



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار - عنابة

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR - ANNABA



**FACULTÉ DES SCIENCES  
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE  
LABORATOIRE DE Biologie Végétale et Environnement**

**Thèse En vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat**

**Domaine : SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE**

**Filière : Biologie et Physiologie Végétale**

**Spécialité : Biologie et Physiologie Végétale**

**Intitulé**

**Etude phytochimique et activité biologique d'espèces  
licheniques du Parc National d'el Kala (Nord-Est algérien)**

**Présentée par : KERBOUA Marwa**

**Directeur de thèse : Mme. ALI AHMED Monia (Pr, Université Badji Mokhtar - Annaba)**

**Devant un jury composé de :**

Pr. BENSLAMA Mohamed	Président	Université Badji Mokhtar - Annaba
Pr. SERIDI Ratiba	Examineur	Université Badji Mokhtar - Annaba
Dr. MAIZI Naila	Examineur	Université Akli Mohand Oulhadj Bouira
Dr. BOUMEDRISS Zine eddine	Examineur	Université Chadli Bendjedid- El Taref

Année universitaire : 2022/2023

## *Dédicace*

Je dédie ce modeste travail

A mes parents, source constante d'encouragement

A ma sœur et ma princesse Zahra

A mon frère Mohamed

A mon marie Tarek

A la prunelle de mes yeux ma fille Ranime

A ma meilleure amie Rafika

A mes amis et à tous les membres de ma famille

# *Remerciements*

En premier lieu je voudrais remercier **DIEU** le tout puissant de m'avoir donné le courage, la patience et la force de finir à bien ce projet de thèse.

Je remercie chaleureusement ma directrice de thèse Mme **Monia ALI AHMED**, Pr au Département de Biologie, Université Badji Mokhtar-Annaba qui m'a fait l'honneur d'accepter de m'encadrer, pour tous les acquis scientifiques que j'ai reçu d'elle, pour la passion partagée du monde fantastique des lichens, pour son soutien durant mon stage et tout au long de ces années de labeurs, ses précieux conseils, sa patience ainsi que pour toutes ses qualités scientifiques et humaines.

Je tiens également à remercier Pr. **Jesus Migeul lopez rodila** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci vivement pour votre disponibilité et votre aide au quotidien au cours de mon stage à Covilha, vous m'avez fait découvrir et initier d'autres aspects de la recherche, sans oublier de remercier Dr **Nsevolo Samba** et Dr **Antonio Moises Selua** pour leurs soutien et disponibilité tout au long de mon séjour au Portugal.

Nos vifs remerciements vont à Mr **Benslama Mohamed**, Pr au Département de Biologie, Université Badji Mokhtar-Annaba pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider ces Mes vifs remerciements vont également à Mme **SERIDI Ratiba**, Pr à l'Université Badji Mokhtar Annaba qui nous a fait l'honneur d'examiner ma thèse.

Je remercie vivement Mme **Maizi Naila** Dr à l'université Akli Mohand Oulhadj Bouira d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

J'aimerais également remercier Mr **Boumedris Zine eddine**, Dr à l'Université Chadli Bendjedid El Tarf d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Veillez trouver, mesdames, messieurs l'expression de mes plus profonds respects.

J'adresse mes sincères remerciements au personnel du parc national d'El Kala, El Taref et plus précisément inspecteur principal des forêts Mr **Ghrira Abdeslem** pour sa disponibilité et ses riches informations botaniques tout au long de nos sorties sur terrain.

Sans oublier les membres de l'équipe du laboratoire de Biologie végétale et environnement pour leur encouragement et leur soutien tout long de notre pratique.

Enfin je remercie aussi toute l'équipe du laboratoire de Biologie Végétale et Environnement.

## **PRODUCTION SCIENTIFIQUE**

### **Publications**

- 1. *Phytochemical Investigation of New Algerian Lichen Species: *Physcia mediterranea* Nimis. (Molecules 2021, 26, 1121.)***

*Auteurs : Marwa Kerboua, Monia Ali Ahmed, Nsevolo Samba, Radhia Aitfella-Lahlou, Lucia Silva, Juan F. Boyero, Cesar Raposo and Jesus Miguel Lopez Rodilla*

- 2. *Phytochemical composition of lichen *Parmotrema hypoleucinum* (J.Steiner) Hale from Algeria.( Molecules 2022,27 (16),5229)***

*Auteurs : Marwa Kerboua, Ali Ahmed Monia, Nsevolo Samba, Lúcia Silva, Cesar Raposo, David Díez and Jesus Miguel Rodilla*

### **Communications internationales**

- 1. *Vème Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources, 22 au 25 Mars 2017.***

*« Valorisation d'un Lichen foliace « *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm dans La région D'el Kala »*

*Kerboua Marwa, Ali Ahmed Monia*

<http://www.atbvbr.tn/confirmation>

- 2. *VIIème Congrès International de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources, 20 au 23 Mars 2019.***

*Activité antioxydante de deux espèces lichéniques (Parmeliaceae) récoltées dans la région d'El kala au Nord- Est Algérien*

*Kerboua Marwa, Ali Ahmed Monia*

<http://www.atbvbr.tn/confirmation>

### **Communications nationales**

- 1. *La Biodiversité en Algérie : Connaissance, valorisation & Conservation'' Batna, 22 mai 2016***

*Etude phytochimique de deux espèces de la Famille des Fabaceae (*Genista aspalathoides lamk, Genista ulicina spach*)*

*M. Kerboua, T. Hamel, M. Ali Ahmed, R. Brakni*

- 2. *Troisième Colloque National sur la Biodiversité en Algérie, Oum El Bouaghi le 25 Avril 2018.***

*Contribution a l'étude chimique de deux especes lichéniques saxicoles dans la région d'el kala*

*Kerboua Marwa, Ali Ahmed Monia*

**3. IIème Séminaire National de Protection des Végétaux en Zones Arides ,12 novembre 2019**

*Evaluation de l'activité antioxydante de Parmotrema réticulatum récolté dans la région d'El Kala au Nord- Est Algérien*

*Kerboua Marwa, Ali Ahmed Monia, Boudiaf Sarra*

**Projets de recherche : membres dans les projets suivants**

**Projets PRFU**

▪ **Projet 1 :\_Investigation phytochimique des lichens de la région d'Annaba, activités biologiques de leurs métabolites secondaires**

**Code : 001N014N230111111111111120190007. Projet agréé à partir de 2019**

**Responsable du projet : Pr ALI AHMED Monia**

▪ **Projet 2 : Les lichens du parc national d'el Kalal sources de molécules bioactives**

**Code : DO1N01UN230120220002. Projet agréé à partir de 2022**

**Responsable du projet : Pr ALI AHMED Monia**

## Résumé

Les lichens synthétisent des produits nécessaires pour leur croissance et leur développement, et également une grande variété de produits nommés métabolites secondaires en réponse à différents types de stress. Ces métabolites secondaires constituent une défense pour ce magnifique organisme symbiotique et qui sont considérés de nos jours une source innovante de molécules bioactives dans différents domaines (médicale, pharmaceutique, cosmétique, agronomiques et bien d'autres).

