

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de  
la Recherche Scientifique**

**Université Mouloud MAMMERRI de Tizi-Ouzou**

**Faculté des Sciences Biologiques et des sciences Agronomiques**

**Département de Biologie**



# Mémoire

**De Fin de d'études**

En vue de l'Obtention du

Diplôme de MASTER en biologie

Spécialité : *Génétique et Amélioration des Plantes*

## Thème

**Extraction de l'acide usnique à partir de trois espèces lichéniques  
(*Evernia prunastri*, *Ramalina farinacea* et *Cladonia rangiformis*) et  
identification de ce composé par deux méthodes: la  
chromatographie sur couche mince et la microcristallisation**

Présenté par :

**HAMZAOUI Taous**

**ISSAADI Lynda**

Soutenu devant le jury :

Présidente : M<sup>me</sup> HEDJAL.M

MCCA.UMMTO

Promotrice : M<sup>me</sup> SAHMOUNE.F

MACA.UMMTO

Examineur : M<sup>r</sup> MEDJBEUR.Dj.

MACA.UMMTO

Examinatrice : M<sup>me</sup> ABDELAOUI.K

MACA.UMMTO

**Promotion : 2015/2016**

## *Remerciements*

Au terme de ce modeste travail, nous tenons à remercier **Dieu** de nous avoir mis sur la voie des études et de nous avoir donné la volonté et le courage de mener à terme ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre promotrice **M<sup>me</sup> SEHMOUNE.F** pour ses conseils et sa disponibilité lors de l'élaboration de ce mémoire de fin d'études.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent aux membres du jury ; à **M<sup>me</sup> HEDJAL.M** D'avoir accepté de présider ce jury, à **M<sup>me</sup> ABDELAOUL.K** et **M<sup>r</sup> MEDJBEUR.DJ** de nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs critiques constructives.

Nous remercions chaque personne ayant contribué à la réalisation de notre travail : **M<sup>me</sup> LAHCEN.H**, **M<sup>r</sup> MEDJBEUR.DJ** et **M<sup>me</sup> AMAR KHOUDJA** pour leurs aides.

.Sans oublier nous enseignants qui nous ont suivis tout au long de notre parcours, aux quels revient le mérite de notre réussite.

Enfin nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents, qui m' ont soutenu et  
encouragé durant ce parcours, je les remercierais  
jamais assez

A mes très chers frères : *Ahmed, Djamel, Madjid.*

A mes très chères tentes.

A mon binôme *Taous, A Razika et Sonia*

A tous ceux et celles qui m' ont offert amitié et  
soutien.

A toutes la spéciale promotion 2015/2016.

*J. Lynda*

A decorative border of pearls and roses surrounds the text. The top and right sides feature a row of large pearls, while the bottom and left sides feature a row of smaller pearls. On the left side, there are several roses: a red one at the top, a white one in the middle, and another white one at the bottom right. The roses are detailed with green leaves and water droplets.

# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le  
symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et  
ma réussite, à ma mère*

*A mon cher père, école de mon enfance, qui a été mon ombre  
durant*

*toutes les années d'études, et qui a veillé tout au long de ma  
vie*

*à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger.*

*Que dieu les gardes et les protège.*

*A mes adorables sœurs que j'aime beaucoup Sonia, Samia et  
Dihia et leurs maris Rabah, Ali et Azedine*

*A mon très cher frère Zahir que je respecte beaucoup*

*A mes neveux Rayane, Merièm, Assia, Lamia, Myassa,  
Zineb*

*A mes cousines Lamia, Wardia, Fatiha, Yasmina, Fazia*

*A ma tante Elouiz*

*A celle que je considère une sœur mon binôme Lynda*

*A mes amies Sonia, Razika, Radia, Katia, Nassima,  
Mellissa, Sara, Baya.*

*A mon très cher ami Rafik qui ma beaucoup encourager*

*A tous ceux qui me sont chères*

*Je dédie ce travail.*

*Taous*

<b>Figure 01</b> : Thalle fruticuleux.....	6
<b>Figure 02</b> : Thalle foliacé.....	6
<b>Figure 03</b> : Thalle squamuleux.....	6
<b>Figure 04</b> : Thalle crustacé.....	6
<b>Figure 05</b> : Thalle gélatineux.....	6
<b>Figure 06</b> : Thalle complexe.....	6
<b>Figure 07</b> : structure homéomère coupe transversale du thalle .....	8
<b>Figure 08</b> : structure hétéromère stratifiée coupe transversale du thalle .....	9
<b>Figure 09</b> : structure hétéromère radiée coupe transversale du thalle.....	10
<b>Figure 10</b> : Structure des deux énantiomères de l'acide usnique.....	19
<b>Figure 11</b> : Structure des acides D-(9b-R) usnique et L-(9b-S) usnique (1) et structure des acides D-(9b-R) et L-(9b-S) isousnique(2) .....	21
<b>Figure 12</b> : biogénèse des substances lichéniques .....	22
<b>Figure 13</b> : Situation géographique de la station d'étude Tikjda.....	33
<b>Figure 14</b> : Situation géographique de la station d'étude Taksebt.....	34
<b>Figure 15</b> : <i>Evernia prunastri</i> à thalle fruticuleux .....	35
<b>Figure 16</b> : <i>Ramalina farinacea</i> à thalle fruticuleux.....	36
<b>Figure 17</b> : <i>Cladonia rangiformis</i> à thalle fruticuleux .....	37
<b>Figure 18</b> : Thalle broyé d' <i>Evernia prunastri</i> récolté à 1260 m .....	39
<b>Figure 19</b> : Thalle broyé d' <i>Evernia prunastri</i> récolté à 1280 m.....	40
<b>Figure 20</b> : Thalle broyé de <i>Cladonia rangiformis</i> récolté à 200m .....	40
<b>Figure 21</b> : Thalle broyé de <i>Ramalina farinacea</i> récolté à 1280 m .....	41
<b>Figure 22</b> : Thalle broyé de <i>Ramalina farinacea</i> récolté à 1360 m .....	41

<b>Figure 23</b> : Macération pendant 3 heures dans l'acétone.....	42
<b>Figure 24</b> : Profil chromatographique avec comme phase mobile (130 ml Hexane, 20 ml d'A. Formique, 80 ml de Diethylether) et révélée avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 10% .....	46
<b>Figure 25</b> : Profil chromatographique avec comme phase mobile (130 ml Hexane, 20 ml d'A. Formique, 80 ml de Diethylether) et révélée avec FeCl <sub>3</sub> à 1% .....	49
<b>Figure 26</b> : Profil chromatographique avec comme phase mobile (200 ml Toluène et 30 ml d'A. Acétique) révélée avec FeCl <sub>3</sub> à 1% .....	51

<b>Tableau 01</b> : Résultats d'une CCM avec comme phase mobile (130 ml d'Hexane, 20 ml d'A.Formique, 80 ml de Diethylether) et révélée avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> à 10% .....	45
<b>Tableau 02</b> : Résultats d'une CCM avec comme phase mobile (130 ml d'Hexane, 20 ml d'A.Formique, 80 ml de Diethylether) et révélée avec FeCl <sub>3</sub> à 1% .....	47
<b>Tableau 03</b> : Résultats d'une CCM avec comme phase mobile (200 ml de Toluène et 30 ml d'A. Acétique) révélée avec FeCl <sub>3</sub> à 1% .....	50

**1** : Composé majoritaire de *Ramlina farinacea* récolté à 1360 m.

**1'** : Extrait lichénique de *Ramalina farinacea* récolté à 1360 m.

**2** : Composé majoritaire d'*Evernia prunastri* récolté à 1280 m.

**2'** : Extrait lichénique d'*Evernia prunastri* récolté à 1280 m.

**3** : Composé majoritaire de *Cladonia rangiformis* récolté à 200 m.

**3'** : Extrait lichénique *Cladonia rangiformis* récolté à 200 m.

**4** : Composé majoritaire de *Ramlina farinacea* récolté à 1280 m.

**4'** : Extrait lichénique *Ramlina farinacea* récolté à 1280 m.

**5** : Composé majoritaire d'*Evernia prunastri* récolté à 1260 m.

**5'** : Extrait lichénique d'*Evernia prunastri* récolté à 1260 m.

**AU** : Acide usnique.

**CCM** : Chromatographie sur couche mince.

**-CH<sub>3</sub>** : Groupement méthyl.

**E. coli** : *Echerichia coli*.

**EBV** : Virus Esptein-barr.

**FeCl<sub>3</sub>** : trichlorure de fer.

**GAAn** : Aniline- Glycérol – Ethanol (1-2-2).

**GE** : Glycérol- Acide acétique glacial (3-1).

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide sulfurique.

**HPV** : humain papillomavirus.

**O<sub>3</sub>** : Ozone.

**Rf** : Rapport frontal.

**UV** : Ultraviolet.

**Zn** : zinc.

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : Généralités sur les lichens</b>	
I.1.Définition des lichens .....	2
I.2.La symbiose lichenique .....	2
I.2.1.Le rapport cytologique.....	3
I.2.2.le rapport physiologique .....	3
I.3.Appareil végétatif .....	3
I.3.1 .Morphologie du thalle .....	3
I.3.1.1.Les thalles fruticuleux ou buissonnants.....	4
I.3.1.2.Les thalles foliacés.....	4
I.3.1.3.Les thalles squamuleux.....	4
I.3.1.4.Les thalles crustacés .....	5
I.3.1.5.Les thalles gélatineux .....	5
I.3.1.6.Les thalles complexes ou composites.....	5
I.3.2.la structure du thalle .....	7
I.3.2.1.homéomère .....	7
I.3.2.2.hétéromère .....	10
I.4. La reproduction des lichens .....	11
I.4.1.Multiplication végétative.....	11
I.4.2. Reproduction sexuée.....	12
I.5. La biochimie des lichens .....	12
I.5.1. Les substances contenues dans les cellules .....	12
I.5.2. Les substances contenues dans les membranes .....	13

I.5.3. Les substances rejetées à l'extérieur des cellules .....	13
I.6. Usage des lichens.....	14
I.6.1. Usage alimentaires.....	14
I.6.2. Usage médicaux.....	15
I.6.3. Usage industriels.....	15
I.7. Ecologie des lichens .....	16
I.7.1. Facteurs édaphiques.....	16
I.7.2. Facteurs climatiques .....	17
I.7.3. Facteurs biologiques .....	18

## **CHAPITRE II**

### **PARTIE I : Généralités sur l'acide usnique**

II.1.1. Définition .....	19
II.1.2. Distribution de l'acide usnique .....	20
II.1.3. Chimie et biosynthèse de l'acide usnique .....	20
II.1.3.1. Chimie .....	20
II.1.3.2. Biosynthèse .....	21
II.1.4. Localisation de l'acide usnique chez les lichens .....	23
II.1.5. Concentration de l'acide usnique dans le thalle lichénique .....	23
II.1.6. Effet écologique de l'acide usnique .....	24
II.1.7. Toxicité de l'acide usnique .....	24
II.1.8. Facteurs stimulants la biosynthèse de l'acide usnique .....	25
II.1.9. Facteurs favorisant la dégradation de l'acide usnique.....	26
II.1.10. Rôles biologiques de l'acide usnique dans le lichen.....	27

**PARTIE II : Effets biologiques et usages de l'acide usnique**

II.2.1. Activité antibactérienne.....	28
II.2.2. Activité anti-inflammatoire .....	29
II.2.3. Activité antiviral.....	29
II.2.4. Activité analgésique et antipyrétique .....	29
II.2.5. Activité antiproliférative et cytotoxique .....	30
II.2.6. Activité anti-tumorale .....	30
II.2.7. Activité anti-cancer .....	30
II.2.8. Effet anti-protozoaire .....	30
II.2.9. Protection contre les UV .....	31
II.2.10. Activité anti-transpiration .....	31
II.2.11. Disponibilité et utilisation commerciale de l'acide usnique .....	32

**CHAPITRE III : Matériel et méthodes**

III.1. Matériel .....	33
III.1.1. Matériel végétale.....	33
III.2. Description des stations d'étude .....	33
III.2.1. Tikjda.....	33
III.2.2. Taksebt.....	34
III.3. Méthodes.....	35
III.3.1. Identification des échantillons lichéniques .....	35
III.3.1.1. Approche de l'identification d' <i>Evernia prunastri</i> .....	35
III.3.1.2. Approche de l'identification de <i>Ramalina ferinacea</i> .....	36
III.3.1.3. Approche de l'identification de <i>Cladonia rangiformis</i> .....	37

III.3.2. Classification des trois espèces étudiées.....	38
III.3.2.1. Classification de <i>Ramalina farinacea</i> (L.) Ach. 1810 .....	38
III.3.2.2. Classification d' <i>Evernia prunastri</i> (L.) Ach., 1810.....	38
III.3.2.3. Classification de <i>Cladonia rangiformis</i> (Hoffm, 1796 .....	39
III.4. Extraction des substances lichéniques .....	39
a- L'extraction des composés majoritaires.....	43
b- L'extraction de l'extrait lichénique.....	43
III.2.3. Chromatographie.....	43
a- Préparation de la cuve de la chromatographie .....	43
b- Calcul du Rf .....	44
III.2.4. Microcristallisation .....	44
<b>CHAPITRE IV : interprétation des résultats :</b>	
IV.1. Résultats de la Chromatographie .....	42
IV.2. Résultats de la microcristallisation .....	52
IV.2.1. observation au microscope en lumière polarisée .....	53
<b>Conclusion .....</b>	<b>56</b>

# *Introduction*

### Introduction

Les lichens sont des organismes issus de la symbiose entre un partenaire fongique appelé mycosymbiote et une algue (chlorophycée ou cyanophycée) appelé phycosymbiote. Cette association permet aux lichens l'élaboration de substances lichéniques ou métabolites secondaires synthétisés par le mycobionte. Ces composés hydrophobes et possèdent généralement un noyau aromatique, sont localisés dans le cortex, dans la médulle et sont spécifiques aux lichens.

Parmi ces substances lichéniques, l'acide usnique représente le composé le plus étudié et le plus commercialisé. C'est un composé corticale de couleur jaune possédant des propriétés médicales et pharmacologiques certains.

L'objectif de notre étude est l'identification de l'acide usnique à partir de trois espèces lichéniques *Evernia prunastri*, *Ramalina farinacea* et *Cladonia rangiformis* qui sont des espèces de morphologie différentes et récoltés a des périodes et altitudes différentes (INGOLFSDOTTIR, 2002).

Ainsi ce manuscrit est scindé en deux parties :

Partie bibliographique: généralités sur les lichens, généralités sur l'acide usnique, effets biologiques et usage de l'acide usnique.

Partie expérimentale :

- Identification des espèces lichéniques.
- Extraction de l'acide usnique.
- Chromatographie des substances lichéniques sur couche mince.
- La microcristallisation.

# *Chapitre I*

## *Généralités sur les lichens*

### I.1. Définition des lichens

Le terme actuel lichen est d'origine grecque, d'où sa prononciation : *liken*. Il servait autrefois à désigner des plantes croissant sur les arbres auxquelles on attribuait des vertus médicinales (VAN HALUWYN et LEROND, 1993).

