanthoria parietina* ( $0.333 \pm 0.288$  cm). Les résultats suggérant ainsi un problème dans la diffusion des métabolites dans la gélose Mueller-Hinton.

Ces résultats montrent que les divers extraits lichéniques peuvent limiter la croissance cellulaire de certaines bactéries et contrairement peuvent stimuler la multiplication bactérienne des autres souches pathogènes de référence. Il existe aussi quelques limites dans l'efficacité des méthodes d'analyse utilisées, particulièrement la méthode de diffusion standard qui compose des zones d'inhibitions relativement faibles, suggérant ainsi un problème dans la diffusion des métabolites dans la gélose Mueller-Hinton.

**Branislav et al., (2009)** et par la méthode de diffusion sur disque, ils ont déterminé la sensibilité des micro-organismes à l'acétone, au méthanol et aux extraits aqueux des espèces de lichens étudiées par la mesure de la zone d'inhibition d'une concentration donnée de l'extrait et par détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI). Ils ont travaillé sur cinq types de lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*,

*Hypogymnia physodes* et *Umbilicaria polyphylla*. Les bactéries utilisées comme organismes d'essai dans cette étude sont : *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, et *Staphylococcus aureus* (bactéries à Gram positif); et *Enterobacter cloaceae*, *Escherichia coli*, et *Klebsiella pneumoniae*, (bactéries à Gram négatif).

Ils avancent que l'extrait d'acétone et de méthanol de lichen *Cladonia furcata*, inhibe toutes les bactéries testées à l'exception d'*Escherichia coli*, qui s'est avéré résistante. Les concentrations minimales inhibitrices se situaient entre 0,39 et 6,25 mg / mL d'extrait par rapport aux bactéries testées. L'extrait d'acétone a montré une activité maximale par rapport à *Bacillus subtilis*. L'extrait aqueux du lichen *Parmelia caperata* n'avait aucune activité antimicrobienne, tandis que l'extrait de méthanol inhibe la majorité des organismes testés. L'extrait d'acétone avait les plus grandes zones d'inhibition, qui étaient surtout importantes dans le cas de *Bacillus mycoides* (27 mm de diamètre), *Bacillus subtilis* (26 mm) et *Enterobacter cloaceae* (24 mm).

L'extrait aqueux du lichen *Parmelia pertusa* ne provoque aucune zone d'inhibition. L'extrait d'acétone et de méthanol de lichen *Hypogymnia physodes* ont agi sur toutes les bactéries sachant que l'extrait aqueux n'avait aucune activité antimicrobienne. Les valeurs de la CMI allaient de 1,56 mg /ml pour l'extrait d'acétone et de méthanol pour les bactéries *Enterobacter cloaceae* et *Klebsiella pneumoniae*. Les extraits d'acétone et de méthanol du lichen *Umbilicaria polyphylla* a exercé une forte action antimicrobienne sur toutes les bactéries testées. Leurs CMI variait de 0,78 à 6,25 mg / mL d'extrait par rapport aux bactéries testées. En tant que contrôle négatif, DMSO en concentration appliquée du solvant d'extrait de lichen n'a eu aucun effet inhibiteur sur les organismes testés.

Les résultats obtenus dans cette étude indiquent des différences en activité antimicrobienne entre les extraits en fonction sur l'espèce de lichen et en fonction du type de solvant d'extraction. Ces résultats sont en accord avec la suggestion de **Oloke & Kolawole (1998)**, que les composants bioactifs de toute plante médicale a une solubilité différente dans différents solvants. Les extraits aqueux ne manifestent aucune activité vis-à-vis les micro-organismes testés. Les extraits de lichens *Parmelia pertusa*, *Hypogymnie physodes* et *Umbilicaria polyphylla* avait approximativement la même activité inhibitrice contre les micro-organismes testés, mais leur extrait méthanolique a exercé une action inhibitrice plus forte que leur extraits d'acétone. Les bactéries les plus sensibles étaient *Bacillus mucoides* et *Bacillus subtilis*. En général, les bactéries Gram négatif étaient plus résistantes que Gram positif. Leurs différences de sensibilité peuvent être attribuées aux différences

morphologiques entre ces microorganismes, surtout aux différences de la perméabilité de la paroi cellulaire (Nostro et al. 2000).

Pour l'évaluation de l'effet antifongique **Amandine (2015)** sélectionnait trois espèces de lichens qui sont : *Cladonia incrassata*, *Flavoparmelia caperata*, *Usnea florida* avec *C. albicans*. Les résultats montrent que il y'a une activité fongicide dès le premier jour pour l'extrait de *C. incrassata* concentré à 0,1 %. Cette activité est moins importante pour *S. aureus*. Dans le cas des extraits de *F. caperata* et *U. florida*, aucun effet fongicide n'est observé.

Après 7 jours d'incubation, la solution à 0,1 % pour *F. caperata* et celle à 0,05 % pour *C. incrassata* montrent une activité fongistatique sur la levure avec une absence de croissance par rapport à l'inoculum. Les extraits de *C. incrassata* et en acide usnique en 0,1 % présentent des activités fongicides similaires à celle du Phénopip à 0,8% (témoin positif) sur *C. albicans* avec une diminution d'environ 3 log par rapport à l'inoculum. Ces deux solutions conduisent à une réduction logarithmique au bout de 7 jours comparable à celle recommandée par la Pharmacopée Européenne pour une période d'incubation de 14 jours (**Amandine, 2015**).