Notre étude fait l'objet d'une investigation phytochimique de 3 espèces lichéniques algériennes récoltées au sein du parc national d'El kala : *Parmotrema hypoleucinum* (**Par hyp**), *Physcia mediterranea* (**Phy med**) (nouveau taxon pour la flore lichénique algérienne identifié durant cette thèse) et *Parmotrema reticulatum* (**Par ret**) ainsi que l'évaluation de l'activité antioxydante de ces trois espèces. Le criblage phytochimique a été effectué à l'aide des techniques GC-MS, HPLC-ESI-MS-MS et RMN.

Sachant que le substrat joue un rôle dans la composition chimique de l'espèce, *P. hypoleucinum* a été prélevé sur deux supports différents : *Olea europea* et *Quercus coccifera*. (**Par hyp 1 et Par hyp 2**). Des extraits à l'hexane ont été préparés, chacun a été fractionné par sa solubilité dans le méthanol ; les produits solubles dans le méthanol ont été séparés (à froid) : 1-Hexane, 2-Hexane, 3-Hexane, 4-Hexane ; et les produits insolubles dans le méthanol (à froid) : 1-Cires, 2-Cires, 3-Cire et 4-Cire ont été tous analysés par GC-MS ; les composants ont été identifiés comme étant des esters méthyliques des acides gras prédominants : acide palmitique, acide linoléique, acide oléique et acide stéarique ; un hydrocarbure a également été identifié : le 13-méthyl-17-norkaur-15-ène qui n'a jamais été détecté auparavant chez les lichens et plusieurs dérivés de l'acide orsellinique. La partie cire 3 de l'espèce *Physcia mediterranea* est caractérisée par la présence d'atranorine, un depside de haute valeur biologique. Les RMN du proton <sup>1</sup>H et du carbone <sup>13</sup>C ont confirmé son identification.

L'analyse par HPLC-MS/MS pour les trois extraits (Hexane, Chloroforme et Ethanol) nous a permis d'identifier différents composants chimiques de différentes familles notamment des composés phénoliques, des depsides, des depsidones, des depsones, des dibenzofuranes et des acides aliphatiques. Certains composés ont été identifiés pour la première fois chez certaines de nos espèces étudiées. L'atranorine et la chloroatranorine ont été identifiés comme des composés majoritaires.

L'activité antioxydante par DPPH a été également testée sur les extraits chloroformique et éthanoliques des 3 espèces lichéniques déjà cités. Les extraits éthanoliques des trois lichens ont montré une activité anti-oxydante très élevée, par contre les extraits chloroformiques de *P.hypoleucinum* et *P. reticulatum* montrent une activité moyenne, enfin une faible activité antioxydante a été détectée chez *Physcia mediterranea*.

**Mots clés :** *Parmotrema hypoleucinum*, *Physcia mediterranea*, *Parmotrema reticulatum*, GC-MS, HPLC-MS/MS, RMN, identification, activité anti-oxydante.

## Abstract:

Lichens synthesize products needed for their growth and development, in addition to a wide variety of products called secondary metabolites in response to different types of stress. These secondary metabolites are a defense for this beautiful symbiotic organism and are considered nowadays as innovative source of bioactive molecules in different fields (medical, pharmaceutical, cosmetic, agronomic and many others).

Our study is the subject of a phytochemical investigation of three Algerian lichen species harvested within the El kala National Park : *Parmotrema hypoleucinum* (Par hyp), *Physcia mediterranea* (Phy med) (new taxon for the Algerian lichen flora identified during this thesis) and *Parmotrema reticulatum* (Par ret); as well as the evaluation of the antioxidant activity of these three species. Phytochemical screening was performed using GC -MS, HPLC- ESI MS-MS and NMR techniques.

Knowing that the substrate affects the chemical composition of the species, *P. hypoleucinum* was collected from two different substrates: *Olea europea* and *Quercus coccifera*. (Par hyp 1 and Par hyp 2). Hexane extracts have been prepared, each has been fractionated by its solubility in methanol; the products that are soluble in methanol have been separated: 1-Hexane, 2-Hexane, 3-Hexane, 4-Hexane; and the products that are insoluble in methanol: 1-Cires, 2-Cires, 3-Cire and 4-Cire were all analysed by GC-MS. The components were identified as methyl esters of the predominant fatty acids: palmitic acid, linoleic acid, oleic acid and stearic acid; a hydrocarbon was also identified: 13-methyl-17-norkaur-15-ene, which has never been previously detected in lichens and several orselline acid derivatives. The wax part 3 of the species *Physcia mediterranea* is characterized by the presence of atranorine, a depside of high biological value. The <sup>1</sup>H proton and <sup>13</sup>C carbon NMR confirmed its identification.

The analysis by HPLC-MS/MS for the three extracts (Hexane, Chloroform and Ethanol) allowed us to identify different chemical components of different families including phenolic compounds, depsides, depsidones, Depsones, dibenzofurans and aliphatic acids. Some compounds were identified for the first time in some of our studied species. Atranorin and chloroatranorine were identified as majority compounds.

The antioxidant activity by DPPH was also tested on the chloroformic and ethanolic extracts of the three lichen species already mentioned. The ethanolic extracts of the three lichens showed a very high antioxidant activity, whereas the chloroformic extracts of *P.hypoleucinum* and *P. reticulatum* showed a medium activity, finally a low antioxidant activity was detected in *Physcia mediterranea*.

**Keywords :** *Parmotrema hypoleucinum*, *Physcia mediterranea*, *Parmotrema reticulatum*, GC MS, HPLC-MS/MS, NMR, identification, antioxidant activity.

## الملخص

تصنع الأشنات العديد من المنتجات اللازمة لنموها وتطورها، وكذلك مجموعة متنوعة من المنتجات تسمى المواد الثانوية استجابة لأنواع مختلفة من الإجهاد. هذه المستقلبات الثانوية تشكل دفاعًا عن هذا الكائن التكافلي الرائع والتي تعتبر في الوقت الحاضر مصدرًا مبتكرًا للجزيئات النشطة بيولوجيًا في مختلف المجالات (الطبية والصيدلانية والتجميلية والزراعية وغيرها).