Un lichen résulte de l'union harmonieuse d'une chlorophycée ou d'une cyanophycée avec un champignon. Les cyanophycées des lichens sont généralement des Noctocs, mais aussi des *Rivularia* chez les *Lichina*. Les algues sont toujours des chlorophycées, le plus souvent des chlorococcales (*Trebouxia*) ou des trentepohliales (*Trentepohlia*)

Si la très grande majorité des Lichens appartient aux Asco-Lichens, le champignon est très rarement un Basidiomycète (les Basidio-Lichens sont à cyanophycées, tropicaux et rares) (GORENFLOT, 1975).

### I.2. La symbiose lichénique

Le terme symbiose emprunté au grec «symbiosis» signifie : vie ensemble.

Ce terme a été créé par le botaniste allemand de Bary en 1879 pour caractériser l'association entre l'algue et le champignon dans un organisme des lichens.

La symbiose chez les lichens implique un échange de substances chimiques entre les deux partenaires, ce qui permet de comprendre l'existence des relations anatomiques entre l'algue autotrophe et le champignon hétérotrophe (VAN HALUWYN et LEROND ,1993).

### **I.2.1. Les rapports cytologiques**

Chez les lichens à chlorophycées, chaque gonidie est entourée par des rameaux d'hyphe à articles courts s'appliquant sur elle. Par contre chez les lichens à cyanobactéries deux possibilités de rapports : sont par simple juxtaposition comme dans le cas précédent après traversée de la gaine mucilagineuse, soit par pénétration d'un suçoir de l'hyphe dans la cellule gonidiale. La microscopie électronique a apporté de nouvelles précisions : presque tous les lichens qui ont été examinés ont montré à quelque degré une pénétration de suçoirs fongique dans l'algue. Chez les crustacés, et même quelques formes plus hautement structurées, les pénétrations sont celles des autres hyphes des lichens. La membrane cellulosique de l'algue est perforée complètement et le suçoir se trouve encastré dans cette membrane comme dans un collier. La membrane plasmique en revanche, s'invagine et forme une poche autour du suçoir (OZENDA, 2000).

### **I.2.2. Les rapports physiologiques**

Une symbiose est considérée comme étant une association de deux organismes dans laquelle les deux partenaires trouvent un bénéfice réciproque : c'est-à-dire l'algue cède au champignon l'excédent des matières organiques qu'elle produit par photosynthèse, tandis que le champignon l'alimente en eau et en sels minéraux provenant du milieu extérieur (par capillarité, imbibition ou diffusion) et qu'il lui offre une protection vis-à-vis de la dessiccation et des fortes intensités lumineuses (OZENDA, 2000).

### **I.3. Appareil végétatif**

Les lichens sont des thallophytes qui ne présentent ni feuilles, ni tige, ni racine, ni appareil conducteur. Le thalle constitue l'essentiel du lichen et porte les organes de reproduction (DERUELLE et LALLEMANT, 1983).

La morphologie et l'anatomie interne de l'appareil végétatif sont extrêmement variables (OZENDA et CLAUZADE, 1970).

#### **I.3.1. Morphologie du thalle**

Le thalle ou appareil végétatif présente une morphologie originale par rapport à celle des algues et des champignons qui le composent. Il existe six types de thalles : crustacés, squamuleux, foliacés, fruticuleux, complexes ou composites et gélatineux (VAN HALUWYN et LEROND, 1993).

### I.3.1.1. Les thalles fruticuleux ou buissonnants

Ils se présentent sous forme de touffes pendantes ou dressées d'assez grande dimension, pouvant atteindre plusieurs décimètres de long. Ils sont constitués soit de «tiges» cylindriques ou subcylindriques plus ou moins ramifiées (*Usnea*), soit de lames ou de lanières entières ou divisées (*Ramalina*, *Anaptychia*...) (fig.01) (SOUCHON, 1971).

### I.3.1.2. Les thalles foliacés

Ils forment des lames le plus souvent lobées, facilement séparables du substrat plus ou moins appliquées sur celui-ci ou bien plus ou moins redressées, avec la face inférieure le plus souvent garnie de fausses radicelles (rhizines) jouant le rôle de moyen de fixation (fig.02).

- **Thalles foliacés ombiliqués**

En forme de lames non lobées ou de squames, très fragiles à l'état sec, ils adhèrent au substrat par une très petite surface (crampon) le plus souvent près du centre. L'ombilic se présente sous forme d'une petite dépression et située sur la face inférieure.

- **Thalles foliacés non ombiliqués**

Ils sont formés de lames à lobes généralement radiés, avec la face inférieure fixée par de nombreux points ou même par toute la surface, quoique parfois sans rhizines. Les extrémités des lobes sont en général arrondies : ex. *Parmelia borrieri*, mais parfois tronquées : ex. *Parmelia omphalodes* (CLAUZADE et ROUX, 1987).

### I.3.1.3. Les thalles squamuleux

Ils sont constitués par de petites écailles adhérentes au substrat par toute leur face inférieure, sauf sur le bord. Ces écailles sont juxtaposées ou imbriquées (*Psora*, *Toninia*...) (fig. 03) (SOUCHON, 1971).

**I.3.1.4. Les thalles crustacés**

Ils sont très étroitement appliqués au substrat et il est impossible de les en détacher, quelle que soit la nature de celui-ci (bois, roche, etc.). Le thalle est plus ou moins bien limité, plus ou moins fragmenté (dans ce cas il s'agit d'un thalle aréolé), plus ou moins enfoncé dans le substrat (ce sont des thalles endolithiques) (fig.04) (DERUELLE et LALLEMANT, 1983).

**I.3.1.5. Les thalles gélatineux**

Ils forment, lorsqu'ils sont hydratés, des lames gélatineuses plus ou moins découpées qui sont souvent confondues avec des algues ou des cyanobactéries à l'état sec ils perdent cet aspect gélatineux, noircissent nettement, et deviennent très friables (fig.05) (DERUELLE et LALLEMANT, 1983).

**I.3.1.6. Les thalles complexes ou composites**

Ils sont formés de 2 parties distinctes

-un thalle primaire plus au moins adhérent au substrat : Ce thalle peut être de type crustacé, squamuleux ou même foliacé. Ex : *Cladonia*

-un thalle secondaire, de type fruticuleux et toujours dressé, qui s'est développé secondairement sur le thalle primaire (fig.06) (TIEVANT, 2001).



**Figure 01** : thalle fruticuleux



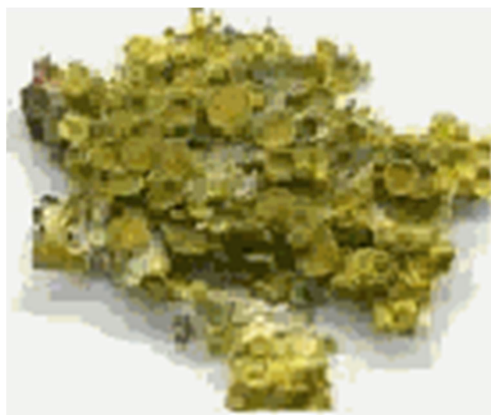
**Figure 02** : thalle foliacé



**Figure 03** : thalle squamuleux



**Figure 04** : thalle crustacé



**Figure 05** : thalle gélatineux



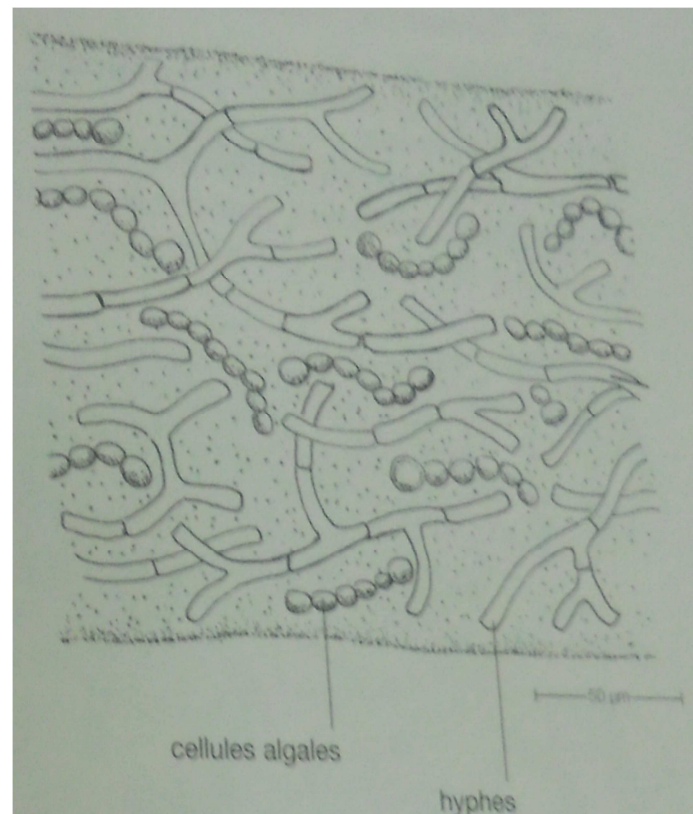
**Figure 06** : thalle complexe

### I.3.2. La structure du thalle

Il existe deux types de structure de thalle déterminés par l'organisation interne des «algues» et des «hyphes» (TIEVANT, 2001).

#### I.3.2.1. Structure homéomère

Les cellules algales et les hyphes sont mêlées et réparties dans toute l'épaisseur du thalle. Ex : *Collema* (TIEVANT, 2001).



**Figure 07** : structure homéomère coupe transversale du thalle (TIEVANT, 2001).

### I.3.2.2. Structure hétéromère

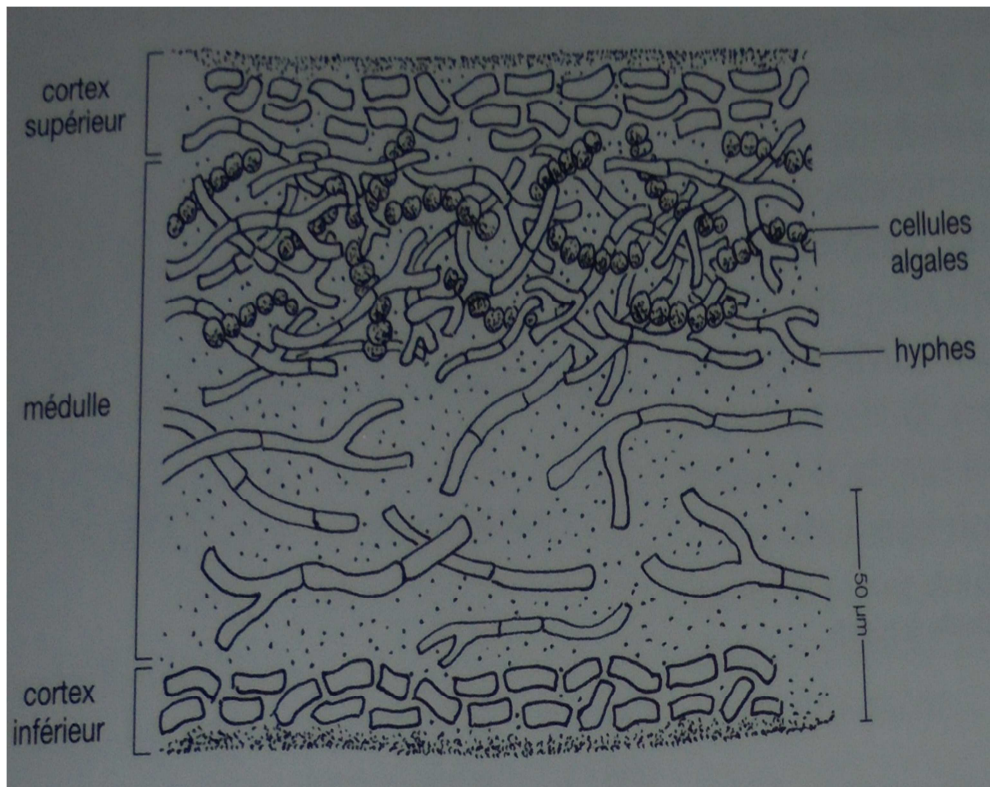
Les cellules algales et/ou les hyphes constituent des couches spécifiques observables au microscope optique en coupe transversale (TIEVANT ,2001).

Il existe deux types des structures hétéromères.

- **La structure stratifiée**

C'est la structure de la plupart des lichens foliacés, de beaucoup de lichens crustacés et de quelques lichens fruticuleux (*Everniaprunastri*, *Pseudeverniafurfuracea*). Cette structure est organisée en :

- un cortex supérieur constitué d'hyphes très serrées, sorte d'enveloppe protectrice externe ;
- une couche algale qui abrite des hyphes, mais beaucoup moins denses, formant un réseau contenant les cellules algales ;
- une médulle constituée généralement d'hyphes très lâches ;
- un cortex inférieur seulement constitué d'hyphes, très denses, pouvant donner naissance à des rhizines (TIEVANT ,2001).

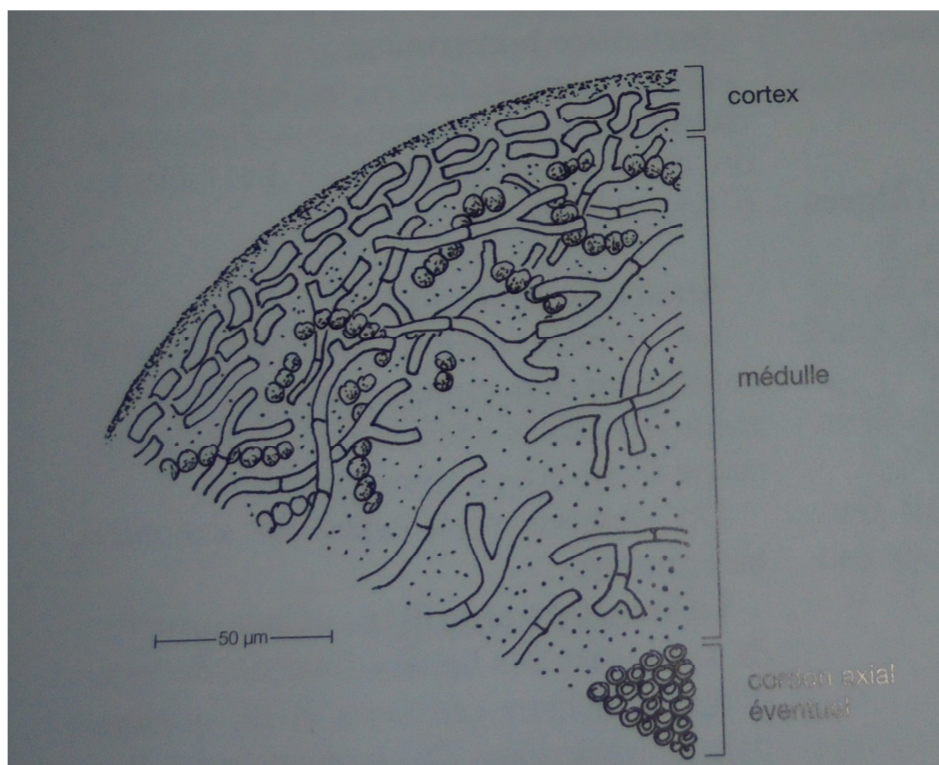


**Figure 08** : structure hétéromère stratifiée coupe transversale du thalle (TIEVANT ,2001).

- La structure radiée

C'est la structure de la plupart des lichens fruticuleux. Cette structure est constituée de mêmes couches que la couche précédente, mais disposée de façon concentrique.