Pour les autres conditions, des concentrations en micro-organismes nettement supérieures à l'inoculum sont observées, ce qui traduit une croissance de *C. albicans* et donc aucun effet fongistatique ni fongicide.

Les résultats obtenus pour les trois concentrations des trois extraits sur *A. Brasiliensis*, c'est une légère activité fongicide pendant les premiers jours, dans le cas du Phénopip à 0,8 % contrairement aux extraits lichéniques et à l'acide usnique.

Après 7 jours d'incubation, toutes les concentrations testées pour *C. incrassata* montrent une activité fongistatique par une absence de croissance par rapport à l'inoculum. Pour l'extrait de *F. caperata* et l'acide usnique, une faible activité fongicide était observée en 0,1 %. Concernant l'extrait d'*U. Florida*, l'activité fongicide est significativement supérieure à celle de l'acide usnique pour les trois concentrations testées. Les concentrations 0,05 et 0,075 % ont un effet fongicide proche de celui du Phénopip (diminution de 1,5 log comparé à l'inoculum). Et pour la solution à 0,1 %, l'activité fongicide est supérieure à celle du Phénopip avec une diminution de plus de 2 Log par rapport à l'inoculum.

D'après le travail de **Marijana (2009)**, les extraits de lichens présentent un impact sélectif sur les champignons, comme l'extrait de lichen *Cladonia furcata*. L'extrait d'acétone et de méthanol de lichen *Hypoyimnia physodes* agit sur tous les champignons testés alors que

## Partie II : Etude comparative

---

l'extrait aqueux de lichens ne provoque aucun effet antifongique, contrairement à l'extrait de l'espèce *Parmelia cirratum* où il présentait une forte activité antifongique (**Shahi et coll, 2003**).

Pour les valeurs de la CMI pour *Candida albicans* est la plus faible (0,78 mg / mL de extrait) et le plus élevé (12,5 ml / mL) pour *Paecilomyces variotii*, *Penicillium verucosum*, et *Penicillium purpurescens*. 25 mg / mL la CMI d'extrait d'acétone pour *Aspergillus flavus*.

## CONCLUSION

Réaliser un inventaire des lichens dans les différentes régions de l'Algérie est une contribution importante à la connaissance de la flore lichénique méditerranéenne. Elle n'est pas seulement importante sur le plan écologique mais elle peut être même importante sur d'autres plans sanitaires et économiques si elle est suivie par des études visant la recherche des molécules naturelles bioactives (**Boutabia, 2016**).

La région d'El-Tarf jouie d'une biodiversité végétale considérable dont les lichens font partie. Ces derniers sont des organismes uniques, produisant les métabolites biologiquement actifs avec une grande variété d'effets. Mais sauf quelques-unes qui sont commercialisées à cause des difficultés d'extraction et d'isolement de ces composés en quantité importante.

L'étude comparative a montré que le rendement d'extraction le plus élevé a été obtenu par la méthode d'extraction séquentielle, suivie par la méthode d'extraction classique, dans le but d'extraire le plus grand nombre de métabolites lichéniques, et qu'il y'a une variété dans la composition des extraits des espèces lichéniques (*Xanthoria parietina*, *Cladina stellaris*, *Cladina Rangiferina*, *Nephroma laevigatum*), à cause d'une différence entre l'origine et/ou l'âge des échantillons de lichens (**Branislav et al., 2009**).

L'étude de l'effet antibactérien et antifongique des métabolites secondaire des espèces se fait sur des souches bactériennes souvent multi-résistantes. Selon les travaux antérieurs, les extraits d'acétone, de méthanol et de l'éthanol de lichens ont des activités antibactériennes très variables envers les différentes souches dites « pathogènes » comme les bactéries à Gram-tel que : *Escherichia coli*, *Enterobacter cloaceae* , et *Pseudomonas aeruginosa*. Ils avaient même une activité très importante contre des souches plus résistantes à Gram+ comme : *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, et *Staphylococcus aureus*. La variabilité de l'effet dépend essentiellement de la composition des extraits qui dépend à son tour de plusieurs facteurs (espèce lichénique, écologie, pollution ...etc.) et de la nature des souches cibles.

Il existe aussi quelques limites dans l'efficacité des méthodes d'analyse utilisées, particulièrement la méthode de diffusion standard qui donne des zones d'inhibitions relativement faibles, issus d'un problème dans la diffusion des métabolites dans la gélose Mueller-Hinton.

Pour les extraits aqueux, ils ne présentaient aucun effet antibactérien ni antifongique vis-à-vis des microorganismes testés et ceci selon les travaux mentionnés dans ce travail.

Concernant l'activité antifongique, les extraits des lichens présente un impact sélectif sur les champignons comme l'extrait de *Cladonia furcata* (**Branislav et al., 2009**).

A l'issue de ce travail, il est à conclure que les lichens sont des organismes particulièrement intéressants à étudier compte tenu des relations établies entre ses organismes composants (champignons, algues, cyanobactéries), mais aussi la production de métabolites bioactifs par les lichens qui présente plusieurs applications biologiques à intérêt thérapeutique. La valorisation de la flore lichénique ne se limite pas à l'inventorisation des espèces mais aussi à la recherche des différentes activités biologiques que renferment ses métabolites secondaires (**Kechkar et Ben Ahmad, 2018**).