موضوع دراستنا هو تحقيق كيميائي نباتي لثلاثة أنواع من الأشنة الجزائرية تم جمعها داخل الحديقة الوطنية للقالبة: *Parmotrema hypoleucinum* (Par hyp)، *Phy scia mediterranea* (Phy med) (صنف جديد من الأشنة الجزائرية والذي تم تحديده خلال هذه الأطروحة) و *Parmotrema reticulatum* (Par ret) وكذلك تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لهذه الأنواع الثلاثة. تم أيضا إجراء الفحص الكيميائي الشامل باستخدام تقنيات GC-MS و HPLC-ESI-MS-MS و NMR.

مع العلم أن أنواع الأشجار الحاملة (phorophyte) تلعب دورًا في التركيب الكيميائي للأنواع الأشنية، تم أخذ عينات من *Parmotrema hypoleucinum* من حاملين مختلفين: *Olea europea* و *Quercus coccifera*. (Par hyp 1 et 2). تم تحضير مستخلصات الهكسين، وتم تجزئة كل منها بقابليتها للذوبان في الميثانول. تم فصل المنتجات القابلة للذوبان في الميثانول (على البارد): Hexane-1، Hexane-2، Hexane-3، Hexane-4؛ والمنتجات غير القابلة للذوبان في الميثانول (بارد): تم تحليل 1-Cire و 2-Cire و 3-Cire و 4-Cire بواسطة GC/MS؛ تم تحديد المكونات على أنها استرات الميثيل للأحماض الدهنية السائدة: حمض البالميتيك وحمض اللينوليك وحمض الأوليك وحمض دهني؛ تم تحديد الهيدروكربون أيضًا: 15-ène-17-norkaur-13-méthyl- الذي لم يسبق اكتشافه من قبل في الأشنات والعديد من مشتقات حمض الأورسيلينيك. يتميز الجزء الثالث من 3-cires من نوع *Phy scia mediterranea* بوجود الأترانورين، وهو ديسيد ذو قيمة بيولوجية عالية. أكدت RMN بروتون 1H و كربون 13C تحديد هويته.

مكننا التحليل بواسطة HPLC-MS/MS للمستخلصات الثلاثة (الهكسان والكلوروفورم والإيثانول) من تحديد مكونات كيميائية مختلفة من عائلات مختلفة، لا سيما المركبات الفينولية، ديبسيديس، ديبسيدون، ديبسون، ثنائي بنزوفيران وأحماض الأليفاتيك. تم التعرف على بعض المركبات لأول مرة في بعض الأنواع المدروسة لدينا. تم التعرف على الأترانورين والكلواترانورين، كمركبات رئيسية.

تم أيضًا اختبار النشاط المضاد للأكسدة بواسطة DPPH على مستخلصات الكلوروفورم والإيثانول لأنواع الأشنات الثلاثة التي سبق ذكرها. أظهرت المستخلصات الإيثانولية للأشنات الثلاثة نشاطًا مضادًا للأكسدة مرتفعًا جدًا، من ناحية أخرى، أظهرت مستخلصات الكلوروفورم من *P. hypoleucinum* و *P. reticulatum* نشاطًا متوسطًا.

**الكلمات المفتاحية:** *Parmotrema hypoleucinum*، *Phy scia mediterranea*، *Parmotrema reticulatum*، GC/MS، HPLC-MS/MS، NMR، التحديد الكيميائي، نشاط مضادات الأكسدة.

# Sommaire

*Remerciements*

*Résumé*

*Abstract*

*المخلص*

*Liste des figures*

*Liste des tableaux*

*Abréviations*

**INTRODUCTION** ..... 1

**PARTIE I Présentation sommaire des lichens et leurs métabolites** ..... 4

**Chapitre I : Généralités sur les lichens**..... 5

1. **Historique de la Lichenologie en Algérie**..... 5

2. Définition ..... 6

3. Morphologie du thalle..... 6

4. Structure anatomique ..... 8

4.1. Structure homéomère ..... 8

4.2. Structure hétéromère ..... 8

5. Organes portés par le thalle..... 9

5.1 Organes non reproducteurs ..... 9

5.2. Organes reproducteurs..... 9

6. Reproduction et cycle de développement ..... 10

6.1. Multiplication végétative..... 10

6.1.1. Les soralies ..... 10

6.1.2. Les isidies ..... 10

6.2. Reproduction Sexuée..... 11

6.2.1 Les apothécies..... 12

6.2.2. Les périthèces ..... 12

7. Echanges nutritionnels entre les partenaires ..... 13

8. Ecologie et Répartition..... 14

9. Usages et Intérêts des lichens..... 15

9.1. Usages alimentaires ..... 15

9.2. Usages Médicaux ..... 15

9.3. Usages industriels..... 17

9.3.1 Teinture..... 17

9.3.2. Parfumerie ..... 17

9.4. Bioindicateurs de pollution ..... 17

**Chapitre II : Les métabolites lichéniques**..... 18

1. Les voies de biogénèse des métabolites secondaires lichéniques ..... 18

1.1. Voie de l'acide mévalonique.....	19
1.2. Voie de l'acide shikimique.....	20
1.3. Voie de l'acétate polymalonate .....	20
2. Activités biologiques des métabolites secondaires lichéniques.....	22
<b>Partie II Espèces lichéniques étudiées .....</b>	<b>4</b>
<b>Chapitre I : Présentation de l'environnement d'étude (Parc National d'El Kala).....</b>	<b>25</b>
1. Situation géographique .....	25
2. Description du Parc National d'El Kala.....	26
2.1. Géologie et géomorphologie .....	26
2.2. Réseau hydrographique .....	27
3. Données climatiques .....	28
4. Richesses biologiques .....	29
4.1. Richesse faunistique.....	29
4.2. Richesse floristique .....	29
<b>Chapitre II : Récolte et Identification des espèces étudiées.....</b>	<b>30</b>
1. Choix des espèces .....	30
2. Descriptions des stations d'études .....	30
3. Echantillonnages et conservation des espèces .....	32
4. Identification d'espèces lichéniques étudiées : .....	32
4.1 Observation macroscopique .....	32
4.2 Réactions thallines.....	33
4.3 Observation microscopique.....	33
<b>Chapitre III : Résultats et discussions .....</b>	<b>34</b>
1. Description botanique .....	34
2. Caractéristiques macroscopiques .....	36
3. Caractéristiques Histologiques.....	37
4. Réactions thallines .....	41
Conclusion : .....	42
<b>Partie III Etude Phytochimique &amp; Activité antioxydante des espèces étudiées.....</b>	<b>23</b>
<b>Chapitre I Préparation des extraits lichéniques .....</b>	<b>44</b>
1. Choix des solvants .....	44
2. Procédés d'extraction utilisés.....	44
<b>Chapitre II Résultats et discussion de l'étude phytochimique .....</b>	<b>46</b>
1. Rendement d'extraction .....	46
2. Profil phytochimique de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> (J. Steiner) Hale collectée sur deux phorophytes différents :.....	48
2.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> récoltée sur deux phorophytes différents par GC/MS.....	48
2.1.1 Analyse chimique de l'extrait hexanique soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 1-Hexan et 2-Hexane de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> récoltée sur deux phorophytes différents par GC/MS.....	49