Cortex et médulle peuvent constituer deux couches distinctes (*Ramalina*) ou plus ou moins mêlées (*Roccella*). La partie interne de la médulle peut être absente (*Alectoria*) ou formée d'un réseau d'hyphes très serrées, parallèles à l'axe du thalle ; elle constitue un cordon rigide (cordon axial des *Usnea*) (TIEVANT ,2001).



**Figure 09** : structure hétéromère radiée coupe transversale du thalle (TIEVANT ,2001).

## **I.4. La reproduction des lichens**

La reproduction du lichen se fait ; soit par multiplication végétative du lichen, soit par reproduction sexuée du champignon.

### **I.4.1. Multiplication végétative**

Elle se fait soit par dissémination de fragments du complexe lichénique ou par émission de sorédies ou d'isidies.

#### **➤ Fragmentation du thalle**

Entre les périodes de pluie ou d'humidité, les Lichens se dessèchent très vite et à l'état sec ils sont extrêmement cassants. Le piétinement des animaux et de l'homme, puis la dispersion des débris par le vent joue un rôle difficile à apprécier, mais certainement considérable dans leur dispersion (OZENDA et CLAUZADE, 1970).

#### **➤ Emission des sorédies et isidies**

##### **◆ Sorédies**

Sont des propagules de dissémination composées de quelques filaments du mycosymbiote enserrant quelques cellules gonidiales. L'organe constitué par l'ensemble des sorédies porte le nom de soralie. Les insectes et le vent jouent un rôle actif dans leur récolte et leur transport, mais le lichen lui-même participe grâce à la différenciation de certains hyphes médullaires, à l'expulsion des sorédies (DERUELLE et LALLEMANT, 1983).

##### **◆ Isidies**

C'est une sorte de bourgeonnement du thalle, présentant hyphes et gonidies avec cortex, caractéristique de certaines espèces. Le rôle n'est pas encore parfaitement connu, mais comme ces isidies se détachent facilement et qu'elles présentent les deux constituants du lichen, ils sont considérés comme des organes de multiplication. (OZENDA, 2000).

### I.4.2. Reproduction sexuée

L'appareil reproducteur des lichens est en fait celui de mycosymbiote ; le phytosymbiote, lui ne se multiplie que de façon végétative (DERUELLE et LALLEMANT ,1983).

Elle se réalise par deux types d'organes :

- ♦ **Apothécie**

C'est la fructification des discomycètes, en forme de coupe, garnie intérieurement d'un hyminium nu constitué d'asques et de paraphyse. Elle présente une grande variabilité de taille, de couleur, de structure et dans la localisation sur le thalle (VAN HALUWYN et LEROND ,1993).

- ♦ **Périthèces**

Ce sont des fructifications en forme de sphérules creuses, s'ouvrant au sommet par un port ou ostiole à travers lequel sont émises des spores. Leur structure peut être relativement très simple. Elles sont toujours plus ou moins enfoncées dans le thalle (OZENDA et CLAUZADE, 1970).

### I.5.La biochimie des lichens

L'étude des lichens sous l'angle biochimique conduit à la mise en évidence des substances fondamentales qui sont communes à tous les êtres vivant. Elle fait aussi apparaitre certains traits originaux notamment en ce qui concerne les constituants des membranes, les substances biotiques, et surtout les produits d'accumulation, dont certains très particulier n'appartiennent qu'aux lichens (SOUCHON, 1971).

#### I.5.1.Les substances contenues dans les cellules

- **Constituants du protoplasme** : ce sont comme chez tous les êtres vivants :
  - **Des constituants minéraux** : eau et sels minéraux.
  - **Des constituants organiques** : représentés principalement par des protéines, des acides nucléiques, des lipides complexes, auxquels s'ajoutent : des glucides, des enzymes, des vitamines, des pigments chlorophylliens et des pigments caroténoïdes (OZENDA et CLAUZADE, 1970).

- **Produits d'accumulation** : ce sont principalement des substances de caroténoïdes et des substances de réserves (lipides, glucides et substances voisines, protides et acides nucléique) (OZENDA et CLAUZADE, 1970).

### **I.5.2. Les substances contenues dans les membranes**

La composition des membranes gonidiales est mal connue et elle varie avec les espèces.

Elles sont constituées principalement de la cellulose associée à des sels de calcium et à des composés pectiques. Par contre les substances qui entrent dans la constitution des membranes des hyphes sont mieux connues, elles varient d'une espèce à l'autre et elles sont constituées essentiellement de : substances minérales, glucides, composés pectiques, chitines et pigments (OZENDA et CLAUZADE, 1970).

### **I.5.3. Les substances rejetées à l'extérieure des cellules :**

- **Oxalate de calcium**

C'est une substance rejeté sous forme de minuscules cristaux à l'extérieur des hyphes.

Principalement localisé dans la médulle, plus rarement dans le cortex supérieur ou à la surface du thalle, assez souvent dans l'hyménium et au-dessous de l'épithélium. D'une manière générale, il est plus abondant chez les lichens crustacés que chez les macrolichens et la quantité d'oxalate est d'autant plus élevée que les lichens sont plus âgées. L'oxalate de calcium est considéré comme un simple déchet. Il pourrait favoriser la nutrition minérale des lichens et réduit l'évaporation de l'eau et parfois serai utilisée par les gonidies comme source de carbone (OZENDA et CLAUZADE, 1970).

- **Les lipides**

Ce sont des gouttelettes d'huile situées à la surface de la paraphyse et sont utilisées dans la distinction des espèces (SOUCHON, 1971).

➤ **Substances lichéniques**

Les Substances lichéniques ont été trouvées dans toutes les parties sauf dans le cortex inférieur et la couche gonidiale. Elles se présentent sous forme de minuscules cristaux ou de granulations disposées à la surface des hyphes (OZENDA et CLAUZADE, 1970).

## **I.6. Usage des lichens**

### **I.6.1. Usage alimentaires**

Un petit nombre d'espèces seulement sont utilisées dans la pratique. Elles doivent leur pouvoir nutritif à la lichénine, qui par hydrolyse libère du glucose au cours de la digestion chez les Ruminants (OZENDA, 2000).

➤ **Dans l'alimentation humaine**

Seul *Cetraria islandica*, dite mousse d'Islande, a été utilisée autrefois d'une manière assez régulière, dans les pays nordiques, sous forme de farine mélangée à la farine panifiable ou préparée en bouillie. Cette farine est parfois employée comme ingrédient en chocolaterie et en pâtisserie, et la fabrication du pain pour les diabétiques (OZENDA et CLAUZADE, 1970).

Diverses espèces d'*Umbilicaria* ont été occasionnellement consommées au Canada par les trappeurs sous le nom de «trippes de roches» et l'une d'elle est utilisée au Japon, enfin, *Lecarona esculentaa* été utilisé dans les déserts asiatiques (OZENDA, 2000).

➤ **Dans l'alimentation des animaux**

La place exacte des lichens dans l'alimentation des animaux est assez mal connue : il est possible qu'ils jouent un rôle important dans la nutrition des mammifères alpins. Notamment dans la nutrition du Renne et de son homologue nord-américain, le Caribou (OZENDA, 2000).

### I.6.2. Usages médicaux

Le principal intérêt des Lichens en médecine semble être actuellement la possibilité d'en extraire des antibiotiques. L'acide usnique des Usnées semble actif contre une vingtaine de Bactérie, dont le Colibacille et divers agents de la tuberculose. Une autre substance antibactérienne a été obtenue à l'état cristallisé à partir de *Ramalina reticulata* ; elle est active contre divers Pneumocoques, Streptocoques et Staphylocoques, mais toujours à des doses beaucoup plus fortes (de l'ordre de 1/20 000) que celles des antibiotiques habituels

D'autre part, *Cetraria islandica* est encore utilisé en pharmacie dans la fabrication des pâtes pectorales en raison des propriétés émoullientes de la lichénine.

*Letharia vulpina* est toxique et a été utilisée autrefois pour fabriquer des appâts empoisonnés contre les Loups et les Renards (OZENDA, 2000).

### I.6.3. Usage industriels

- **Matières colorantes**

Il s'agit des substances du groupe des depsides, colorables en rouge par les hypochlorites, susceptibles de donner après diverses transformations des couleurs pourpre ou bleu que l'on a désignées sous le nom d'« orseilles » ; elles sont extraits surtout des Roccelles, qui croissent sur les rochers littoraux, notamment en Afrique occidentale. Actuellement les lichens, en tant que fournisseurs de matières colorantes ne sont plus guère utilisés en raison de l'emploi de colorants synthétiques (OZENDA, 2000).

- **Mucilages**

Différents lichens peuvent donner par extraction à l'eau chaude et éventuellement par hydrolyse partielle, des substances mucilagineuses qui ont été utilisées comme succédanés de gomme arabique notamment pour l'encollage des tissus (OZENDA et CLAUZADE, 1970).

- **Parfums**

C'est la seule utilisation industrielle des lichens qui conserve aujourd'hui une importance notable ; c'est aussi l'une des plus anciennes. L'espèce *Evernia prunastri* est la plus utilisée, elle est connue universellement sous le nom de « Mousse de chêne » et donne les parfums à odeur de « Chypre », d' « Orient », de « Fougère », de « cuire de Russie », pour la plupart dérivés de l'acide usnique à la suite d'estérification par les alcools des solvants (OZENDA, 2000).

## I.7. Ecologie des lichens

Les lichens sont présents dans le monde entier. On les trouve sur les écorces des arbres, sur le bois, les rochers, les murs, les tombes et les toits, sur le sol de forêts claires, dans les landes, les marais (KIRSCHBAUM et WIRTH, 1997).

Parmi les facteurs influençant la localisation des lichens, on distingue des facteurs édaphiques liés à la nature et aux propriétés du substrat, des facteurs climatiques et des facteurs biologiques (SOUCHON, 1971).

### I.7.1. Facteurs édaphiques

Selon la nature du substrat on distingue :

- **Espèces corticoles** : croissant sur l'écorce des arbres. **Ex** : *Graphis scripta*.
- **Espèces saxicoles** : couvrant les rochers. **Ex** : *Parmelia conspersa*.
- **Espèces terricoles** : vivant sur l'humus et la terre. **Ex** : *Cladonia*.

Le pH du support détermine aussi plusieurs groupes d'espèces ; certaines sont acidophiles (*Platysma glaucum*), certaines préfèrent un pH voisin de la neutralité (*Parmelia ocetabulum*), 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).

### I.7.2. Facteurs climatiques

Les facteurs physiques et leurs variations qui créent le climat commandent la présence ou l'absence de certaines espèces de lichens.

#### ➤ L'humidité

Il existe des espèces requérant une forte humidité atmosphérique dites aérohygrophiles, comme le sont beaucoup de lichens fruticuleux (*Usnea*), et des espèces exigeant un substrat fortement ou fréquemment mouillé dites substratohygrophiles (*Sticta*), plusieurs espèces tolèrent ou recherchent une submersion temporaire ou constante ce sont les espèces hygrophiles et aquatiques comme certains *Verrucaria*. Les autres espèces qui sont la majorité vivent dans des milieux peu humides et même secs (mésophiles et hypohygrophiles) (SOUCHON, 1971).

#### ➤ La température

La température intervient plutôt en commandant la répartition géographique et ne constitue un facteur du microclimat que dans la mesure où elle influence l'humidité.

#### ➤ La lumière

Les lichens se rencontrent aussi bien, selon les espèces, dans les stations vivement éclairées que dans les milieux ombragés :

Il faut remarquer que les conditions lumineuses ont aussi une grande influence sur les facteurs hydriques, et qu'il est parfois difficile de distinguer leurs actions respectives.

#### ➤ Le vent

En favorisant l'évaporation, agit aussi directement sur l'humidité. Par son action mécanique, plus sensible sur les lichens fruticuleux, le vent peut briser les thalles, surtout à l'état sec ; dans les stations très exposées, il peut provoquer des modifications morphologiques du thalle : les lichens y prennent des formes plus courtes, plus ramassées et leurs peuplements deviennent plus diverses (SOUCHON, 1971).

### I.7.3. Facteurs biologiques

➤ **La végétation**

La concurrence vitale se traduit entre les espèces lichéniques eux même et avec d'autres plantes telles que les mousses et les phanérogames qui modifient les conditions climatiques et substratiques en créant des microclimats et des micro stations (VAN HALLUWYN et LEROND, 1993).

➤ **Les animaux**

Peuvent être à l'origine des modifications locales de l'environnement par leur décomposition.

➤ **L'homme**

Beaucoup d'espèces de lichens sont devenues rares parce que leur espace vital est réduit par les activités humaines, notamment les activités agricoles d'une part (en particulier l'épandage d'engrais sur les pelouses sèches), et l'optimisation de l'exploitation forestière d'autre part ( les coupes à blanc, les courtes révolutions et l'enrésinement) en outre, la pollution atmosphérique induite par l'homme est néfaste pour la flore lichénique d'où leur utilisation comme bio indicateur de pollution (KIRSCHBAUM et WIRTH, 1997).

*Chapitre II*

*Partie I*

*Généralités sur l'acide  
usnique*

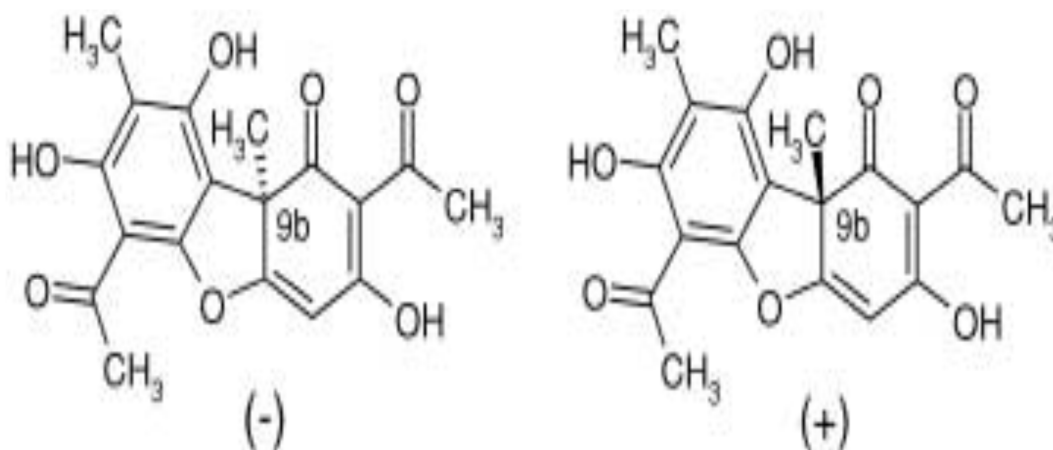
### II.1.1.Définition

L'acide usnique (AU) est un composé chimique polycyclique complexe produit naturellement comme métabolite secondaire par certaines espèces de lichen ; il a été isolé la première fois par Knop en 1844 (VASILIOS et FRANKOS, 2005). L'espèce *Usnea* (*Usneaceae*) est la source principale mais il est présent aussi chez d'autres espèces de lichen (INGOLFSTODIR, 2002).