## Références Bibliographiques :

### A

1. **Ade-Omowaye, B.I.O., Angersbach, A., Taiwo, K.A., Knorr, D., (2001).** Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends in Food Science and Technology*, volume 12, numéro 8, p. 285–295.
2. **Adriana Basile , Daniela Rigano , Stefano Loppi , Annalisa Di Santi , Angela Nebbioso , Sergio Sorbo , Barbara Conte 1, Luca Paoli , Francesca De Ruberto , Anna Maria Molinari, Lucia Altucci , and Paola Bontempo ,** Antiproliferative, Antibacterial and Antifungal Activity of the Lichen *Xanthoria parietina* and Its Secondary Metabolite Parietin *Int.J.Mol. Sci.* (2015), 16, 7861-7875p; doi:10.3390/ijms16047861.
3. **Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., S. Godbout, S., Valéro, J.R. (2010).** Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, volume 31, numéro 3, p. 227–249.
4. **Alcama (1984).** *Evaluation chimique et activite d'algerie antibacterienne de quelques plantes medicinales* : sciences. Constantine : Institut des sciences veterinaires, 2014, 148p.
5. **Alupului, A. (2012).** Microwave extraction of active principles from medicinal plants. *U.P.B. Science Bulletin, Series B*, volume 74, numéro 2.
6. **Amandine, D.** Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *VERSITA*, 2009, 53-58.  
Amsterdam; Boston, 2004, p. 480.67.
7. **Andrews (2001).** *Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique : Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique de deux composés actifs*. Thèse de doctorat : chimie des substances naturelles. Paris : école doctorale 523 « GAY LUSSAC », 2015, 341p.
8. **Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N, Omar, A.K.M. (2013).** Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, volume 17, p. 426-436.

### B

9. **Bate.,Smith, E.C.,Swain, T.,,** Flavanoid Compounds in Comparative Biochemistry., Academic press, New-York, 1962,3,p. 755-809.
10. **Boutabia L, 2016 .** *Etude systématique et bioécologique des lichens corticoles de différents phorophytes au niveau de la région d'El Kala (Nord-Est algérien)*. Thèse de doctorat : biologie végétale. Annaba : faculté des sciences, 167 p.
11. **Branislav Rankovi, Marijana Miši´ & Slobodan Sukdolak .** Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla*. *Versita*. 2009, p, 53-58.

- 12. Bégin D., Gérin M. (2002)** Les Grandes Familles de Solvants Organiques, Utilisation et Aspects Physico-Chimiques. *In: Gérin M. (Ed) Solvants industriels: Santé, Sécurité, Substitution.* Masson, Paris. p13-38.
- 13. Behera, S., Arora, R., Nandhagopal, N., Kumar, S. (2014).** Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, volume 36, p. 91-106.
- 14. Bell, E.A (1980) .** *Etude de la production de métabolites secondaires par des cultures in vitro de Psoralées (Leguminosae).* Thèse de doctorat : Sciences Agronomiques. Paris : Ecole Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, 1997, 266 p.
- 15. Bellenfant S., Vallade J., Beguinot J., Sirugue D., Lemmel C., et le Groupe Lichens de Bourgogne (GLIB). (2010).**, Les lichens une symbiose exemplaire Textes et illustrations. *Rev. sci. Bourgogne-Nature - 12-2010*, 30-45.
- 16. BERNARD, L., 2011** –Les lichens. Association Française de Lichénologie (AFL), Paris. P 19 Guide des lichens. Edition Lechevalier. Paris .344p.
- 17. Bisoli, E., Garcez, W. S., Hamerski, L., Tieppo, C., & Garcez, F. R. (2008).** Bioactive pentacyclic triterpenes from the stems of *Combretum laxum*. *Molecules*, 13(11), 2717-2728.
- 18. Bocchio E., 1985-** Natural essentials oils. *Parfums Cosmét. Arômes.* 63 : 61.
- 19. Boitel-Conti, M ., Laberche, J.C., Ducrocq, C., Sangwan-Norrel, B.S(1995a)** in Vu Thi Dao. *Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez Datura innoxia Mill.cultivé en condition hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques.*Thèse de doctorat : sciences agronomiques.Lorraine :Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires , 2008, 238 p.
- 20. Bourgaud, F., Gravot, A., Gontier, E (2001)** in Vu Thi Dao. *Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez Datura innoxia Mill.cultivé en condition hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques.*Thèse de doctorat : sciences agronomiques.Lorraine :Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires , 2008, 238 p.
- 21. Bruice, P. Y.; 1998,** *Organic Chemistry.* 2e Édition, Prentice Hall, New York, 1256 pages.
- 22. Bruneton J. ; 1999.** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales* Techniques et Documentation. 3ème Ed. Lavoisier. Paris, 199-388.
- 23. Bruneton, J. (2009).** *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.).* Lavoisier.
- 24. Bruneton, P.; 1999,** *Pharmacognosie. phytochimie. plantes médicinales.* 3e édition, Édition Médicales Internationales Cachan, France, 1120 pages.
- 25. Bryant, G. et Wolfe, J. (1987).** Electromechanical stress produced in the plasma membranes of suspended cells by applied electrical fields. *Journal of Membrane Biology*, volume 96, numéro 2, p. 129–139.

## C

- 26. Camel, V. (2001)** Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst*, 126(7), 1182-1193.