2.1.2 Analyse chimique de l'extrait hexanique insoluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 1-Cire et 2-Cire de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> récoltée sur deux phorophytes différents par GC/MS.....	52
2.2. Analyse chimique de l'extrait hexanique de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> collectés sur deux phorophytes différents par HPLC-MS/MS :.....	55
2.2.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique soluble dans le MeOH 1-Hexane et 2-Hexane de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> collectés sur deux phorophytes différents par HPLC-MS/MS .....	55
2.2.2. Analyse chimique de l'extrait hexanique insoluble dans le MeOH 1-Cire et 2-Cire de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> collecté sur deux phorophytes différents par HPLC-MS/MS .....	62
2.2.3 Analyse chimique de l'extrait chloroformique de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> collectés sur deux phorophytes différentes par UHPLC-ESI-MS/MS : .....	65
2.2.4 Analyse chimique de l'extrait Ethanolique de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> collectés sur deux phorophytes différentes par UHPLC-ESI-MS/MS : .....	69
Conclusion : .....	74
3. Profil phytochimique de <i>Physcia mediterranea</i> Nimis (Taxon nouvellement identifié en Algérie).....	74
3.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique de <i>Physcia mediterranea</i> Nimis par GC/MS .....	74
3.1.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane (3-hexane) de <i>Physcia mediterranea</i> Nimis par GC/MS : .....	74
3.2 Elucidation structurale de l'Atranorine isolé de l'extrait 3-cire insoluble dans le MeOH de <i>Physcia mediterranea</i> Nimis par Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire bidimensionnelle (RMN- 2D).....	77
3.2.1. Corrélations HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) .....	80
3.2.2. Correlation HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) .....	81
3.2.3. Correlation NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).....	83
3.2.4. Correlation ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy).....	85
3.3. Analyse chimique de l'extrait hexanique (3-hexane) de <i>Physcia mediterranea</i> Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS :.....	87
3.4 Analyse chimique de l'extrait hexanique (3-cire) de <i>Physcia mediterranea</i> Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS :.....	92
3.5 Analyse chimique de l'extrait chloroformique de <i>Physcia mediterranea</i> Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS : .....	95
3.6 Analyse chimique de l'extrait Ethanolique de <i>Physcia mediterranea</i> Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS : .....	98
4. Profil phytochimique de <i>Parmotrema reticulatum</i> .....	100
4.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique de <i>Parmotrema reticulatum</i> par GC/MS .....	100
4.1.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane (4-hexane) de <i>Parmotrema reticulatum</i> par GC/MS.....	100
4.1.2. Analyse chimique de l'extrait hexanique insoluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane (4-cire) de <i>Parmotrema reticulatum</i> par GC/MS.....	102

4.2. Analyse chimique de l'extrait hexanique de <i>Parmotrema reticulatum</i> par UHPLC/ESI/MS/MS .....	103
4.2.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique (4-hexane) de <i>Parmotrema reticulatum</i> par HPLC/ESI/MS/MS.....	103
4.2.2. Analyse chimique de l'extrait hexanique (4-cire) de <i>Parmotrema reticulatum</i> par HPLC-ESI-MS/MS.....	106
4.2.3 Analyse chimique de l'extrait chloroformique de <i>Parmotrema reticulatum</i> par UHPLC/ESI/MS/MS : .....	108
4.2.4. Analyse chimique de l'extrait ethanolique de <i>Parmotrema reticulatum</i> par UHPLC/ESI/MS/MS : .....	111
<b>Chapitre III : Evaluation de l'activité antioxydante des 3 espèces étudiées .....</b>	<b>114</b>
1. Activité anti-oxydante de l'extrait ethanolique et chloroformique de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> ( <i>Par hyp 1</i> et <i>Par hyp 2</i> ).....	114
2. Activité anti-oxydante de l'extrait ethanolique et chloroformique de <i>Physcia mediterranea Nimis</i> .....	119
3. Activité anti-oxydante de l'extrait ethanolique et chloroformique de <i>Parmotrema reticulatum</i> .....	121
Conclusion .....	123
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>23</b>
<b><i>PARTIE IV Partie expérimentale (Méthodes analytiques &amp; Appareillages).....</i></b>	<b><i>129</i></b>
1. Méthode d'analyse des extraits par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au Spectre de Masse (GC/MS) : .....	130
2. Méthode d'analyse des extraits par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ionisation par électrospray (HPLC / ESI-MS / MS) .....	130
3. Spectrométrie de résonance Magnétique Nucleaire(RMN) .....	131
4. Test biologique : Activité anti-oxydante (DPPH).....	131
<b><i>Références bibliographiques .....</i></b>	<b><i>134</i></b>
<b><i>Annexes.....</i></b>	<b><i>172</i></b>