L'Acide Usnique est un composé phénolique. C'est un dérivé optiquement actif du dibenzofurane. C'est le constituant de beaucoup de genres, par exemple, *Usnea*, *Cladonia*, *Ramalina*, ou *Alectoria*.

Cet acide de lichen a une gamme étendue d'activités biologiques. Il possède des activités antibactériennes, antifongiques, anti-mycobactériennes, antiparasitaires, et activités antinéoplastiques (LUKÁČ et al., 2012).

L'acide usnique, est un pigment jaunâtre produit par plusieurs espèces de lichen. C'est un produit du métabolisme secondaire de l'associé fongique et il existe en deux énantiomères, qui diffèrent dans l'orientation du groupe méthyle situé en position 9b (fig.7) (COCCHIETTO, 2002).



**Figure 10** : structure des deux énantiomères de l'acide usnique (COCCHIETTO, 2002).

### II.1.2. Distribution de l'acide usnique

L'acide usnique est largement répandu chez les espèces de *Cladonia* (Cladoneaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae), *Evernia*, *Parmelia* (Parmeliaceae). Parfois les espèces d'*Alectoria* (Alectoriaceae) sont des sources riches en acide usnique, et présentent un rendement de 6% du poids sec du thalle (INGOLFSDOTTIR, 2002).

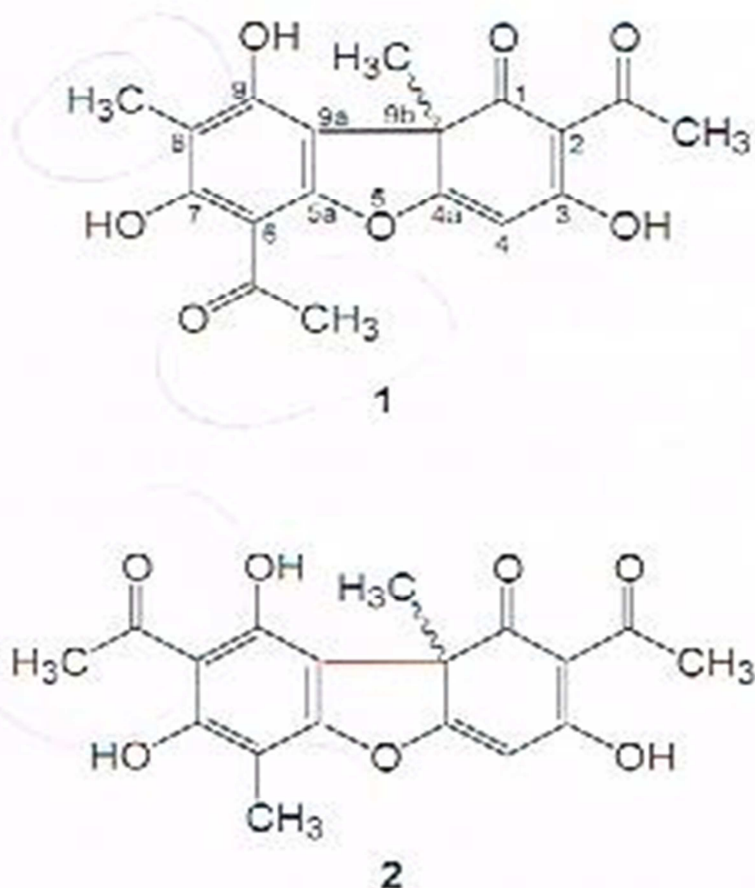
Bien que l'acide usnique ait été seulement identifié dans les lichens, les composés apparentés ont été trouvés dans les moisissures, par exemple :

- **La phytotoxine mycousnine** et des composés similaires dans *Mycosphaerella nawae*.
- **Cercosporamide et Amide de l'acide usnique** dans *Cercosporidium henningsii* (INGOLFSDOTTIR, 2002).

### II.1.3. Chimie et biosynthèse de l'acide usnique

#### II.1.3.1. Chimie

L'acide usnique est un dérivé du dibenzofurane. Il se produit sous deux formes énantiomères acide D-usnique et acide L-usnique, qui dépend de la projection angulaire du groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) à la position chirale 9b. En outre, deux autres isomères naturels, acides D et L isousniques, sont aussi produit par les lichens (fig.8) (VASILIOS et FRANCO, 2005).



**Figure 11** : structure des acides D-(9b-R) usnique et L-(9b-S) usnique (1) et structure des acides D-(9b-R) et L-(9b-S) isousnique (2) (INGOLFSODOTTIR, 2002).

### II.1.3.2. Biosynthèse

Il existe trois voies de synthèses à la base de nature chimique et la biogénèse de substances lichéniques :

- **La voie acétate-malonate**

Elle est à l'origine du plus grand nombre d'acides lichéniques parmi celles-ci, citons :

- L'acide usnique et ses dérivés. L'acide usnique est une des substances les plus répandues.
- Les depsides qui dérivent soit de l'orcinol soit du  $\beta$  orcinol. Comme depside dérivé de l'orcinol, l'acide lécanorique ; comme depside dérivé du  $\beta$  orcinol, l'atranorine.
- Les depsidones dérivent biogénétiquement des depsides par une phénol- oxydation, donnons l'exemple de l'acide norstictique.

- La voie mévalonate

Elle conduit essentiellement aux di- et triterpènes, aux stéroïdes et aux caroténoïdes. Le plus connu des triterpènes est la zéorine.

- la voie de l'acide shikimique

Elle donne naissance à trois substances non spécifiques aux lichens :

- l'acide polyporique.
- l'acide théléporique.
- L'acide pulvinique et ses dérivés (VAN HALUWYN et LEROND, 1993).

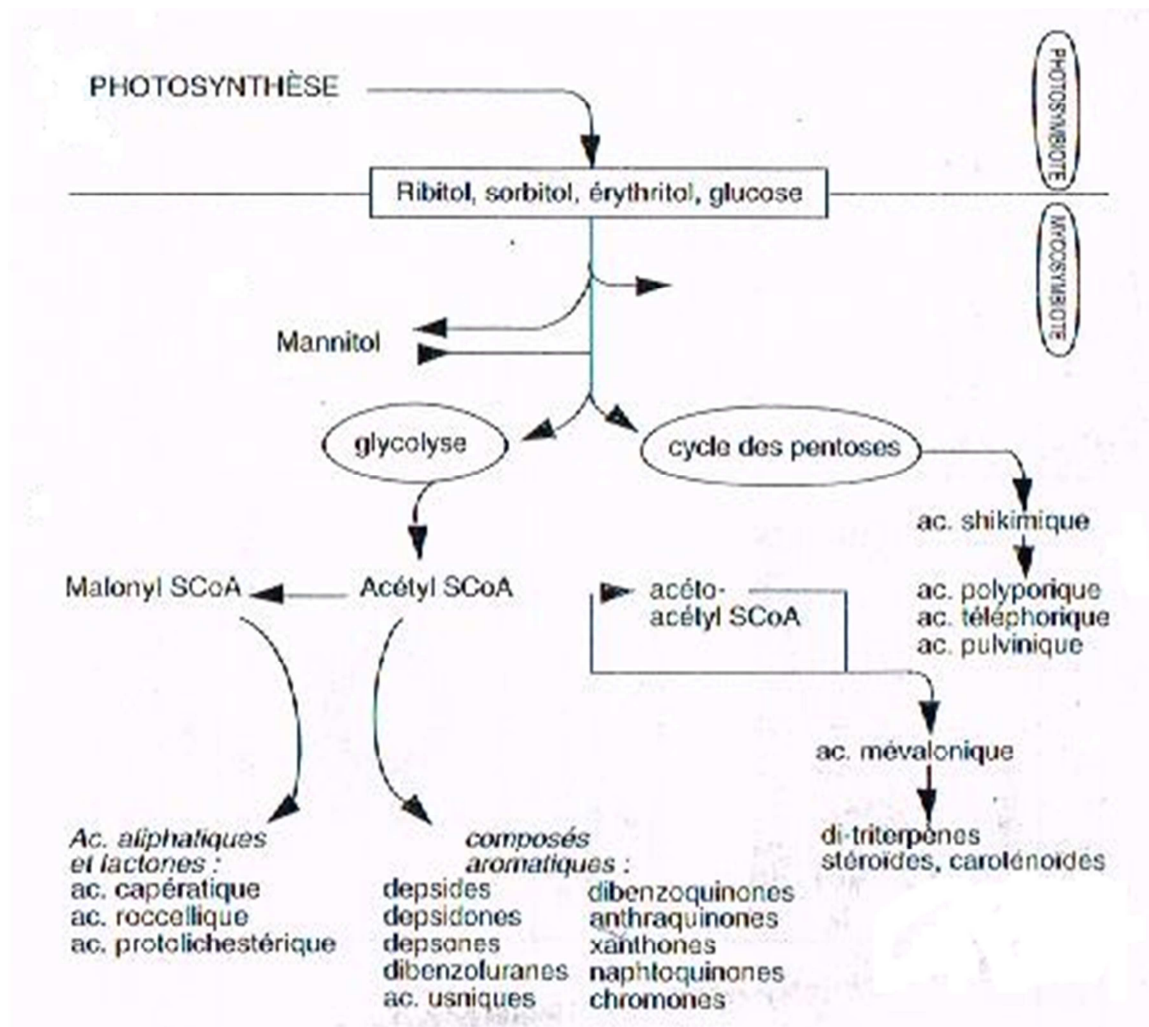


Figure 12 : biogénèse des substances lichéniques (VAN HALUWYN et LEROND, 1993).

#### II.1.4. Localisation de l'acide usnique chez les lichens

Certains composés tels que les dibenzofuranes (acide usnique), depsides, depsidones, ou dérivés de shikimate sont trouvés dans les lichens, la plupart de ces composés secondaires sont accumulés comme cristaux sur les surfaces externes des hyphes dans le cortex supérieur ou dans la médulle interne du thalle (BOUSTIE, 2011).

#### II.1.5. Concentration de l'acide usnique dans le thalle lichénique

La concentration de L'acide usnique varie à l'intérieur et entre les thalles individuels, selon les facteurs suivants :

##### ▲ Espèce

La concentration de L'acide usnique dans le thalle lichénique varie d'une espèce à l'autre et même entre les populations de la même espèce (BJERKE *et al.*, 2004).

##### ▲ Age du thalle

L'acide usnique est généralement trouvé avec des concentrations plus élevées dans les plus jeunes zones du thalle (BJERKE *et al.*, 2004), une corrélation négative entre l'âge de thalle et la concentration de l'acide usnique a été également trouvée, probablement dû à l'activité métabolique plus élevée du jeune thalle (COCCHETTO *et al.*, 2002).

Dans certains cas, la concentration en acide usnique dans les jeunes zones du thalle montre une variation élevée dans la même population uniforme, tandis que dans d'autres cas, la variabilité intra-population est basse en comparaison avec la variabilité entre populations qui grandissent sous différentes conditions climatiques (BJERKE *et al.*, 2004).

### II.1.6. Effet écologique de l'acide usnique

De nombreuses études ont accentué l'importance des métabolites secondaires des lichens dans la chimie écologique démontrée par les interactions lichen-microbe, lichen-plante, lichen-animal.

A part ces significations écologiques, ces recherches ont été également considérées du point de vue commercial, par exemple le développement d'agents antimicrobiens de l'agriculture, les herbicides et les insecticides (INGOLFSDOTTIR, 2002).

#### ➤ **Phytotoxicité de l'acide usnique**

Il a été suggéré que l'acide usnique possède des effets allélopathiques sur les plantes vasculaires mais les modes d'actions sont relativement moins connus, par contre les effets phytotoxiques de l'acide usnique sur quelques processus physiologiques dans la plante ont été décrits par plusieurs auteurs (LECHOWSKI *et al.*, 2005).

#### ➤ **Effet insecticides de l'acide usnique**

- Dans une étude chez les larves d'un insecte herbivore, l'acide L-usnique (-) s'est avéré être dix fois plus toxique que son isomère D-usnique (+) (VASILIOS et FRANKOS, 2005).
- Les deux énantiomères L et D- usnique ont causé une activité antifédente et toxicité significative envers les larves d'insectes herbivores *Spodoptera littoralis*, en effet des travaux ont montré que l'isomère L-usnique a un effet plus dramatique dans le retard de la croissance et dans le taux de mortalité de l'insecte (INGOLFSDOTTIR, 2002).

### II.1.7. Toxicité de l'acide usnique

#### ➤ **Sur l'homme**

Les données concernant la toxicité de l'acide usnique chez l'homme sont rares, les seuls effets adverses sont l'irritation locale et dermatite du contact allergique, quelques fois accompagnées par une conjonctivite (INGOLFSDOTTIR, 2002), comme rapporté dans la littérature, la dermatite de contact peut être provoquée par les ovules vaginaux et par le parfum de mousse de chêne (*Evernia*) (COCCHIETTO *et al.*, 2002).

➤ **Sur les animaux**

- l'acide usnique est toxique sur les herbivores, principalement les invertébrés (CAVIGLIA et *al.*, 2001).
- Au début de 2004, les fonctionnaires de l'État du Wyoming ont signalé que le lichen (*Parmelia sp*) a été responsable de la mort de près de 300 wapiti en raison de la fonte musculaire. Le lichen est abondant dans les sols désertiques autour de l'état, ces lichens ne sont pas normalement un aliment majeur, mais sont devenus la principale source de nourriture en raison des conditions défavorables (VASILIOS et FRANKOS, 2005).

### II.1.8. Facteurs stimulants la biosynthèse de l'acide usnique

➤ **Variations saisonnières**

Elles ont été détectées chez le lichen *Usnea aurantiaca-atra*, où des mesures mensuelles pendant trois années ont montré que les concentrations en acide usnique sont plus élevées en hiver et en printemps et faibles en été et en automne (COCCHIETTO et *al.*, 2002), ainsi les changements saisonniers ont une influence significative sur l'accumulation de l'acide usnique dans le thalle de *Nivalis flavocetraria* (en haut entre 4 et 8% du poids sec du thalle) (BOUSTIE et *al.*, 2011).

➤ **Variations altitudinales**

La concentration en acide usnique varie considérablement entre les sites, le long de local longitudinale et altitudinal, où les sites les plus froids et humides ont le plus haut niveau de concentration, où les grandes concentrations de l'acide usnique dans les milieux froids rendent les lichens plus résistants et tolérants au gel (BJERKE et *al.*, 2004).