- 27. Cardinale. M, Puglia. A. M, Grube. M,** Molecular Analysis of lichen-associated bacterial communities .Federation of European Microbiological Societies Microbiology Ecology 2006. 57 : 484-495.
- 28. Chemat F., 2011-** Eco-extraction du végétal procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod, Paris.
- 29. Clauzade, G et Roux, C (1987).** *Etude systématique et bioécologique des lichens corticoles de différents phorophytes au niveau de la région d'El Kala (Nord-Est algérien).*Thèse de doctorat : biologie végétale.Annaba : faculté des sciences, 2016, 167 p.
- 30. COSTE, C., 2009-** Inventaire préliminaire des lichens et des communautés lichéniques de la réserve naturelle des Gorges du Gardon. Bulletin de la société d'étude des sciences naturelles de Nimes et du Gard. Pp : 34-37. Guide des lichens. Edition Lechevalier. Paris .344p.
- 31. Culberson C.F., Elix J. A., (1989).** Lichen substances. In Methods in Plant Biochemistry. Volume 1, *Plant Phenolics*, Harborne, Ed. 1989, pp 509-536.
- 32. Culberson, C. F. & Ahmadjian, V.; 1980,** Artificial reestablishment of the lichens. II. Secondary products of resynthesized *Cladonia cristatella* and *Lecanora chrysoleuca*. *Mycologia*, 72, 90-109.
- 33. Culberson, C. F. & Elix, J. A.; 1989,** Lichens Substances. *Methods in Plant Biochemistry*, 1, 309-535.
- 34. Culberson, C. F.; 1969,** Chemical and botanical guide to lichen products. University of North Carolina Press, 628 pages.
- 35. Culberson, C. F.; Culberson, W. L. & Johnson, A.; 1977,** Thermally induced chemical artifacts in lichens, *Phytochemistry*. 16, 127-130.

#### D

- 36. Demeyer, K et Dejaegere, R (1997)** in Vu Thi Dao. *Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez Datura innoxia Mill.cultivé en condition hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques.*Thèse de doctorat : sciences agronomiques.Lorraine : Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires, 2008, 238 p.
- 37. Des Abbayes, H (1951).** *Etude systématique et bioécologique des lichens corticoles de différents phorophytes au niveau de la région d'El Kala (Nord-Est algérien).*Thèse de doctorat : biologie végétale.Annaba : faculté des sciences, 2016, 167p.
- 38. Des Abbayes, H (1978) .** *Analyses taxonomique et ecologique des lichens de la région de Tiaret.*Thèse de doctorat : biologie.Oran : faculté des sciences de la nature et de la vie, 2015, 326 p.
- 39. des Abbayes, H. (2010).** Lichens. *Encyclopædia Universalis [DVD]*.
- 40. Dewick, P. M.** Medicinal Natural Products, Chapter 2 : Secondary metabolism : the building blocks and construction mechanisms, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, United Kingdom, 2002.

#### E

- 41. El kalamouni C, Marzouk B, Menut C. 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits des plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Thèse de Doctorats, Université de Toulouse.

- 42. El-Belghiti, K., Rabhi, Z., Vorobiev, E. (2005).** Kinetic model of sugar diffusion from sugar beet tissue treated by pulsed electric field. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, volume 85, numéro 2, p213-218.
- 43. Elix, J. A. (1996).** Biochemistry and secondary metabolites. *Lichen Biology*. T. H. Nash. Cambridge,, Cambridge University Press: 154-180.
- 44. Elix, J. A.; 1984,** Recent progress in the chemistry of the lichen substances. *Progress in the chemistry of organic natural products*, 45c, 103-234.
- 45. Elix, J. A.; Stocker-Wörgötter, E. Lichen Biology**, 2nd ed; Nash, T. H. Cambridge University Press, New York, 2008.
- 46. Elkalamouni C., 2010 -** Caractérisation chimique et bio organiques d'extraits de plantes aromatiques. Thèse de doctorat en sciences des agroressources université de Toulouse.375p.
- 47. Euzéby JP. 2009.** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Evaluation *in vitro* de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.

#### F

- 48. Fahselt, D.; 1981,** Lichen product of *Cladonia stellaris* and *C. rangiferina* maintained under artificial conditions. *Lichenologist*, 13 (1), 87-91.
- 49. Fahselt, D.; 1994,** Secondary biochemistry of lichens. *Symbiosis*, 16, 117-165.
- 50. Farou. J.L, Guerin .J.F,** Les lichens indicateurs environnementaux, palnte & cité 2015, 1-7.
- 51. Faurel (1950-1954)** in Merabti. *Inventaire des lichens de la région Est d'Alger et leurs utilisations comme bioindicateurs de la pollution atmosphérique* (en ligne).2018, 326 p. Disponible sur : <http://fsnv.univ-tiaret.dz/index.php/13-la-revue/10-la-revue>.
- 52. Ferron (1976)** in Kahlouche-Riachi Foulla. *Evaluation chimique et activite d'algerie antibacterienne de quelques plantes medicinales* : sciences. Constantine : Institut des sciences vétérinaires, 2014, 148p.
- 53. Felcykowska Fabio Candotto Carniel, Elisa pellegrini, Federica Bove, Matteo Crosera, Gianpiero Adami, Cristina Nali, Giacomo Lorenzini and Mauro Tretiach:** Acetone washing for the removal of lichen substances affects membrane permeability. *The Lichenologist* 49(4): 387–395, (2017).
- 54. Frey E (1970).** *Etude systématique et bioécologique des lichens corticoles de différents phorophytes au niveau de la région d'El Kala (Nord-Est algérien)*.Thèse de doctorat : biologie végétale. Annaba : faculté des sciences, 2016, 167 p.