## ***Liste des abréviations***

**AFL** : Association française de Lichénologie

**AAI** : Indice d'activité antioxydante

**C** : Hypochlorite de sodium

**C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH** : Ethanol

**CHCl<sub>3</sub>** : Chloroforme

**CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice à 50%

**CLHP** : Chromatographie liquide haute performance

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

**ESI** : Electrospray ionisation

**g** : Gramme

**GC/SM** : Chromatographie gazeuse couplé au spectre de masse

**h** : Heure

**Hz** : Hertz

**K** : Potasse

**KOH** : Hydroxyde de potassium

**LC-ESI-MS/MS** : Chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse

**m/z** : Masse/charge d'un ion

**Marc** : Macération

**MeOH** : Méthanol

**min** : Minute

**ml** : Millilitre.

**MM** : Masse moléculaire

**mm** : Millimètre.

**MS** : Mass spectrometry

**P** : para-phényléthylèneamine

**pH** : Potentiel d'hydrogène

**Ppm** : Partie par millions

**RMN** : Résonance magnétique nucléaire

**RMN-1H** : Résonance magnétique nucléaire du proton

**RMN-2D** : Résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle

**RMN-C13** : Résonance magnétique nucléaire du carbone

**Rt** : Temp de rétention

**s** : Singulet

**t** : Triplet

**UV** : Ultraviolet

**δ** : Déplacement chimique exprimé en ppm

**λ max** : Longueur d'onde d'absorption maximale

**μM** : Micromole

**%** : Pourcentage

**[M-H]**-= masse calculé

**MT**= masse théorique

## *Liste des tableaux*

Tableau 1 :Représentation des différents types de thalles lichéniques (Gavériaux, 2009) .....	7
Tableau 2 :Lichens utilisés en médecine traditionnelle.....	16
Tableau 3 :Principales classes de métabolites secondaires des lichens (Thi Huyen Vu, 2014)22	
Tableau 4 :Quelques exemples de métabolites secondaires lichéniques et leurs activités biologiques associées .....	23
Tableau 5 :Variation moyenne de la température et de la pluviométrie (1985-2010). .....	28
Tableau 6 :Différents stations de récoltes .....	30
Tableau 7 :Différentes espèces étudiées et leurs substrats .....	32
Tableau 8 :Différents synonymes utilisés des 3 espèces étudiées.....	34
Tableau 9: Caractéristiques morphologiques des espèces récoltées .....	36
Tableau 10 :Résultats des réactions thallines des espèces lichéniques étudiés.....	41
Tableau 11 :Masses des espèces lichéniques .....	44
Tableau 12 :Rendement d'extraction des différents extraits des espèces étudiées. ....	46
Tableau 13 :Composés chimiques de l'extrait d'Hexane soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 1-Hexane de Parmotrema hypoleucinum (Par hyp 1) par (GC-MS).....	49
Tableau 14 :Composés chimiques de l'extrait d' Hexane soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 2-Hexane de Parmotrema hypoleucinum (Par hyp 2) par (GC-MS).....	50
Tableau 15 :Composés en communs de l'extrait 1-Hexane et 2-Hexane de P.hypoleucinum collecté sur différents substrats : Olea europaea et Quercus coccifera.....	51
Tableau 16 :Composés chimiques de l'extrait d' Hexane insoluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 1-Cire de Parmotrema hypoleucinum (Par hyp 1) par (GC-MS).....	53
Tableau 17 :Composés chimiques de l'extrait d' Hexane insoluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 2-Cire de Parmotrema hypoleucinum (Par hyp 2) par (GC-MS).....	53
Tableau 18 :Identification des substances lichéniques de l'extrait d'hexane soluble dans le MeOH de Parmotrema hypoleucinum, (Olea europea), 1-Hexane et (Quercus coccifera), 2- Hexane .....	56
Tableau 19 :Identification des substances lichéniques de l'extrait d'hexane insoluble dans le MeOH de Parmotrema hypoleucinum, (Olea europea), 1-Cire et (Quercus coccifera), 2-Cire.....	63
Tableau 20 :Identification des substances lichéniques de l'extrait chloroformique de Parmotrema hypoleucinum, (Olea europea) ,1-Chloroforme et (Quercus coccifera), 2-Chloroforme. ....	66
Tableau 21 :Identification de composés lichéniques de l'extrait éthanolique de Parmotrema hypoleucinum, (Olea europea) ,1-éthanol et (Quercus coccifera), 2-éthanol. ....	70
Tableau 22 : Identification des métabolites dans l'extrait hexanique (3-hexane) de Physcia mediterranea par GC-MS. ....	77
Tableau 23: Informations spectroscopiques RMN du proton et C-13 et corrélations H-C.....	86
Tableau 24: Identification des substances lichéniques de l'extrait (3-Hexane) de Physcia mediterranea par UHPLC/ESI/MS/MS.....	88
Tableau 25: Identification des substances lichéniques de l'extrait (3-cire) de Physcia mediterranea par UHPLC/ESI/MS/MS.....	93

Tableau 26: Identification des substances lichéniques de l'extrait chloroformique de <i>Physcia mediterranea</i> Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS .....	96
Tableau 27: Identification des substances lichéniques de l'extrait éthanolique de <i>Physcia mediterranea</i> Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS .....	99
Tableau 28: Identification des métabolites dans l'extrait d'Hexane en partie soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Hexane de <i>Parmotrema reticulatum</i> .....	101
Tableau 29: Identification des métabolites dans l'extrait d'Hexane en partie insoluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Cire de <i>Parmotrema reticulatum</i> .....	102
Tableau 30: Identification des substances lichéniques de l'extrait (4-Hexane) de <i>Parmotrama reticulatum</i> par UHPLC/ESI/MS/MS .....	104
Tableau 31: Identification des substances lichéniques de l'extrait (4-Cire) de <i>Parmotrama reticulatum</i> par UHPLC/ESI/MS/MS .....	107
Tableau 33: Identification des substances lichéniques de l'extrait chloroformique de <i>Parmotrama reticulatum</i> par UHPLC/ESI/MS/MS .....	109
Tableau 34: Identification des substances lichéniques de l'extrait éthanolique de <i>Parmotrama reticulatum</i> par UHPLC/ESI/MS/MS. ....	112
Tableau 35: Valeurs des IC 50, AAI et classification de l'activité antioxydante pour l'extrait éthanol, chloroforme et pour les étalons de rutine, de trolox et d'acide gallique de <i>P. hypoleucinum</i> .....	118
Tableau 36: Valeurs des IC 50, AAI et classification de l'activité antioxydante pour l'extrait éthanolique, chloroformique et pour les étalons de rutine, de trolox et d'acide gallique de <i>Physcia mediterranea</i> . ....	120
Tableau 37: Valeurs des IC 50, AAI et classification de l'activité antioxydante pour l'extrait éthanol, chloroforme et pour les étalons de rutine, de trolox et d'acide gallique de <i>Parmotrema reticulatum</i> . ....	122
Tableau 38: Classification d'un échantillon selon le type d'activité antioxydante montré.....	133