➤ **Radiations solaires**

Des expériences avec de diverses bandes de rayonnement UV ont prouvé que le rayonnement d'UV-A et/ou d'UV-B peut dans certains cas induire la synthèse de l'acide usnique (BJERKE et *al.*, 2004).

➤ **Agents toxiques**

Ajoutons à tous ces facteurs, la concentration de l'acide usnique dans les lichens augmente en présence d'agent toxique (CARDARELLI et *al.*, 1997 ; VASILIOS et FRANKOS, 2005), notamment l'Ozone (O<sub>3</sub>) et autres polluants atmosphériques (LECHOWSKI et *al.*, 2005).

➤ **Stress oxydant**

Le stress oxydant chez les lichens peut être provoqué par plusieurs agents tels que les niveaux élevés de la lumière dans l'habitat, les herbicides comme le **paraquat** qui agit en produisant de l'oxygène actif dans le chloroplaste qui va déclencher la synthèse des composés antioxydant en réponse avec le stress oxydatif, citons comme exemple l'augmentation de l'acide usnique dans le thalle du lichen *P. sooredians* jusqu'à 36,3% du poids sec du thalle (CAVIGLIA et *al.*, 2001).

### **II.1.9. Facteurs favorisant la dégradation de l'acide usnique**

➤ **Photosynthèse**

Les expériences ont montré que l'acide usnique s'accumule quand la disponibilité nutritive est basse, et se dégrade sous une activité photosynthétique élevée (BJERKE et *al.*, 2004).

➤ **Radiations courtes**

L'acide usnique se dégrade aussi sous l'influence des radiations de longueur d'ondes courtes (BJERKE et *al.*, 2004).

### II.1.10. Rôles biologiques de l'acide usnique dans le lichen

Au cours de la longue période d'évolution, les lichens ont développé une grande capacité de survivre dans les conditions environnementales extrêmes et dures, cette capacité est obtenue pour atteindre un état de dormance à travers un métabolisme lent, et surtout par la production de métabolites bioactifs excréteurs telle que l'acide usnique, qui offre la protection chimique contre les parasites bactériens et les protozoaires, et contre les animaux prédateurs tels que les insectes et les nématodes, et contre les plantes concurrentes (VASILIOS et FRANKOS, 2005).

- ☞ Ces métabolites secondaires montrent également un rôle de défense contre les rayons ultra-violets et la sécheresse excessive, Pour cette protection, ces phytoorganiques sont déposés sur la surface des hyphes, pas à l'intérieur du thalle.
- ☞ Par la nature de leurs fonctions défensives, ces substances sont toxiques et secrétés à l'extérieur du lichen où l'acide usnique présente plusieurs propriétés anti- croissance, antimicrobiennes, anti-herbivores, anti-germination, anti-prédateurs, ajoutons à tout ça le rôle de régulateur du photobionte (VASILIOS et FRANKOS, 2005).

*Chapitre II*

*Partie II*

*Effets biologiques et  
usages de l'acide  
usnique*

L'acide usnique est bien connu comme antibiotique, doté de plusieurs activités biologique et physiologique comprenant l'antiviral, l'antibiotique et l'anti-inflammatoire. (HUANG et *al.*, 2011)

L'acide usnique est une caractéristique de produit de biosynthèse de plusieurs lichens épiphytiques tels que l'erniade E 6 *Cladonia* et *Parmelia*. L'acide usnique a plusieurs propriétés biologiques intéressantes. C'est un antibiotique et lui semble également exercer une action antimétabolique. Elle a même postulé que l'acide usnique peut jouer un rôle en tant que indicateur environnemental, puisque sa concentration change selon la présence des agents toxiques (CARDARLLI et *al.*, 1997).

### II.2.1. Activité antibactérienne :

Des études sur les effets de différentes concentrations d'acide usnique sur la croissance des cultures de quelques espèces bactériennes les bactéries gram positives, c.-à-d., bacille subtilis et *Staphylococcus aureus*, sont sensibles, et leur croissance est empêchée par l'acide usnique, d'autre part, les bactéries gram négatives tels que *E. coli* en général, sont considérés comme insensible à l'acide usnique (MACIAG-DORSZYŃSKA et *al.*, 2014).

La susceptibilité *in vitro* des bactéries pathogènes gram positives et anaérobiques vers l'acide usnique (+) et (-) a été confirmé en utilisant des analyses normalisées.

Les deux isomères ont montrés une activité contre les isolats cliniques d'*Enterococcus faecalis* et de *E. faecium* et isolats cliniques de *Staphylococcus aureus*, y compris des contraintes résistantes au méthicilin et mupirocin.

les isomères montrent aussi une activité significative contre les espèces anaérobiques pathogènes gram négatives, de bacilli (*Bacteroides*) et les bactéries anaérobiques gram positif, c.à.d. *Clostridium* et *propionibacterium*. Dans la plupart des cas les isomères ont montrés une activité comparable, mais l'acide usnique (+) était plus actifs contre *E. faecalis* et quelques espèces *Bacteroides* (INGOLFSDOTTIR, 2002).

**II.2.2. Activité anti-inflammatoire :**

L'activité anti-inflammatoire de l'acide usnique est mise en évidence sur l'œdème de patte induite par la carrageenine sur un rat de laboratoire, les résultats obtenus dépendent de la concentration de l'acide usnique et son efficacité est comparable à celle de l'ibuprofène (médicament très utilisé pour le traitement de cette maladie) (VIJAYAKUMAR et *al.*, 2000).

**II.2.3. Activité antiviral :**

L'acide usnique montre des propriétés anti-tumorales, qui inhibent la réplication du virus VIH (VAN HALLUWYN et LEROND, 1993).

Dans une étude clinique récente réalisée en Italie, avec la participation de 100 malades féminines (âgés entre 18 et 45 ans), infectées par le virus génital humain papillomavirus (HPV).

Les effets d'une formulation intra-vaginale contenant l'acide usnique additionné au zinc ont montrés des résultats favorables significatifs chez les patients ayant reçues la formulation vaginale Zn-acide usnique et guérison de l'infection après 6 mois de traitement, en comparaison avec le groupe témoin qui n'a pas reçu la formulation de l'acide usnique (INGOLFSDOTTIR, 2002).

**II.2.4. Activité analgésique et antipyrétique :**

L'acide usnique et l'acide diffractique sont identifiés en tant que composants actifs d'un extrait de méthanol d'*Usnea diffracta* présentent des activités analgésiques et antipyrétiques chez les souris.

La prise par voie orale de l'acide usnique de 30 et 100mg/kg a montré des effets analgésiques significatifs, et la prise de 100 et 300 mg/kg montrent des effets antipyrétiques considérables (INGOLFSDOTTIR, 2002).

### **II.2.5. Activité antiproliférative et cytotoxique :**

L'acide usnique a montré une activité antiproliférative modérée dans un essai sur des cellules leucémiques P388 et l'activité cytotoxique in vitro contre les cellules L1210 cultivées (INGOLFSDOTTIR, 2002).

L'acide usnique (50µg/ml) a réduit le nombre de cellules leucémique (K-562) et les lignées cellulaires de carcinome (VASILIOS et FRANKOS, 2005).

### **II.2.6. Activité anti-tumorale :**

Les activités anti-tumorales de l'acide usnique ont été établies par plusieurs chercheurs (MULLER, 2001). Kupchan et Kopperman (1975) ont démontrés pour la première fois l'activité inhibitrice d'acide usnique contre le carcinome de Lewislung chez les souris (LLC) (COCCHIETTO *et al.*, 2002).

L'acide L-usnique isolé à partir de l'espèce *Cladonia* est rapporté pour être actif contre le carcinome des poumons, et le D-usnique montre une très grande activité dans l'inhibition d'une promotion tumorale induite par le virus Epstein-barr (EBV), et son activité inhibitrice semble être plus efficace que son isomère L-usnique (MULLER, 2001).

### **II.2.7. Activité anti-cancer :**

Des études récentes ont suggérées que l'acide usnique agit comme inhibiteur de transcription de l'ARN (Campanella et autres, 2002). Mayer et autres (2005), ont montrés des effets antiprolifératifs contre des cellules de cancer de sein MCF7 et les lignées cancéreuses H1299 des poumons.

Les auteurs ont constatés que l'activité anti-tumorale de l'acide usnique n'a pas impliqué des dommages d'ADN ou l'activation p53. Ces dispositifs non-génotoxiques et de p53-Independent font à acide usnique un candidat potentiel pour la thérapie systémique ou topique pour le traitement des tumeurs (O'NEILL *et al.*, 2010).

### **II.2.8. Effet anti-protozoaire**

L'acide usnique (-) a montré l'effet inhibiteur significatif contre *Trichomonas vaginalis* qui est un protozoaire pathogène (FOURNET *et al.*, 1997)

**II.2.9. Protection contre les UV :**

Beaucoup de substances de lichen sont des pigments d'UV-absorbent accumulés dans la couche corticale supérieure dans l'ordre pour recouvrir les cellules d'algues. Spécimens des *verticillaris* de *Cladonia*, par exemple (COCCHIETTO et *al.*, 2002).

L'acide usnique fourni également la défense contre les rayons ultra-violet et la sécheresse excessive (VASILIOS et FRANKOS, 2005).

Les ultra-violet (UV), sont considérés comme étant le majeur facteur étiologique qui provoque le cancer de peau. Chez les humain les deux UV-B (280-320 nm) et UV-A (320-400 nm) peuvent causer une mutation génique et suppression de l'immunité, ces événements biologiques pourrait mener au cancer de peau y compris le mélanome malin, qui est pratiquement grave et peut entrainer des métastases (RUSSO et *al.*, 2008).

**II.2.10. Activité anti-transpiration :**

L'acide usnique a été étudié sur des tournesols par Lascève et Gaugain (1990). Il diminue la perte d'eau sans affectation de Co prise.

Cet effet sur des usines ouvre une nouvelle perspective : l'utilisation de l'acide usnique dans le domaine agricole, en particulier dans des secteurs arides. Carbonnier (1991) suggère la possibilité d'utilisation de l'acide usnique sur des arbres pour empêcher le séchage excessif, de ce fait prolongeant son utilisation comme anti-transpirant à la sylviculture (COCCHIETTO et *al.*, 2002).

**II.2.11. Disponibilité et utilisation commerciale de l'acide usnique :**

Une forme fortement purifiée d'acide usnique isolé à partir du genre *Usnea* est disponible dans le commerce. Sous sa forme purifiée, l'acide usnique a été formulé dans des crèmes, dentifrice, collutoire, désodorisants et des produits solaires.

En Allemagne, les extraits des lichens utilisés dans des produits pharmaceutiques et de beauté ils sont lancés sur le marché sous les marques Omnigran A, Granobil, et Usnagren A et T.

En Italie, l'acide usnique a été employé dans les crèmes vaginal, crèmes pour les pieds, les poudres, et les shampoings des cheveux.

En Argentine, *Usnea densirostraa* été vendu pour traiter beaucoup de maux. Dans les années récentes, l'acide usnique est utilisé comme supplément alimentaires pour la réduction du poids (VASILIOS et FRANKOS, 2005).

# *Chapitre III*

## *Matériel et méthodes*

### III.1. Matériel

#### III.1.1. Matériel végétale

Les récoltes des trois espèces lichéniques *Evernia prunastri*, *Ramalina farinacea* et *Cladonia rangiformis* ont été effectuées dans la forêt de TIKJDA (DERNA), qui est une zone montagneuse dépassant les 1200 m d'altitude, au mois de juin 2015 et au mois de mai 2016.

Les lichens sont séparés de leur substrat naturel à l'aide d'un couteau ou bien à la main, les échantillons sont recueillis dans des sachets en papier, par la suite ils sont transportés au laboratoire et déposés soigneusement sur des feuilles du papier à fin d'être séchés sans être détériorés.

### III.2. Description des stations d'étude

#### III.2.1. Tikjda

Tikjda est un site touristique situé à l'est de la wilaya de Bouira, à 1 478 m d'altitude au cœur de la chaîne montagneuse du Djurdjura, avec un climat neigeux.



**Figure 13 :** Situation géographique de la station d'étude Tikjda (Google maps).

### III.2.2. Taksebt

Le barrage TAKSEBT se situe sur la rivière de Takhoukhth, entre Aït Iraten et Ait Aïssi dans la wilaya de Tizi-Ouzou en Kabylie, avec une altitude d'environ 200m.



**Figure 14** : Situation géographique de la station d'étude Taksebt (Google maps).

### III.3. Méthodes

#### III.3.1. Identification des échantillons lichéniques

L'identification de nos espèces lichéniques a été réalisée à l'aide d'une loupe, par observation des caractères morphologiques, tels que le type du thalle, la couleur, la forme (KIRSCHBAUM et WIRTH, 1997).

Les critères de détermination précités, nous ont permis d'identifier trois espèces lichéniques :

##### III.3.1.1. Approche de l'identification d'*Evernia prunastri*

###### Caractères morphologiques

C'est un lichen corticole à thalle fruticuleux, pendant, se fixant au substrat par un crampon.

Thalle à couleur grise claire ou blanchâtre, très souple.

Non isidié, et généralement sorédié, présente rarement des apothécies marginales et brièvement pédicellées à teinte brune.



**Figure 15 :** *Evernia prunastri* à thalle fruticuleux (DERNA, 2015)

### III.3.1.2. Approche de l'identification de *Ramalina ferinacea*

#### Caractères morphologiques

*Ramalina farinacea* est un lichen corticole à thalle fruticuleux assez répandu sur le tronc des arbres, assez sensible à la pollution, Son thalle forme des touffes pendantes longues de 3 à 10 cm, il est fixé par un seul point au tronc, Ses rameaux aplatis sont larges de 1 à 9 mm et présentent une même couleur sur leur deux faces (ce critère permet de le différencier aisément d'*Evernia prunastri*).



**Figure 16 :** *Ramalina farinacea* à thalle fruticuleux (DERNA, 2015)

### III.3.1.3.Approche de l'identification de *Cladonia rangiformis*

#### Caractères morphologiques

C'est un lichen terricole à thalle primaire crustacé très fugace et le plus souvent inexistant. Et un thalle secondaire en petit buisson pouvant atteindre 10 cm de hauteur et plus, formant de grands "coussins" avec ses voisins, formé de rameaux, parfois perforés aux aisselles, très ramifiés et se divisant de manière trichotome (parfois dichotome pour la dernière division), avec des rameaux terminaux courts et dirigés dans toutes les directions, surface lisse, gris-verdâtre pâle, crème, blanchâtre toujours très pâle si humide et à l'ombre, plus jaunâtre dans les zones sèches et ensoleillées.