#### G

- 55. Garnero J., 1985-** Semipreparitive separation of terpenoids from essential oil. *Phytotherapy*. 15 : 19
- 56. Gazanhes, C. et Jessel, M. (1970).** Ultrasons. Dans *Techniques de l'ingénieur – Archives électroniques*, référence : e2690.
- 57. Gérin M. (2002)** Solvants et Prévention : Nouvelles Perspectives. *In: Gérin M. (Ed) Solvants industriels: Santé, Sécurité, Substitution*. Masson, Paris. p1-12.

- 58. Ghestem A., Segun E. Paris M., Orecchioni A-M.** (2001).Le préparateur En Pharmacie: Botanique-pharmacognosie Phytothérapie –Homéopathie. Lavoisier Tec et Doc, paris ,273p.
- 59. Gil-Chavez, G.J., Villa, J.A., Ayala-Zavala, F., Heredia, J.B., Sepulveda, D., Yahia, E.M., Gonzalez-Aguilar, G.A.** (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, volume12, p. 5-23.
- 60. Gontier, E(2001).** *Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez Datura innoxia Mill.cultivé en condition hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques.*Thèse de doctorat : sciences agronomiques.Lorraine : Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires , 2008, 21 p.
- 61. Guérin-Faubleé V, Carret.** 1999. L'antibiogramme : principes, méthodologie, intérêt et limites. *Journées nationales GTV-INRA*, 5-12.
- 62. Guignard (1996).** *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.* Écologie et chimie des substances naturelles .Paris.2003, 348p.

## H

- 63. Hajji S., Belivea J., Simon D., 1985-** Comparative study of an essential oil obtained according to two different extraction procedures: stean distillation and hydro diffusion (Actes –colloq. Int. plant. aromat.med .maroc.pp229.230.
- 64. Hale, M. E.; 1969,** How to know the lichens, 2e Édition, Wm. C. Brown Company Publishers, Dubuque, 246 pages.
- 65. Hess, M.** Alkaloids, Nature's Curse or Blessing, lière dition, Wiley-VCH, New York, 2002. P I - 297.
- 66. Hocquemiller, R., Cave, A., Jacquemin, H., Touche, A., & Forgacs, P. (1982).** Alcaloides des annonacées. Xxxvi (alcaloides de l'*Annona crassiflora* mart). *Plantes medicinales et phytotherapie*. Tome XVI, 1, p. 4-6
- 67. Honkanen, E. & Moisiso, T.; 1963,** Mass spectra of seven isomeric hexen-1-ols. *Acta Chemica Scandinavica*, 17 (7), 2051-2054.
- 68. Hu, J., Shi, X., Chen, J., Mao, X., Zhu, L., Xu, L.& Shi, J (2015) .** *Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée : approches biochimique et moléculaire.*Thèse de doctorat : ingénierie des fonctions biologiques. Lille : Ecole doctorale sciences de la matière, du rayonnement et de l'environnement, 2015, 348p.
- 69. Huneck S, (2001).** New Results on the Chemistry of Lichen Substances. In: Progress in the chemistry of organic natural products, Herz W, Falk H, Kirby AW, Moore RE, 81 editors, Springer-Verlag Wien GmbH.New York, pp224-230.
- 70. Huneck S, Yoshimura I, (1996).** Identification of Lichen Substances. Heidelberg: Springer Verlag, Berlin 493 p.
- 71. Huneck, S. & Yoshimura, L; 1996,** Identification of lichen substances. Springer Verlag, Berlin, 493 pages.

- 72. Huneck, S.; (1999),** The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 86, 559-570p.
- 73. Huovinen, K.; 1985,** Variation of lichen acids in *Cladina stellaris* and *Cladina ransiferina* in Finland and north Norway. *Ada Pharmaceutica Fennice*, 94, 113-123.
- 74. Huovinen, K; Hiltunen, R. & Von Schartz, M.; 1985,** A high performance liquid chromatographic method for the analysis of lichen compounds from the genera *Cladina* and *Cladonia*. *Ada Pharmaceutica Fennice*, 94, 99-112.

#### I

- 75. Inczedy, J., Lengyel, T., Ure, A.M. (1998).** *Supercritical Fluid Chromatography and Extraction. Compendium of Analytical Nomenclature (Definitive Rules 1997)*, third ed. Blackwell Science.
- 76. Ismed, F.** Phytochimie de lichens du genre *Stereocaulon* : étude particulière de *S. Halei Lamb* et *S. montagneanum Lamb*, deux lichens recoltés en Indonésie, Ph.D. Dissertation, Université de Rennes, France, Rennes, 2012.

#### J

- 77. Jahns, H. M. (2007).** *Guide Des Fougères, Mousses et Lichens d'Europe*. Delachaux et Niestlé SA, Paris.
- 78. Judd W.S. Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F. 2002.** Botanique Systématique. Une perspective phylogénétique. 1ère Edition De Boeck Université. Paris, 383.