## Liste des figures

Figure 1: Principales structures histologique rencontrées chez les lichens.....	9
Figure 2: Représentations schématiques de certains organes reproducteurs et non reproducteurs (Biéro et al., 2008). .....	10
Figure 3: Isidies de <i>Pseudevernia furfuracea</i> (L.) Zopf (à gauche) et sorédies d' <i>Imshaugia aleurites</i> (à droite) .....	11
Figure 4: Cycle théorique de reproduction des lichens : phase végétative et sexuée ( <a href="http://home.cc.umanitoba.ca/~pierceyn/lifecycle.html">http://home.cc.umanitoba.ca/~pierceyn/lifecycle.html</a> ) .....	11
Figure 5: Photo d'une apothécie lécanorine                      Photo d'une apothécie lécidéine.....	12
Figure 6: Photo et dessin d'un périthèce .....	12
Figure 7: Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens (Parrot, 2014).....	13
Figure 8: Quelques exemples de lichens sur différents types de substrats <a href="http://www.waysofenlichenment.net/lichens/alphabetic_index.html">http://www.waysofenlichenment.net/lichens/alphabetic_index.html</a> .....	14
Figure 9: Les différentes voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques.....	19
Figure 10: Structures de produits dérivés de la voie de l'acide mévalonique .....	19
Figure 11: Structures chimiques de l'acide shikimique, la phénylalanine et des composés dérivés de l'acide pulvinique .....	20
Figure 12: Structures de quelques précurseurs des polycétides aromatiques.....	20
Figure 13: Structures de quelques polycétides aromatiques .....	21
Figure 14: Structures de l'acide lichestérinique, l'acide rocellique et de l'acide rangiformique .....	21
Figure 15: Localisation du Parc National d'El Kala (P.N.E.K., 2010) .....	25
Figure 16: Carte Géologique du Parc National d'El Kala (Benyacoub et al., 1998) .....	27
Figure 17: Localisation géographique des stations d'études dans le Parc National d'El Kala	31
Figure 18: Stations échantillonnées au niveau du Parc National d'El Kala.....	32
Figure 19: Talles des espèces lichéniques récoltées.....	36
Figure 20: Aspect générale du thalle de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> .....	37
Figure 21: Aspect générale du thalle de <i>Physcia mediterranea</i> avec les organes reproducteurs (apothécies et pycnides) .....	37
Figure 22: Coupe transversale (a, b) du thalle de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> (x400).....	38
Figure 23: Coupe transversale des rhizines et cils au niveau du thalle de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> (x400). .....	38
Figure 24: Coupe transversale du thalle de <i>Physcia mediterranea</i> (x400) .....	39
Figure 25: Structures histologiques du thalle de <i>Parmotrema reticulatum</i> (x40) P : pyrénolide ; n : noyau ; chl : chloroplaste (x100). .....	39
Figure 26: Photobionte de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> et <i>Physcia mediterranea</i> (de gauche à droite) : <i>Treptophlia</i> et <i>Trebouxia</i> (algues vertes).....	40
Figure 27: Détail d'une soralie de <i>Parmotrema hypoleucinum</i> (x 400) (g : gonidie, hy : hyphe) .....	40
Figure 28: Structures histologiques de l'apothécie de <i>Physcia mediterranea</i> . (x 400) .....	41
Figure 29: Thalle de <i>Physcia mediterranea</i> K <sup>+</sup> (jaune).....	42
Figure 30: Extractions séquentielles effectuées sur <i>Parmotrema hypoleucinum</i> , <i>Physcia mediterranea</i> , <i>Parmotrema reticulatum</i> . (Marc= macéra). .....	45

Figure 31: Rendements massiques obtenus pour l'extraction successive par l'hexane, chloroforme et l'éthanol.....	47
Figure 32: Profil chromatographique de l'extrait d'Hexane soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 1-Hexane de Parmotrema hypoleucinum (Par hyp 1).....	49
Figure 33: Profil chromatographique de l'extrait d' Hexane soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 2-Hexane de Parmotrema hypoleucinum (Par hyp 2).....	50
Figure 34: Profil chromatographique de l'extrait d'Hexane insoluble dans le MeOH estérifié au diazométhane, 1-Cire de Parmotrema hypoleucinum (Par hyp 1).....	52
Figure 35: Profil chromatographique de l'extrait d'Hexane insoluble dans le MeOH estérifié au diazométhane, 2-Cire de Parmotrema hypoleucinum (Par hyp 2).....	52
Figure 36: Structure chimique de quelques composés en commun dans P. hypoleucinum (1 et 2) [(a) acide oleique,(b) acide palmitique,(c) acide stearique,(d) acide methyl 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoate,(e) acide atrarique et (f) 13-methyl-17-norkaur-15-ene].....	54
Figure 37: Chromatogramme de l'extrait d' Hexane soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 1 – Hexane de Parmotrema hypoleucinum.....	55
Figure 38: Chromatogramme de l'extrait d' Hexane soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 2 – Hexane de Parmotrema hypoleucinum.....	55
Figure 39: Structure de l'atranorin et activités biologiques.....	58
Figure 40: Chromatogramme de l'extrait d' Hexane insoluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane , 1 – Cire de Parmotrema hypoleucinum.....	62
Figure 41: Chromatogramme de l'extrait d' Hexane insoluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 2 – Cire de Parmotrema hypoleucinum.....	62
Figure 42: Chromatogramme de l'extrait de 1-chloroforme de P. hypoleucinum.....	65
Figure 43: Chromatogramme de l'extrait de 2-chloroforme de P. hypoleucinum.....	66
Figure 44: Chromatogramme de l'extrait de 1-éthanol de P. hypoleucinum.....	69
Figure 45: Chromatogramme de l'extrait de 2-éthanol de P. hypoleucinum.....	70
Figure 46: Chromatogramme GC-MS de Physcia mediterranea (partie 3-Hexane). RT = temps de rétention.....	74
Figure 47: Structure chimique de (a) (-) -ent-Kauran-16a-ol et (b) de l'acide atrarique.....	75
Figure 48: Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 3-Hexane.....	87
Figure 49: Structure chimique des composés 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12, 14 et 38 identifiés dans le 3-Hexane de Physcia mediterranea Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS.....	90
Figure 50: Structure chimique des composés 7, 11, 13, 20, 23, 31, 32, 37 et 39 identifiés dans 3-Hexane de Physcia mediterranea par UHPLC/ESI/MS/MS.....	91
Figure 51: Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 3-Cire de physcia mediterranea.....	92
Figure 52: Chromatogramme de l'extrait chloroformique de Physcia mediterranea Nimis.....	95
Figure 53: Chromatogramme de l'extrait éthanolique de Physcia mediterranea Nimis.....	98
Figure 54: Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Hexane de Parmotrema reticulatum.....	101
Figure 55: Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie insoluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Cire de Parmotrema reticulatum.....	102