**Figure 17 :** *Cladonia rangiformis* à thalle composite (TAKSEBT, 2016)

**III.3.2. Classification des trois espèces étudiées****III.3.2.1. Classification de *Ramalina farinacea* (L.) Ach. 1810**

**Règne :** Fungi

**Division :** Ascomycota

**Classe :** Lecanoromycetes

**Ordre :** Lecanorales

**Famille :** Ramalinaceae

**Genre :** *Ramalina*

**Espèce :** *Ramalina farinacea*

**III.3.2.2. Classification d'*Evernia prunastri* (L.) Ach., 1810**

**Règne :** Fungi

**Division :** Ascomycota

**Sous-division :** Pezizomycotina

**Classe :** Lecanoromycetes

**Ordre :** Lecanorales

**Sous-ordre :** Lecanorineae

**Famille :** parmeliaceae

**Genre :** *Evernia*

**Espèce :** *Evernia prunastri*

### III.3.2.3. Classification de *Cladonia rangiformis* (Hoffm, 1796)

**Règne :** Fungi

**Division :** Ascomycota

**Classe :** Lecanoromycetes

**Ordre :** Lecanorales

**Famille :** Cladoniaceae

**Genre :** *Cladonia*

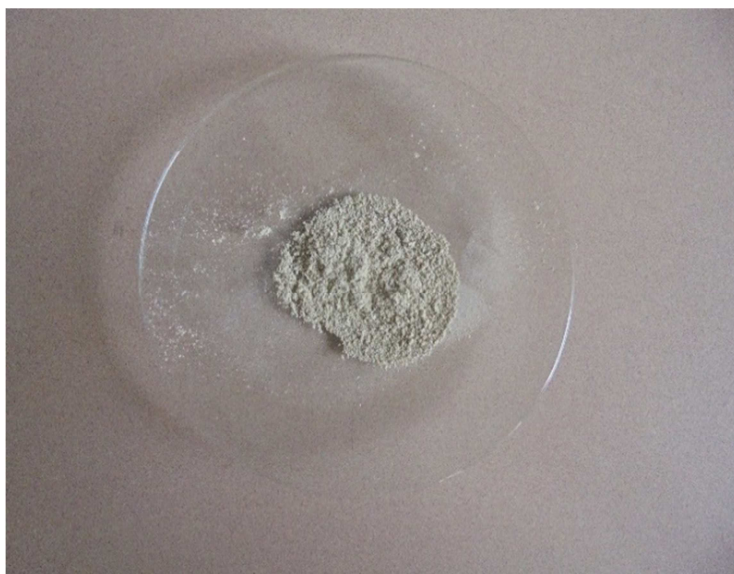
**Espèce :** *Cladonia rangiformis*

### III.4. Extraction des substances lichéniques

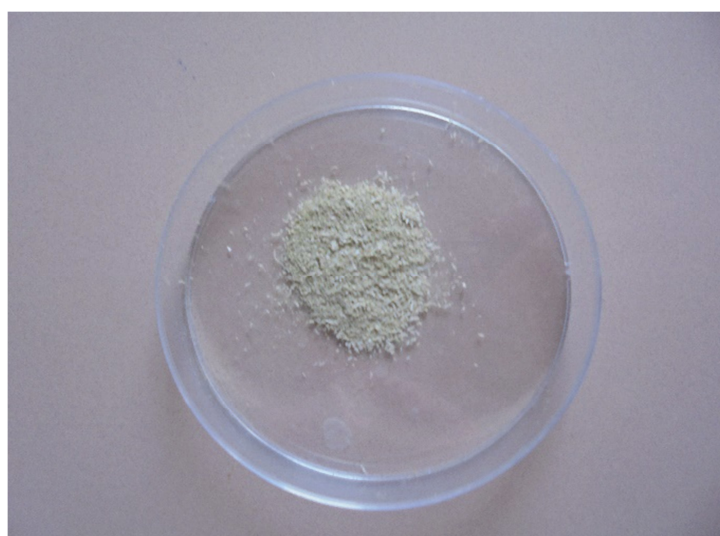
Après macération de la poudre de chaque espèce dans l'acétone pendant trois heures, nous avons introduit au fond du tube un peu de coton et le surnageant est transféré dans un autre tube en verre



**Figure 18 :** thalle broyé d'*Evernia prunastri* récolté à 1260 m



**Figure 19** : thalle broyé d'*Evernia prunastri* récolté à 1280 m



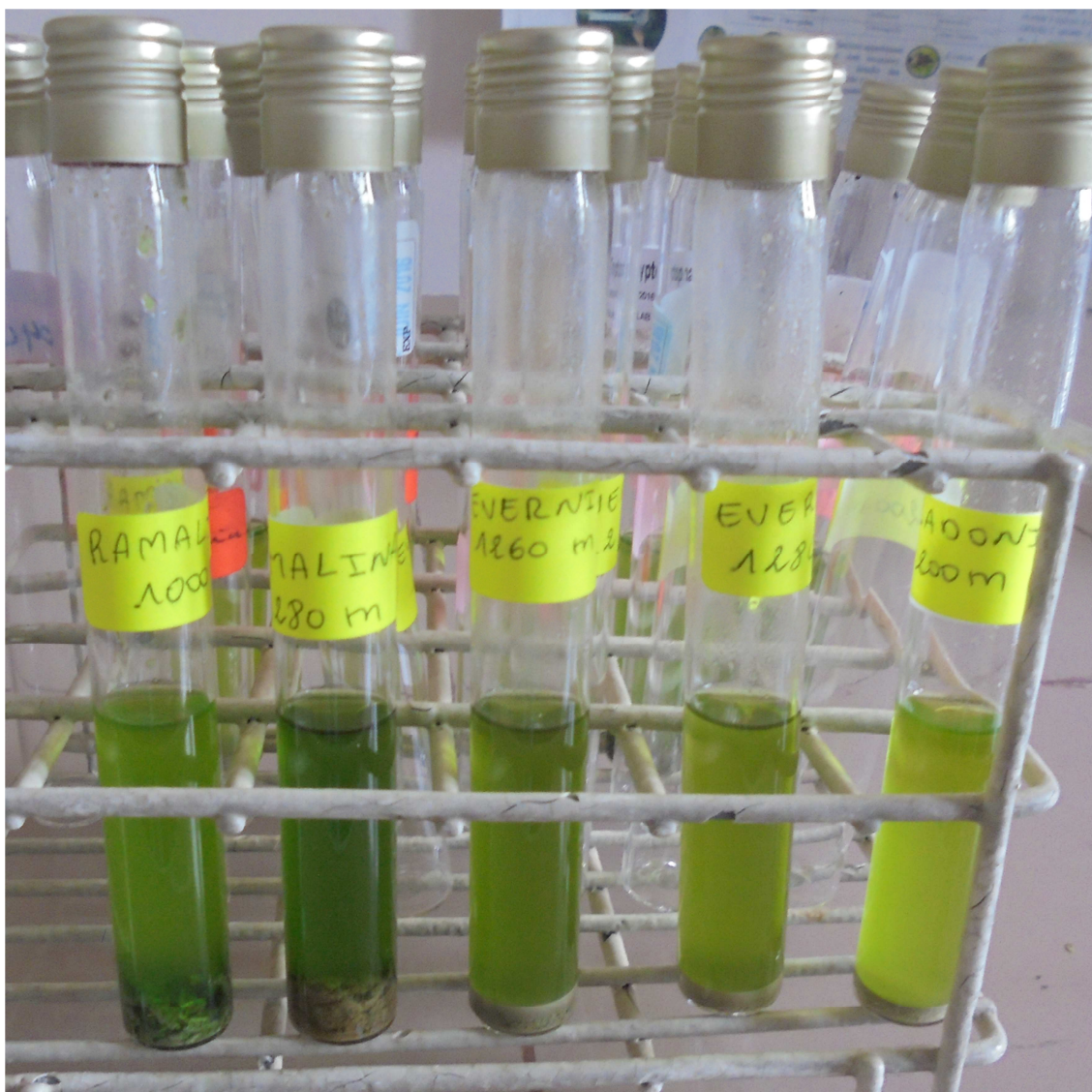
**Figure 20** : thalle broyé de *Cladonia rangiformis* récolté à 200 m



**Figure 21** : thalle broyé de *Ramalina farinacea* récolté à 1280 m



**Figure 22** : thalle broyé de *Ramalina farinacea* récolté à 1360m



**Figure 23** : macération pendant 3 heures dans l'acétone

Deux extractions ont été faites sur les trois espèces récoltées :

**a- L'extraction des composés majoritaires**

- Broyer les lichens à l'aide d'un mortier.
- Peser 300 mg de poudre de chaque espèce.
- Introduire pour chaque espèce 300mg de poudre de lichen dans des tubes à essais auxquels sont rajoutés 10ml d'acétone, le mélange est laissé macérer au moins 3 heures en agitant de temps en temps.
- Disposer un morceau de coton à l'intérieur des tubes
- Aspirer avec des pipettes pasteur l'extrait, en appliquant celle-ci contre le coton
- Transvaser l'extrait dans un nouveau tube à essai.

**b- L'extraction de l'extrait lichénique**

- L'extraction a été réalisée par macération : nous avons introduit pour chaque espèce 100mg de poudre de lichen dans des tubes à essais auxquels sont rajoutés 1ml d'acétone, le mélange est laissé macérer au moins 3 heures en agitant de temps en temps.
- Disposer à l'intérieur des tubes un morceau de coton.
- Aspirer l'extrait et le transvaser dans un autre tube.

### III.2.3. Chromatographie

Cette technique a été réalisée avec les deux extraits des trois espèces lichéniques on utilisant comme profil chromatographique le gel de silice.

**a- Préparation de la cuve de la chromatographie**

- Nous avons utilisé deux types de solvant :

Le premier solvant constitué de : 130ml d'Hexane, 80ml de Diethylether et 20ml d'Acide formique.

Le second est constitué de : 200 ml de Toluène et 30 ml d'Acide acétique.

**b- Calcul du Rf**

$$Rf = \frac{L1}{L2}$$

L1 : la distance parcourue par la substance.

L2 : la distance parcourue par le solvant.

**III.2.4. Microcristallisation**

- Régler la plaque chauffante à environ 40°C-50°C.
- Poser une lame et une lamelle sur la plaque.
- Déposer l'extrait lichénique goutte après goutte sur une lame
- Déposer sur le dépôt le réactif de cristallisation
- Poser sur cette goutte délicatement la lamelle préalablement chauffée.
- Fixer avec de vernis à ongle transparent les quatre angles de la lamelle pour que le réactif cristallogène ne dépasse pas les bords de la lamelle, laisser sécher pendant 10mn.
- Observation de la lame au microscope équipé d'un système de polarisation grossissement 40 X 10.

# *Chapitre IV*

## *Interprétation des résultats*

### IV.1. Résultats de la Chromatographie

**Tableau I :** Résultats d'une CCM avec comme phase mobile (130 ml d'Hexane, 20 ml d'A.Formique, 80ml de Diethylether) révélée avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 10%

Rf \ Espèces	<i>Ramalina farinacea</i> 1360 m (2016)	<i>Evernia prunastri</i> 1280 m (2015)	<i>Cladonia rangiformis</i> 200 m (2016)	<i>Ramalina farinacea</i> 1280 m (2015)	<i>Evernia prunastri</i> 1260 m (2015)
Composé majoritaire en solution	/	0.45562	/	/	0.46154
	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/
	/	0.73373	/	/	0.73373
	/	/	0.73964	/	/
Extraits lichéniques	0.31953	0.27219	/	/	0.30178
	/	0.3787	/	/	0.38462
	/	0.44379	/	0.45562	0.45562
	/	0.56805	/	/	0.57988
	/	0.72781	0.73373	/	0.74556

D'après les résultats obtenus par la technique de chromatographie sur couche mince, nous constatons que :

L'espèce *Ramalina farinacea* 1360 m et 1280 m ne présente pas de migration dans son composé majoritaire alors que dans l'extrait lichénique il n'apparaît qu'une substance dont les Rf est différent.

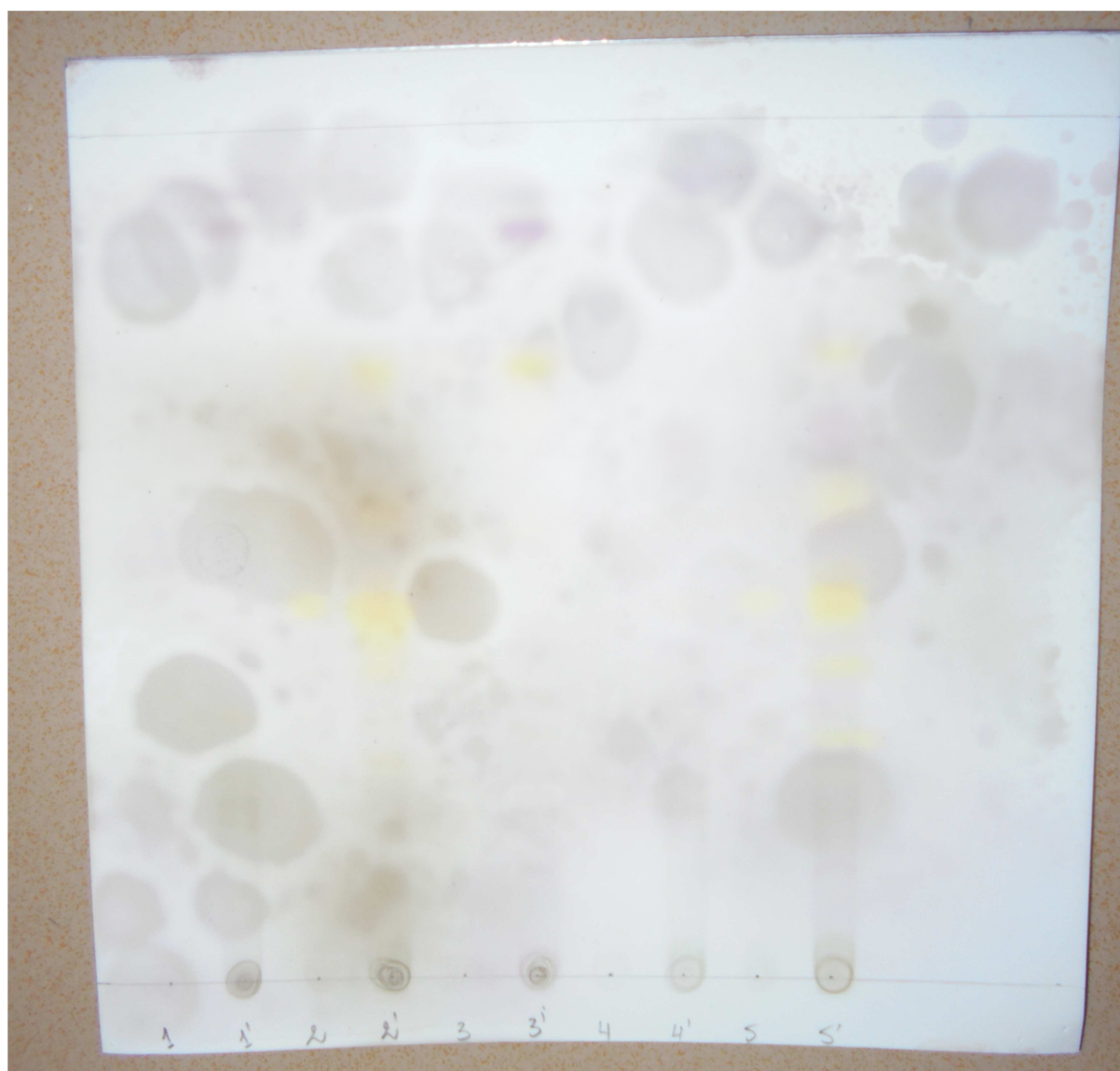
Par contre chez *Evernia prunastri* à différentes altitudes nous remarquons qu'elles possèdent deux substances dans son composé majoritaire avec un même Rf et dans l'extrait lichénique il y a apparition de 5 substances lichéniques avec des Rf approximativement les mêmes.