#### K

- 79. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL, 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. Center for Vaccine Development, Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland 21201, USA.
- 80. Kaufmann, B. and Christen, P. (2002)** Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105-113.
- 81. Kechkar A et Ben Ahmad K ,2018.** *Caractéristiques phytochimiques et activité anti inflammatoire de lichen*. Mémoire de master en biochimie appliquée. Constantine : faculté des frères Mentouri Constantine 1, 63p.
- 82. Kirkelund Hansen, Rainey. R. B, Haagensen. J. A. J, Molin. S,** Evolution of species interactions in biofilm community .*Nature* 2007, 445: 533-536.
- 83. Kout M et Chihel A, 2018.** *Activité antibactérienne et caractéristiques phytochimiques des lichens issus de l'est algérien*. Biochimie Appliquée. Constantine : Université des Frères Mentouri, 62p.

#### L

- 84. La Ginika L., 2005** -Étude photochimique et activité biologique de substances naturelle isolée de Béninoise thèse de doctorat en science pharmaceutique. Université Ionis Pasteur Strasbourg, 267p.
- 85. Lagarde A, 2017.** *Études phytochimiques du lichen *Nephroma laevigatum* et de ses champignons endolichéniques. Évaluation des activités antiprolifératives et anti*

*biofilms*.Thèse de Doctorat : Chimie appliquée / Chimie des substances naturelles. Limoges : Université de Limoges,230p.

- 86. Lambert, J. B.; Shurvell, H. F.; Lihtner, D. A. & Cooks, R. G.; 1998**, Organic structural spectroscopy. Prentice Hall, Upper Saddle River, 568 pages.
- 87. Lang, Q. et Wai, C.M. (2001)**. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies— a practical review. *Talanta*, volume 53, numéro 4, p. 771–782.
- 88. Latif, S. et Anwar, F. (2009)**. Physicochemical studies of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil using enzyme-assisted cold-pressing. *European Journal of Lipid Science and Technology*, volume 111, numéro 10, p. 1042–1048.
- 89. Leblanc, J (2001)** .*Etude systématique et bioécologique des lichens corticoles de différents phorophytes au niveau de la région d'El Kala (Nord-Est algérien)*.Thèse de doctorat : biologie végétale.Annaba : faculté des sciences, 2016, 167p.
- 90. Leclerc (1975)**. *Evaluation chimique et activite d'algerie antibacterienne de quelques plantes medicinales* : sciences. Constantine : Institut des sciences veterinaires, 2014, 148p.
- 91. Legac (2006)**. *Analyses taxonomique et ecologique des lichens de la région de Tiaret*.Thèse de doctorat : biologie.Oran : faculté des sciences de la nature et de la vie, 2015, 326 p.
- 92. Linde, M., Jakobsson, E.L., Galbe, M., Zacchi, G. (2007)**. Steam pretreatment of dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass Bioenergy*, volume 32, p. 326–32.
- 93. Luicita. lagunez rivera. 2006**. Etude de l'extraction de métabolites secondaires de différentes matières végétales en réacteur chauffe par induction thermomagnétique directe. Thèse de l'institut national polytechnique de Toulouse, France.

## M

- 94. Malamy, J., Carr, J.P., Klessig.D.F., Raskin.I (1990)**. *Etude de la production de métabolites secondaires par des cultures in vitro de Psoralées (Leguminosae)*.Thèse de doctorat : Sciences Agronomiques. Paris : Ecole Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires, 1997, 266 p.
- 95. Marrouf A., Tremblin G., 2009-** Abrégé de biochimie appliqué, EDP science.
- 96. Mauro Tretiach:** Acetone washing for the removal of lichen substances affects membrane permeability.*The Lichenologist* 49(4): 387–395, (2017).
- 97. Michel, T., Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: application aux molécules bioactives de l'argousier (Hippophae rhamnoides)**, 2011, Université d'Orléans. Microbiologie. de boeck. pp.835-834.
- 98. Mirando, M. & Fahselt, D.; 1978**, the effects of thallus age and drying procedure on extractable lichen substances. *Canadian Journal of Botany*, 56, 1499-1504.
- 99. Mohammedi Z., 2004-** Etude de pouvoir antimicrobien et anti oxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelque plantes de la région de Tlemcen thèse de magistère en biologie option : produits naturels, activité biologique et synthèse .université de Tlemcen 155p.

## N

- 100. Nait Achour K., 2012-** *Etude de la composition chimique des essence de quatre espèce eucalyptus poussent dans la région de tizi ousou.* mémoire de magistère.université mouloud Mammeri tizi ousou.
- 101. Nccls (1997).** *Recherche et évaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes médicinales.*Thèse de doctorat : Medecine. Marrakech : faculté de medecine et de pharmacie, 2013, 4p.
- 102. Ndiomu, D.P. et Simpson, C.F. (1988).** Some applications of supercritical fluid extraction. *Analytica Chimica Acta*, volume 213, p. 237–243.
- 103. Nieto, A., Borruell, F., Pocurull, E., Marce, R.M. (2010).** Pressurized liquid extraction: a useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. *Trends in Analytical Chemistry*, volume 29, numéro 7, p.752–764.
- 104. Niranjana, K. et Hanmoungjai, P. (2004).** Enzyme-aided aqueous extraction. In: Dunford, N.T., Dunford, H.B. (Eds.), *Nutritionally Enhanced Edible Oil Processing*. AOCS Publishing.

## O

- 105. Ozenda, P et Clauzade, G (1970).** *Etude systématique et bioécologique des lichens corticoles de différents phorophytes au niveau de la région d'El Kala (Nord-Est algérien).*Thèse de doctorat : biologie végétale.Annaba : faculté des sciences, 2016, 167p.