Figure 56: Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Hexane de <i>Parmotrema reticulatum</i> . .....	103
Figure 57: Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie insoluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Cire de <i>Parmotrema reticulatum</i> . .....	107
Figure 58: Chromatogramme de l'extrait chloroformique de <i>Parmotrema reticulatum</i> .....	109
Figure 59: Chromatogramme de l'extrait éthanolique de <i>Parmotrema reticulatum</i> .....	112
Figure 60: Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique de Par hyp 1 dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0,0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM. ....	115
Figure 61: Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique de Par hyp 2 dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0,0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM. ....	115
Figure 62: Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait chloroformique de Par hyp 1 dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0,0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM. ....	116
Figure 63: Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait chloroformique de Par hyp 2 dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0,0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM. ....	117
Figure 64: Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique de <i>Physcia mediterranea</i> dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0,0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM. ....	119
Figure 65: Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait chloroformique de <i>Physcia mediterranea</i> dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0.0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM. ....	120
Figure 66: Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique de <i>Prmotrema reticulatum</i> dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0.0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM. ....	121
Figure 67: Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait chloroformique de <i>Prmotrema reticulatum</i> dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0.0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM. ....	122
Figure 68: Réaction entre le radical libre DPPH et le composé antioxydant (RH), qui se traduit par la formation de diphényl-picrilhydrazine. (Amorati et Foti, 2013). ....	132
Figure 69: Activité antioxydante des extraits lichéniques. ....	132

## INTRODUCTION

Notre projet de thèse s'insère dans la thématique de notre équipe de recherche « Pathologie des Ecosystèmes », consacrée à la valorisation de la flore lichénique algérienne précisément celle du Nord-est, à travers sa composante chimique et ses applications dans le domaine médicinales.

Pour en comprendre le lien, il faut s'intéresser d'un peu plus près aux lichens. Les lichens sont des organismes symbiotiques constitués de l'association entre une algue verte et/ou une cyanobactérie (photosymbiote), un champignon (mycosymbiote) et des bactéries associées (Cardinale et al., 2006).

Les lichens forment une part importante de la biodiversité des milieux naturels, par le grand nombre de formes qu'ils présentent et la variété des conditions écologiques qu'ils recherchent. Ils restent cependant encore mal connus du grand public, et même des naturalistes où la connaissance des espèces reste très imparfaite et sujette à de nombreuses découvertes, notamment dans les forêts méditerranéennes qui constituent un milieu naturel fragile (Roux et al., 2006).

Le nombre de métabolites lichéniques isolés dépasse les 800 dans l'ouvrage de référence réalisé par Huneck en 1996 (Huneck and Yoshimura, 1996) et actuellement le nombre de substances lichéniques identifiées dépasserait les 1050 (Stocker-Wörgötter, 2008), 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.

Le caractère unique de nombreuses substances de lichen a attiré l'attention des premiers chimistes au milieu du 19<sup>e</sup> siècle. Avant cela, ils étaient utilisés comme colorants pour les textiles et comme additifs pour la fabrication de savons et de parfums, et un nombre considérable pour la guérison des maladies (Kaushik et al., 2020 ; Upreti et al., 2015).

Récemment, les lichens ont attiré plusieurs chercheurs du monde entier pour revoir leur valeur thérapeutique et cosmétique en médecine traditionnelle. Un large éventail d'espèces ont révélé des activités biologiques efficaces telles que les antioxydants, les protecteurs cardiovasculaires, les antimicrobiens, anti-inflammatoire, analgésique, antipyrétique, antiviral, anti-insecticide, antibiotique, antifongique, antidiabétique et anticancéreux (Solárová et al., 2020 ; Crawford, 2015).

Le potentiel pharmacologique des lichens est dû à la présence de métabolites secondaires uniques qui sont ensuite devenus excessivement attractifs pour les industries pharmaceutiques et cosmétiques. En conséquence, une multitude de procédés optimisés pour l'extraction quantitative de ces métabolites de lichen a été développé (Komaty et al., 2015)

En Algérie, plusieurs enquêtes ont été menées pour explorer leur diversité (Ali Ahmed et al., 2018). On compte récemment plus de 1085 espèces de lichens identifiées, dont 64 sont endémiques. Regroupées en 187 genres et 73 familles, (Amrani et al., 2018) ce chiffre va

surement évoluer avec les espèces nouvellement identifiées grâce aux travaux effectués au sein de notre équipe de recherche ( Boudiaf et al ; 2022 sou press).

Par sa localisation dans le bassin méditerranéen l'Algérie est caractérisée par une biodiversité lichénique remarquable et particulièrement le parc national d'El Kala (PNEK), qui bénéficie de conditions environnementales particulièrement favorables au développement des lichens et de la présence de certains phorophytes comme *Quercus* et *Olea* présentant une grande affinité pour les lichens.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressées à l'étude phytochimique et pharmacologique des trois lichens algériens, récoltée du Parc National d'el Kala (Nord-est algérien) : *Parmotrema hypoleucinum* (Steiner) Hale, *Physcia mediterranea* Nimis et *Parmotrema reticulatum* (Taylor) M. Choisy.

La confirmation de l'identification des espèces ciblées (*P. hypoleucinum*, *P. mediterranea* et *P. reticulatum*) est effectuée au sein du Laboratoire de de Biologie Végétale et Environnement à travers une étude botanique, macroscopique et histologique ainsi qu'une étude chimique préliminaire.

Par la suite une investigation phytochimique utilisant des méthodes analytiques modernes a été réalisé au niveau du laboratoire de Chimie au Portugal, ainsi qu'une évaluation in vitro de l'activité anti-oxydante des extraits chloroformiques et éthanoliques de ces trois espèces par la méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl).

Le choix de ces trois espèces est basé sur les critères suivants :

- La première espèce *Parmotrema hypoleucinum* (Steiner) Hale, provient de deux substrats différents (*Olea europaea* Et *Quercus coccifera*) afin de savoir que le substrat joue un rôle dans la composition chimique de l'espèce.
- La seconde espèce *Physcia mediterranea* Nimis, espèce méditerranéenne rare appartenant à la famille des Physciaceae, nouveau taxon identifié en Algérie par Pr Ali Ahmed. M, authentifié par Mr Jean Michel Sussey, lichenologue à L'AFL en France, cette espèce n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique ou pharmacologique.
- La troisième espèce *Parmotrema reticulatum* (Taylor) M. Choisy est choisie par le nombre restreint des travaux réalisés selon la littérature.

Les objectifs de cette étude pluridisciplinaires consistent en premier à isoler et identifier de nouveaux produits naturels bioactifs issus des lichens d'Algérie, en second arriver à travers l'identification des métabolites rajouter une valeur scientifique à la taxonomie de ces 3 espèces lichéniques.