Enfin, nous remarquons que *Cladonia rangiformis* possède une substance dans son composé majoritaire et une substance lichénique dans l'extrait lichénique avec le même Rf.

Pour conclure, l'espèce *Ramalina farinacea* à 1360 m récolté en 2016 et à 1280 m récolté en 2015 ne possède pas la même substance dans les deux extraits alors que, *Evernia prunastri* à différentes altitudes possèdent les mêmes substances puisque qu'elles ont les mêmes Rf, tandis que, *Cladonia rangiformis* a la même substance dans les deux extraits.

Le composé majoritaire de *Ramalina farinacea* récolté à différentes altitudes ne présente pas de migration. Nous pouvons déduire que le composé majoritaire n'est ni un terpène ni une saponine, ni une stéroïde car le révélateur  $H_2SO_4$  à 10% à la propriété de mettre en évidence ces composés

Par contre, l'extrait lichénique de *Ramalina farinacea* contiendrait un des composé puisque le révélateur  $H_2SO_4$  a mis en évidence la présence de ces composés.



**Figure 24 :** Profil chromatographique avec comme phase mobile (130 ml d'Hexane, 20 ml d'A.Formique, 80 ml de Diethylether) et révélée avec  $H_2SO_4$  à 10%

1 : Composé majoritaire de *Ramalina farinacea* récolté à 1360 m.

1' : Extrait lichénique de *Ramalina farinacea* récolté à 1360 m.

2 : Composé majoritaire d'*Evernia prunastri* récolté à 1280 m.

2' : Extrait lichénique d'*Evernia prunastri* récolté à 1280 m.

3 : Composé majoritaire de *Cladonia rangiformis* récolté à 200 m.

3' : Extrait lichénique *Cladonia rangiformis* récolté à 200 m.

4 : Composé majoritaire de *Ramalina farinacea* récolté à 1280 m.

4' : Extrait lichénique *Ramalina farinacea* récolté à 1280 m.

5 : Composé majoritaire d'*Evernia prunastri* récolté à 1260 m.

5' : Extrait lichénique d'*Evernia prunastri* récolté à 1260 m.

**Tableau II** : Résultats d'une CCM avec comme phase mobile (130 ml d'Hexane, 20 ml d'A.Formique et 80 ml de Diethylether) et révélée avec FeCl<sub>3</sub> à 1%

Rf \ Espèces	<i>Ramalina farinacea</i> 1360 m (2016)	<i>Evernia prunastri</i> 1280 m (2015)	<i>Cladonia rangiformis</i> 200 m (2016)	<i>Ramalina farinacea</i> 1280 m (2015)	<i>Evernia prunastri</i> 1260 m (2015)
Composé majoritaire en solution	/	0.46746	/	/	0.46746
	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/
Extraits lichéniques	0.23669	0.23077	0.23077	0.21302	0.21893
	/	0.40828	/	/	0.3787
	/	/	/	/	0.42604
	/	0.52663	/	/	0.46154
	/	0.5858	0.5858	/	0.59763
	/	0.71598	0.71598	/	0.72781

Le tableau ci-dessous nous montre que :

L'espèce *Ramalina farinacea* récoltée à différentes altitudes ne présente pas de migration dans son composé majoritaire alors que dans l'extrait lichénique il n'apparaît qu'une substance dont les Rf diffèrent.

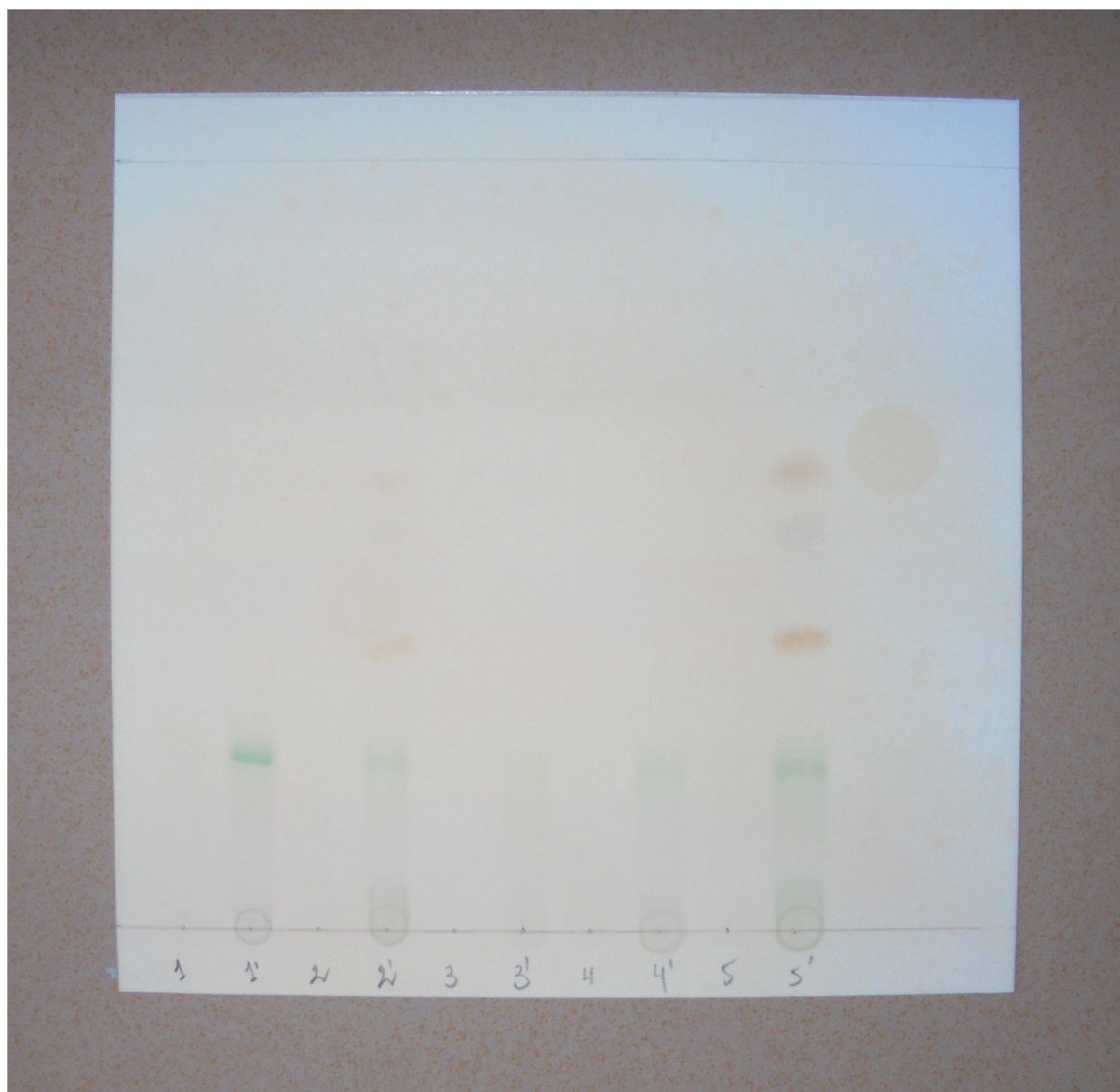
Ensuite chez *Evernia prunastri* à différentes altitudes nous constatons qu'elle possède deux substances dans son composé majoritaire avec un même Rf et dans l'extrait lichénique apparaît 5 substances chez *Evernia prunastri* 1280 m et 6 substances chez *Evernia prunastri* 1260 m avec des Rf approximativement les mêmes.

Enfin chez *Cladonia rangiformis* nous remarquons qu'elle ne possède aucune substance dans son composé majoritaire alors qu'elle possède 3 substances dans l'extrait lichénique avec des Rf différents.

Donc nous concluons que *Ramalina farinacea* 1360 m récoltée en 2016 et *Ramalina farinacea* 1280 m récoltée en 2015 possède deux substances différentes alors qu'*Evernia prunastri* à différentes altitudes possède les mêmes substances puisqu'elles ont le même Rf, tandis que *Cladonia rangiformis* possède des substances différentes dont les Rf différents.

Le composé majoritaire de *Ramalina farinacea* à différentes altitudes et celui de *Cladonia rangiformis* ne présente pas de migration, nous pouvons déduire que le composé majoritaire n'est ni un depside, ni un depsidone car le révélateur FeCl<sub>3</sub> 1% à la propriété de mettre en évidence ces composés.

Par contre l'extrait lichénique de *Ramalina farinacea* à différentes altitude et *Cladonia rangiformis* contiendraient un des composés puisque le révélateur FeCl<sub>3</sub> a mis en évidence la présence de ces composés (depsides et depsidones).



**Figure 25** : profil chromatographique avec comme phase mobile (130 ml d' Hexane, 20 ml d' A.Formique et 80 ml de Diethylether) et révélée avec  $\text{FeCl}_3$  à 1%.

**Tableau III :** Résultats d'une CCM avec comme phase mobile (200 ml de Toluène et 30 ml d'A. Acétique) et révélée avec FeCl<sub>3</sub> à 1%.

Rf \ Espèces	<i>Ramalina farinacea</i> 1360 m (2016)	<i>Evernia prunastri</i> 1280 m (2015)	<i>Cladonia rangiformis</i> 200 m (2016)	<i>Ramalina farinacea</i> 1280 m (2015)	<i>Evernia prunastri</i> 1260 m (2015)
Composé majoritaire en solution	/	/	/	/	/
	/	/	/	/	/
	/	0.52663	/	0.52663	0.52663
	/	/	/	/	/
	/	/	0.8284	/	/
Extraits lichéniques	/	0.30178	/	/	0.30178
	/	0.49704	0.49704	/	0.49704
	/	0.52663	/	/	0.52663
	/	0.59172	/	/	0.59172
	/	0.8284	0.8284	/	0.83432

Dans ce tableau nous remarquons que :

L'espèce *Ramalina farinacea* 1360 m récolté en 2016 ne contient aucune substance lichénique ni dans le composé majoritaire ni dans l'extrait lichénique, par contre chez *Ramalina farinacea* 1280 m il y a apparition d'une substance qui est la même chez les deux espèces d'*Evernia prunastri* et *Cladonia rangiformis* puisqu'elles possèdent même Rf.

Alors qu'*Evernia prunastri* à différentes altitudes contient des substances lichéniques avec mêmes Rf dans le composé majoritaire et l'extrait lichénique.

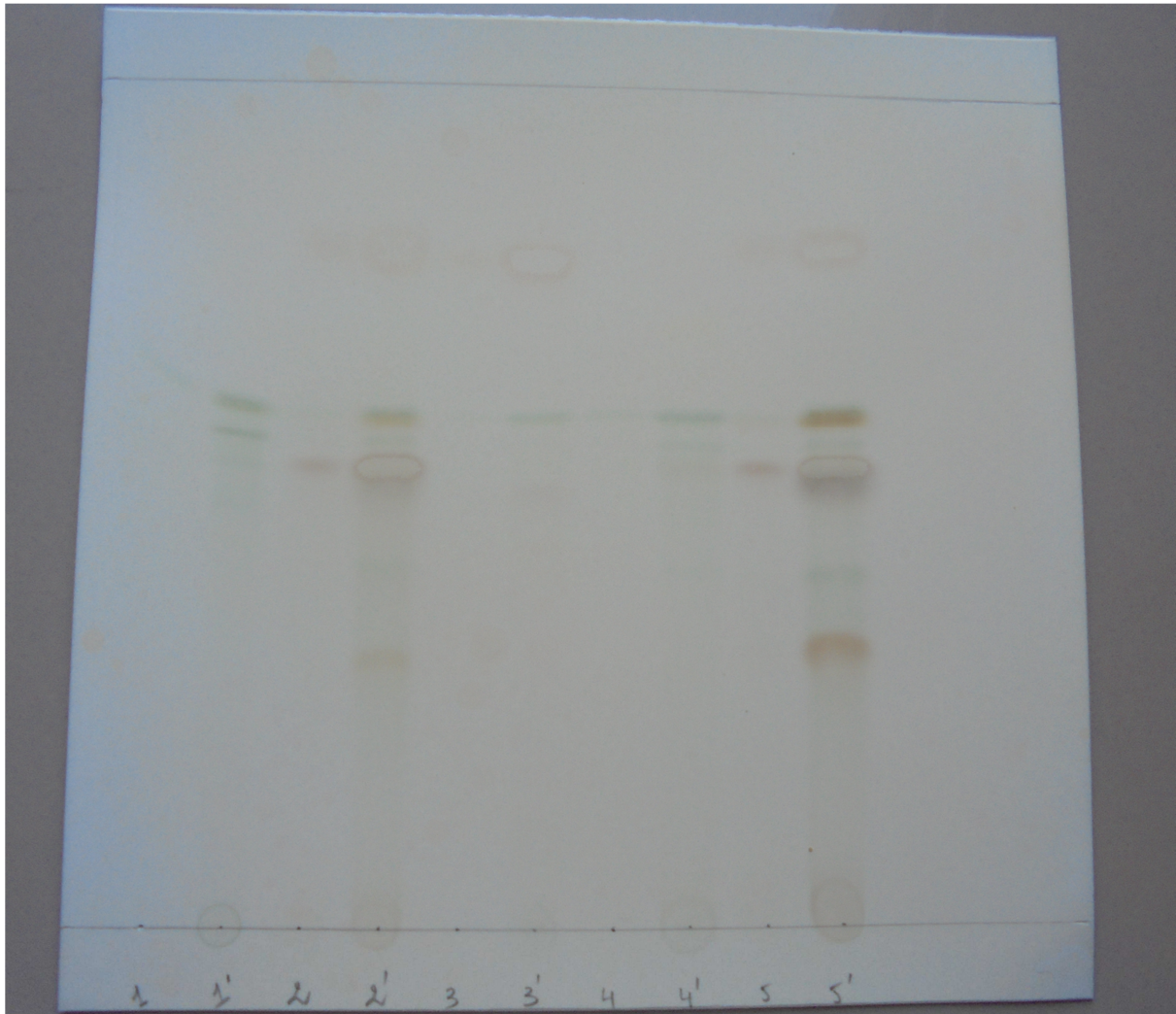
Enfin chez *Cladonia rangiformis* nous remarquons qu'elle contient deux substances dans son extrait lichénique et une seule dans son composé majoritaire.