## P

- 106. Paolini V., D'Orchies Ph., Hoste H. ; 2003.** Effet des tanins condensés et Des plantes à Tannins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le Mouton et la chèvre. *Alter. Agri.* 17-19.
- 107. Pathak, M.A., Farrington, D.J & Fitzpatrick, T.B (1962) .** *Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez Datura innoxia Mill.cultivé en condition hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques.*Thèse de doctorat : sciences agronomiques.Lorraine : Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires, 2008, 238 p.
- 108. Percival SL.** *Microbiology of waterborne diseases.* Ed. Elsevier Academic Press,
- 109. Pétrier, C., Gondrexon, N. and Boldo, P. (2008)** Ultrasons et sonochimie. *Techniques de l'ingénieur*, AF6310, 1-14.
- 110. Prescott ML, Harley JP, Klein DA, Willey MJ, Sherwood ML, Woolverton JC. 2010.** *Microbiologie. de boeck.* pp.835-834.

## Q

- 111. Quan V Vuong., Hirun S., Paul D.Roach., Michael C.Bowyer., Phoebe A. Phillips and Christopher J.Scarlett. (2013)** Effect of extraction conditions on total phenolic compound and antioxidant activities of Carica papaya leaf aqueous extracts, *journal of herbal medicine.* 3: 104–111.

## R

- 112. Rahali, M (2006).** *Inventaire des lichens de la région Est d'Alger et leurs utilisations comme bioindicateurs de la pollution atmosphérique* (en ligne).2018, 326 p. Disponible sur : <http://fsnv.univ-tiaret.dz/index.php/13-la-revue/10-la-revue>.
- 113. Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. E., Bouharmont J. (2003).** Biologie végétale, De Boeck Université, 968 p.
- 114. Raven, H., Evert, R.F., Eichhorn S.E (2000).** *Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez Datura innoxia Mill.cultivé en condition hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques.*Thèse de doctorat : sciences agronomiques.Lorraine :Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires , 2008, 238 p.
- 115. Reverchon, E. et De Marco, I. (2006).** Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, volume 38, numéro 2, p. 146-166.
- 116. Rios J L ., Recio MC., Villar A (1988).** *Evaluation chimique et activite d'algerie antibacterienne de quelques plantes medicinales : sciences.* Constantine : Institut des sciences vétérinaires, 2014, 148p.
- 117. Rios JL., Recio MC., Villar A (1988)** *Recherche de molécules antimicrobiennes d'origine lichénique : Etude phytochimique de trois lichens & approche synthétique de deux composés actifs.*Thèse de doctorat : chimie des substances naturelles. Paris : école doctorale 523 « GAY LUSSAC », 2015, 341p.
- 118. Rispaill. Robertn. Judithk., 2005-** Secondary metabolite profiling pp341.348.
- 119. Romdhane M., 1993-** Extraction solide liquide sous ultrasons, INPT, in thèse doctorat de l'université Toulouse.
- 120. Ryphage, R. & Sydow, E.; 1963,** Mass spectrometry of terpenes. I. Monoterpene hydrocarbons. *Acta Chemica Scandinavica*, 17 (7), 2025-2035.

## S

- 121. Sallas, L., Kainulainen, P., Utriainen, J., Holopainen, T. et Holopainen, J.K (2001).** *Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez Datura innoxia Mill.cultivé en condition hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques.*Thèse de doctorat : sciences agronomiques.Lorraine : Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires, 2008, 238p.
- 122. Scherrmann M.-C., Malacria M., Goddard J.-P., Ollivier C. (2008)** Chimie dans l'Eau (K1210). Editions Techniques de l'Ingénieur, Paris, France.
- 123. Schöller (1997).** *Analyses taxonomique et ecologique des lichens de la région de Tiaret.*Thèse de doctorat : biologie.Oran : faculté des sciences de la nature et de la vie, 2015, 326 p.
- 124. Schultz, J. & Mosbach, K.; 1971,** Studies on lichen enzymes. Purification and properties of an orcellinate depside hydrolase obtained from *Lassallia pustulata*. *Journal of European Biochemistry*, 22, 153-157.
- 125. Segneanu, A.-E., Cziple, F., Vlaza, P., Sfirloaga, P., Grozescu, I., Gherman, V.D. (2013).** *Biomass now – Sustainable growth and use, Chapitre 15: Biomass extraction methods*, InTech, p. 389-400. <http://dx.doi.org/10.5772/55338>.