Nous concluons que la substance existante chez *Evernia prunastri* à différentes altitudes et *Ramalina farinacea* 1280 m est la même pour ces deux espèces.

Le composé majoritaire et l'extrait lichénique de *Ramalina ferinacea* 1360 m ne présente pas de spots de migration, donc nous pouvons déduire que ces composés ne sont ni des depsides, ni des depsidones car le révélateur FeCl<sub>3</sub> a la propriété de mettre en évidence ces composés.

Alors que *Ramalina farinacea* 1280 m présente de spots de migration dans son composé majoritaire cela signifie la présence des depsides et des depsidones.

Par contre, *Evernia prunastri* à différentes altitudes et *Cladonia rangiformis* présentent des spots de migration dans leur composé majoritaire et dans l'extrait lichénique cela signifie que ces composés peuvent être des depsides ou des depsidones.



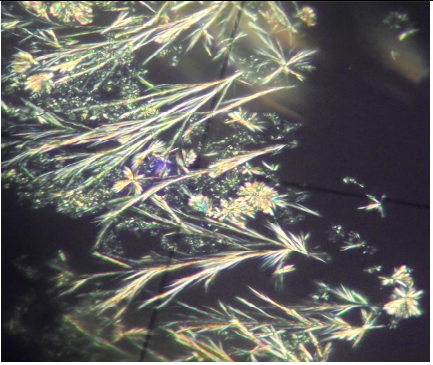
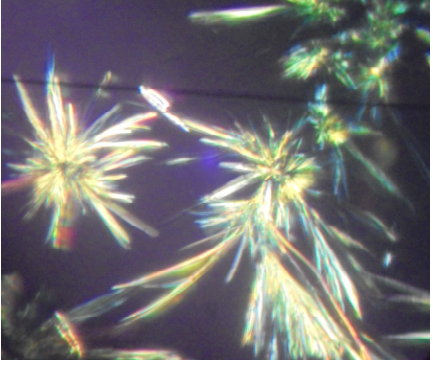
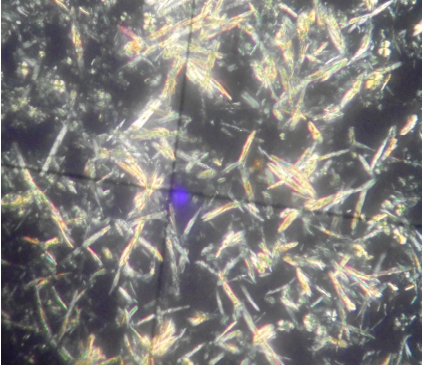
**Figure 26 :** profil chromatographique avec comme phase mobile (200 ml de Toluène et 30 ml d' A. Acétique) révélée avec  $\text{FeCl}_3$  à 1%.

**IV.2. Résultats de la microcristallisation**

Les descriptions sont basées sur l'aspect de ces substances lichéniques cristallisées selon le réactif de cristallisation utilisé. Les observations sont réalisées au microscope en lumière polarisée et au microscope photonique.

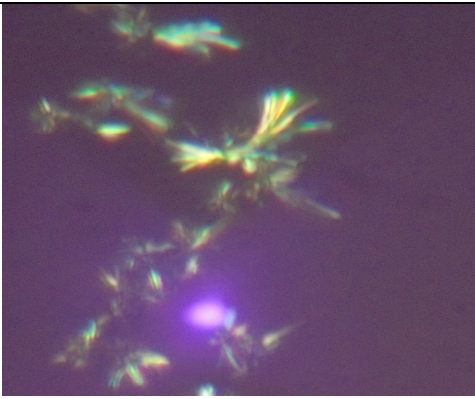
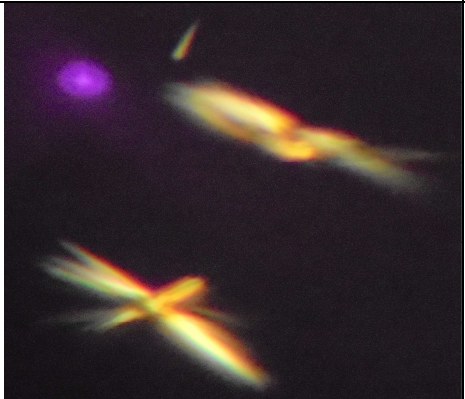
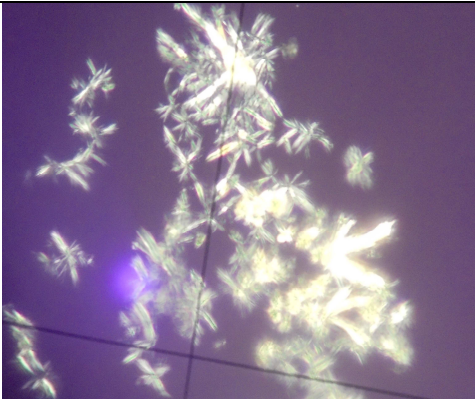
## IV.2.1. observation au microscope en lumière polarisée

## A. Observation avec l'extrait lichénique

Espèces	Réactif cristallogène utilisé : GE	Réactif cristallogène utilisé : GAAn
<i>Ramalina farinacea</i> 1360 m (2016)	Non observé	Non observé
<i>Evernia prunastri</i> 1280 m (2015)	Non observé	
<i>Cladonia rangiformis</i> 200 m (2016)	Non observé	
<i>Evernia prunastri</i> 1260 m (2015)	Non observé	
<i>Ramalina farinacea</i> 1280 m (2015)	Non observé	Non observé

Sous microscope à lumière polarisée nous avons détecté avec le réactif cristallogène GAAn l'acide usnique chez *Evernia prunastri* récolté à 1260 m et 1280 m ainsi que chez *Cladonia rangiformis*, mais absent chez *Ramalina farinacea* récolté à 1280 m en 2015 et à 1360 m en 2016; contrairement au réactif cristallogène GE n'a pas montré ce composé.

#### B. Observation avec l'extrait des composés majoritaires

Espèces	Réactif cristallogène utilisé : GE	Réactif cristallogène utilisé : GAAn
<i>Ramalina farinacea</i> 1360 m (2016)	Non observé	Non observé
<i>Evernia prunastri</i> 1280 m (2015)	Non observé	Non observé
<i>Cladonia rangiformis</i> 200 m (2016)	Non observé	
<i>Evernia prunastri</i> 1260 m (2015)		
<i>Ramalina fariacea</i> 1280 m (2015)	Non observé	Non observé

L'application des réactifs cristallogènes sur l'extrait des composés majoritaires nous a permis d'observer l'acide usnique visiblement en forme d'étoiles chez *Evernia prunastri* 1260 m avec les deux réactifs GE et GAAn ainsi que chez *Cladonia rangiformis* avec le GAAn seulement ; par contre chez les autres espèces l'acide usnique n'a pas été montré avec ces deux réactifs.

- ❖ Avec les réactifs GE et GAAn il y a formation de cristaux transparents polychromes au microscope en lumière polarisée. Cristaux en aiguilles, souvent groupés en étoiles à branches irrégulières.
- ❖ D'après (LAGABRIELLE ,2014) certaines substances présentent en forte teneur masqueraient la présence de l'acide usnique

# *Conclusion*

### Conclusion

Cette étude a eu comme objectif l'extraction et l'identification de l'acide usnique par deux méthodes : la chromatographie sur couche mince et la microcristallisation afin de mettre en évidence l'acide usnique.

En effet, la chromatographie nous a permis de mettre en évidence la présence des depsides et des depsidones grâce à un révélateur spécifique de ces composés (Trichlorofirique). Nous pouvons déduire qu'il s'agirait de l'acide usnique qui est également un depside.

Mais vu le manque de la chloramine T révélateur spécifique de l'acide usnique, nous ne pouvons pas conclure qu'il s'agit de ce composé

Le réactif cristallogène GAAn a montré la présence de l'acide usnique au sein de l'espèce *Cladonia rangiformis* et *Evernia prunastri* récoltée à 1280 m, respectivement en 2016 et 2015.

D'après (LAGABRIELLE, 2014) certaines substances présentent en forte teneur masqueraient la présence de l'acide usnique.

Par contre chez l'espèce *Ramalina farinacea* récoltée à 1360 m en 2016 et 1280 m en 2015 nous n'avons pas observé sur chromatographie sur couche mince les depsides vu l'absence de spots de couleur pourpre chez cette espèce. Ce résultat a été confirmé par la microcristallisation.

En perspectives de recherche, il serait intéressant de poursuivre cette étude sur d'autres espèces récoltées dans d'autres régions de l'Algérie en vue d'une étude chimiotaxonomique et également de doser l'acide usnique afin d'estimer la teneur de ce composé dans chaque espèce par une méthode spectroscopique.

*Les références  
Bibliographiques*

**Bjerke J.W., Joly D., Nilsen L and Brossard T. 2004.** Spatial trends in usnic acid concentrations of the lichen *Flavocetrarianivalis* along local climatic gradients in the Arctic (Kongsfjorden, Svalbard). *Polar biol.*, vol.27, Pp.409-417.

**Boustie J., Tomasi S., Grube M. 2011.** Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. *Phytochem Rev.* Vol.10 , Pp.287-307.

**Cardarelli M., Serino G., Campanella L., Ercole P., De Cicco Nardone F., Alesiani O et Rossiello F. 1997.** Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *CMLS, Cell. mol. Life sci.*, Vol.53, Pp. 667-672.

**Caviglia A.M., Nicora P., Giordani P., Brunialti G., Modenesi P. 2001.** Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians*. *Il Farmaco*, Vol.56, Pp.379-382.

**Clauzade G et Roux C. 1987.** Généralités sur les lichens et leur détermination.

**Cocchietto M., Skert N., Nimis P.L., Sava G. 2002.** A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, Vol.89, Pp.137-146.

**Deruelle S et Lallemant R .1983 .** Les lichens témoins de la pollution. Université biologie.

**Fournet A., Ferreira M.E., Rojas de Arias A., Torres de Ortiz S., Inchausti A., Yalluf G., Quilhot W., Fernandez E and Hidalgo M.E. 1997.** Activity of compounds chilean Lichens against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.116 C, No.1, Pp.51-54.

**Gorenflot R. 1975.** Précis de botanique. Protocoyotes et thallophytes eucaryotes. Paris. Pp. 62-63.

**Huang Z., Tao J., Ruan J., Li C., Zheng C. 2010.** Anti-inflammatory effects and mechanisms of usnic acid, a compound firstly isolated from lichen *Parmelia axatilis*. *Journal of Medicinal Plant Research*, vol.8 (4), Pp.197-207.

**Ingoldsdottir k. 2002.** usnic acid. *Phytochemistry*, Vol.61, Pp.729-736..

**Kirschbaum et Wirth .1997.** Les lichens bio-indicateurs : les reconnaître évaluer la qualité de l'aire .2<sup>ème</sup> édition Eugen Ulmer.

**Lagabrielle J. 2014.** La microcristallisation des substances lichéniques un outil performant pour le lichénologie. *Bull .Ass. Fr. lichénologie*, Vol.39, Pp. 177-184.

- Lechowski Z., Mej E., Bialczyk J.2006.** Accumulation of biomass and some macroelements in tomato plants grown in media with (+)-usnic acid. *Environmental and Experimental Botany*, Vol.56, Pp. 239–244.
- Lukáč M., Prokipčák I., Lacko I., Devínsky F.2012.** Solubilisation of (+)- usnic acid in aqueous micellar solutions of Gemini and heterogemini surfactants and their equimolar mixture. *Acta facultatis pharmaceuticae universitatiscomenianae*.
- Maciazg-Dorszynska M., Wezgrzyn G., et Guzow-Krzeminska B.2014.** Antibacterial activity of lichen secondary metabolite usnic acid is primarily caused by inhibition of RNA and DNA synthesis. *Research letter*.Pp. 57-62.
- Müller k.2001.** Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *ApplMicrobiolBiotechnol* , Vol. 56,no.9, 16p.
- O’Neill MA., Mayer M ., Murray KE.,Rolim-Santos HML., Santos-Magalgães NS., Thompson AM and Appleyard VCL .2010.** Does usnic acid affect microtubules in human cancer cells? *Braz. J. Biol.*, vol. 70, no. 3, Pp. 659-664
- Ozenda P .2000.** Les végétaux, organisation et diversité biologique. 2<sup>ème</sup> éditionDunoud. Paris. Pp.181- 191.
- Ozenda P.,Clauzade G.1970.** Les lichens: étude biologique et flore illustrée .Paris,Masson et cie.Paris.
- Russo A., Piovano M., Lombardo L.,Garbarino J., Crdile V.2008.** Lichen metabolites prenent UV light and nitric oxide-mediated plasmid DNA damage and induce apoptosis in human melanoma cells. *Life Sciences* ,Vol.83,Pp.468-474.
- Souchon Ch.1971.** Les lichens. Que-sais-je ? Presse universitaire de France.Pp.12-15.
- Tiévant P .2001.** Guide des lichens.350 espèces de lichens d’Europe.Paris.
- Van Haluwyn et Lerond .1993.** Guide des lichens. Ed. Le chevalier.
- Vasilios H et Frankos PH.D.2005.** NTP nomination for usnic acid and *usneabarbata* herb. *Science Review FDA-CFSAN-ONPLDS*.Pp 301-436.
- Vijayakumar C.S.,Viswanathan S., Kannappa Reddy M., Parvathavarthini S., Kundu A.B.,Sukumar E.2000.** Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia*.Vol.71, Pp.564-566.

## Résumé

Depuis sa première isolation en 1844, l'acide usnique est devenu le métabolite lichénique le plus étudié et le plus commercialisé. L'acide usnique est présent uniquement chez les lichens et particulièrement abondant chez certaines espèces de genre, *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* et *Evernia*.

Notre étude a porté sur l'isolation et l'identification de ce composé grâce à deux techniques, la chromatographie sur couche mince et la microcristallisation à partir de deux espèces corticoles *Evernia prunastri* et *Ramalina farinacea* et une espèce terricole *Cladonia rangiformis*. À l'aide de réactifs cristallogènes nous avons pu le mettre en évidence surtout chez *Evernia prunastri* récolté à 1260 m.

**Mots clés :** Lichens ; Acide usnique ; *Evernia prunastri* ; *Ramalina farinacea* ; *Cladonia rangiformis* ; Réactifs cristallogènes.

## Abstract

Since its first isolation in 1844, usnic acid has become the most extensively studied lichen metabolite and one of the few that is commercially available. Usnic acid is uniquely found in lichens, and is especially abundant in genera such as *Alectoria*, *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* and *Evernia*.

Our study related to the isolation and the identification of this compound made up of two techniques, chromatography and the microcristallisation starting from two corticol species *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea* and a terricol species *Cladonia rangiformis*. By using crystallogenes reagents, we could highlight it at *Evernia prunastri* collected at 1260 m.

**Keys words:** lichens; usnic acid; *Evernia prunastri* ; *Ramalina farinacea* ; *Cladonia rangiformis* ; crystallogenes reagents.