- 126. Setzer, W.N. and Vogler, B., (2006)**, Bioassays for activity. In *Natural products from plants*, Taylor & Francis, 2ème éd., New York, pp.
- 127. Sihvonen, M., Jarvenpaa, E., Hietaniemi, V., Huopalahti, R., (1999)**. Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends in Food Science and Technology*, volume 10, numéro 6–7, p. 217–222.
- 128. Silva, L.V., Nelson, D.L., Drummond, M.F.B., Dufosse, L., Gloria, M.B.A., (2005)** Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International*, volume 38, numéro 8–9, p. 1087–1096.
- 129. Sindhu, R., Binod, P., Pandey, A. (2016)**. Biological pretreatment of lignocellulosic biomass – An overview. *Bioresource Technology*, volume 199, p. 76-82.
- 130.** Société Française d'acoustique (2010). *Le livre blanc de l'acoustique en France en 2010 – Chapitre 3 - Ultrasons*, édition SFA, p.76-82.
- 131. Somssich, I.E et Hahlbrock, K(1998)** . *Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez Datura innoxia Mill.cultivé en condition hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques*.Thèse de doctorat : sciences agronomiques.Lorraine : Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires, 2008, 238 p.
- 132. SOUCHON, CH., 1971-** Les lichens. Que-sais-je ? Presses universitaires de France. N° 1434. 124p.
- 133. Soxhlet, F.** Die gewichtsanalytische bestimmung des milchfettes. *Dingler's Polytech.* J 1879, 232, 461–465.
- 134. Sparr Eskilsson, C. and Björklund, E. (2000)** Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- 135. Stalikas C D (2007)** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 3268–3295.
- 136. Stead, P.; Silva, G. 1.; Lee, I. S.; Kinghorn, D. A.; & Wright, A. E.; 1998**, Natural products isolation, (éd. Canell, R. J. P.); Humana Press, Totowa, 473 pages.
- 137. Stephenson, N. L. & Rundel, P. W.; 1979**, Quantitative variation and the ecological role of vulpinic acid and atranorin in the thallus of *Letharia vulpina*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 7, 263-267.
- 138. Stocker-Wörgötter, E., Mach Cortes Cordeiro, L., Lacomini, M. (2013)**. Studies in Natural Products Chemistry, 39, 337-380.

#### T

- 139. Teglbjerg, R et Julkumen-Tiitto, R (2001)**. *Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez Datura innoxia Mill.cultivé en condition hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques*.Thèse de doctorat : sciences agronomiques.Lorraine : Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires, 2008, 238 p.
- 140. Tievant, P (2001)**. *Analyses taxonomique et ecologique des lichens de la région de Tiaret*.Thèse de doctorat : biologie.Oran : faculté des sciences de la nature et de la vie, 2015, 326 p.

**141. Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V., Knorr, D. (2006).** Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficiency and environmentally friendly food processing. *Food Review International*, volume 22, numéro 4, p.405–423.

**142. Tournaire G., 1980-** Parfums Cosmét. Arômes. 35: 43.

#### V

**143. Van Haluwyn, C., Asta, J., and Gavériaux, J.-P. (2009).** Guide des lichens de France - Lichens des arbres (Belin).

**144. Van Haluwyn, C et Lerond, M (1993) .** *Etude systématique et bioécologique des lichens corticoles de différents phorophytes au niveau de la région d'El Kala (Nord-Est algérien)*.Thèse de doctorat : biologie végétale.Annaba : faculté des sciences, 2016,167p.

**145. Van Haluwyn, C et Lerond, M (2009).** *Etude systématique et bioécologique des lichens corticoles de différents phorophytes au niveau de la région d'El Kala (Nord-Est algérien)*.Thèse de doctorat : biologie végétale.Annaba : faculté des sciences, 2016, 167 p.

**146. Van haluwyn, c. Et Lerond, M., 1993-** Guide des lichens. Edtion Lechevalier. Paris .344p.

**147. Vankar, P.S., (2004).** Essential oils and fragrances from natural sources. *Resonance*, volume 9, numéro 4, p. 30–41.

**148. Vu, T. H.** Thèse de doctorat, Etude des acides gras du genre *Stereocaulon* et étude phytochimique du lichen *S. evolutum* Graewe, Ph.D. Dissertation, Université de Rennes, France, Rennes, 2014.

#### W

**149. Wang, L. and Weller, C.L. (2006)** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.

**150. Wivecke, D.** *Contribution à l'étude des métabolites secondaires chez les lichens fruticuleux *Cladonia stellaris* et *Cladonia rangiferina**. Biochimie. Chicoutimi : Université du Québec à Chicoutimi, 2003,212p.

#### Y

**151. Yang, D., Mei, W., Wang, H. & Dai, H (2010).** *Contribution à la caractérisation du métabolisme des acides chlorogéniques chez la chicorée : approches biochimique et moléculaire*.Thèse de doctorat : ingénierie des fonctions biologiques. Lille : Ecole doctorale sciences de la matière, du rayonnement et de l'environnement, 2015, 348 p.

**152. Yuan. X, Xiao. S, Taylor. T. N,** lichene like symbiosis 600 million ago. *Science* 2005, 308,1017-1020.

#### Z

**153. Ziegler, J et Facchini, PJ (2008).** *Recherche d'activités biologiques de *Berberis vulgaris**.Mémoire de magister en biologie.Tlemcen : Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et de l'univers, 2013, 122p.

**154. Zobel, A.M.et Brown, S.A (1990).** *Effet de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites scondaires chez *Datura innoxia* Mill.cultivé en condition hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques*.Thèse de doctorat : sciences

agronomiques.Lorraine : Ecole nationale supérieure d'agronomie et des industries alimentaires, 2008, 238 p.

**155. Zosel, K., (1964).** Brevet allemand, 1493,190.

**Les Sites Internet:**

1. Source : <http://www.dr-ralf-wagner.de>
2. <http://www.biologydiscussion.com/notes/lichens/lichens-meaning-characteristics-and-classification/46549>
3. . <http://fr.nextews.com/954a1681/>
4. [www.wikipédia.fr](http://www.wikipédia.fr) (Accès en Juillet 2014)
5. <https://www.fs.fed.us/database/feis/lichens/claspp/claste.jpg>
6. <https://alchetron.com/cdn/cladonia-rangiferina-d40ec56e-0ba6-4162-b55821260a4d997-resize-750.jpeg>