Les travaux de cette thèse sont décrits le long de ces différentes parties :

- **La première partie** est consacrée à l'étude bibliographique des trois espèces, aborde en premier un aperçu général sur les lichens, par la suite, une mise au point bibliographique sur les métabolites secondaires isolés. Les familles moléculaires identifiées, leurs voies de biosynthèse, ainsi que leurs activités biologiques.
- **La deuxième partie**, consacrée à la présentation de la région d'étude, aux choix des espèces, à l'identification botanique des espèces lichéniques ciblées, à leur identification chimique préliminaires par réactions thallines ainsi que leurs études histologiques très approfondies.
- **La troisième partie**, mettant en avant l'étude phytochimique des 3 espèces étudiées en présentant les résultats des analyses par GC/MS puis par UHPLC-ESI-MS/MS des différents extraits obtenus à partir des solvants d'extractions utilisés (Hexane, Ethanol et Chloroforme) ainsi que des extraits des produits insolubles dans le Méthanol que nous avons nommés -Cire-, le tout menant à l'identification de métabolites appartenant à différentes classes phytochimiques.  
Le dernier chapitre de cette partie présente les résultats de l'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits Ethanoliques et Chloroformiques des 3 espèces lichéniques étudiées.
- **La quatrième partie est expérimentale** décrit les différentes méthodes analytiques et appareillages utilisés.

Notre travail s'achève par une conclusion générale sur l'ensemble de cette étude et des perspectives.

**PARTIE I Présentation sommaire des lichens et leurs  
métabolites**

## **Chapitre I : Généralités sur les lichens**

### **1. Historique de la Lichenologie en Algérie**

L'historique de la lichenologie en Algérie a été bien détaillé dans l'article de Amrani et al, 2015, seulement, nous avons voulu donner un petit aperçu sur les travaux réalisés plus précisément ces dernières années au niveau de la région d'Annaba.

La reprise de la lichenologie dans notre région a été réalisée grâce aux travaux de l'équipe de notre défunt Professeur Semadi Amar de l'Université Badji-Mokhtar qui a travaillé sa thèse de doctorat (1989) au « Laboratoire de Lichenologie Appliquée », Université de Paris VI) aux côtés des chercheurs et lichenologues Van Haluwyn et Juliette Asta ainsi que Serge Deruelle, principalement sur la biodiversion lichénique, il avait également créé le laboratoire de Biologie Végétale en 2000, son encadrement de magister et surtout de doctorants dans le même axe de recherche dans le Centre et Est du pays a permis à cette Science qui est la Lichenologie de s'infiltrer et évoluer dans notre pays vers d'autres volets tels que : Dosage d'enzymes antioxydants dans les lichens, étude d'espèces bioindicatrices de continuité forestière, étude chimique des métabolites lichéniques ainsi que leur activités biologiques, étude taxonomique sur des genres bien précis, ces 2 derniers volets font en ce moment sujet de projets de recherche de l'équipe de recherche Pathologie des Ecosystèmes dirigée par Pr Ali Ahmed Monia, au sein du Laboratoire de Biologie Végétale et Environnement, dont nous citons quelques travaux (Ali Ahmed, 2007; Serradj et al., 2013; Slimani et al., 2013; Boumedriss, 2014 ; Serradj et al., 2014; Maizi et al., 2017 ; Ali Ahmed et al., 2018; Triebel et al., 2018; Brakni et al., 2018 ; Brakni et Ali Ahmed, 2018 ; Slimani et al., 2021 ; Kerboua et al., 2021; Kerboua et al., 2022 ; Boudiaf et al., 2022(sous press)).

## 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 appelée photobionte (du grec photo : lumière ; bios : vie).

Outre ces deux partenaires symbiotiques (photobionte et mycobionte) classiquement décrits, un troisième partenaire peut y être également intégré : les champignons épi et/ou endophytiques ainsi que le bactériobionte ou communautés bactériennes associées (Nash, 2008).

De cette association symbiotique en résulte la formation d'un corps lichénique ou thalle distinct, ne ressemblant à aucun des deux partenaires vivant à l'état libre (**Purvis, 2000**).

Selon (**Rousteau, 2006**), dans le monde entier, il y a environ 30.000 espèces lichéniques, la classification naturelle de ses espèces présente une grande difficulté du fait de leurs double nature. Les lichens sont nommés à partir du nom du partenaire symbiotique qui assure la reproduction sexuée à savoir le champignon. Dans 99% des cas, le mycobionte appartient aux Ascomycètes (**Boustie et Grube, 2005 ; Honegger, 2012**). Pour les 1% restant, les mycobiontes sont des Basidiomycètes. Les lichens sont respectivement qualifiés d'ascolichens et de basidiolichens.

Actuellement on considère les lichens de plus en plus comme des Champignons lichénisés, adaptés à la vie symbiotique. Le constituant fongique prédomine, en effet, dans la morphologie et la reproduction du lichen. La lichénisation est apparue, probablement d'une manière indépendante, dans des groupes très différents d'Ascomycètes, et dans quelques Basidiomycètes ; les lichens sont un ensemble polyphylétique que certains botanistes intègrent à leur place dans l'étude systématique des Champignons (**Ozenda, 2000**).

## 3. Morphologie du thalle









Le mycobionte, qui représente plus de 90% de la biomasse lichénique, est la plupart du temps responsable de la morphologie et de la structuration du lichen.

Une observation à l'œil nu ou à la loupe des thalles permet de distinguer généralement 7 types de thalles (**Van Haluwyn et al., 2012**) (**tableau 1**) :

- **les thalles crustacés** sont les plus communs et sont encroûtés au niveau de leur substrat, dans lequel ils pénètrent plus ou moins profondément pour en être difficilement dissociables.
- **les thalles foliacés** ont la forme de feuilles plus ou moins lobées ou découpées et se détachent facilement du substrat.

- les thalles fruticuleux ont un port buissonnant et vont présenter des lanières plus ou moins ramifiées, dressées ou pendantes. Ils s’ancrent à leur substrat par une surface réduite.
- les thalles squamuleux forment de petites écailles qui vont se chevaucher plus ou moins partiellement.
- les thalles lépreux sont pulvérulents et se détachent aisément de leur substrat.
- les thalles gélatineux, très essentiellement des cyanolichens, sont noirs et cassants à l’état sec et ont une consistance gélatineuse lorsqu’ils sont hydratés. La morphologie du thalle peut être crustacée, foliacée, fruticuleuse ou squamuleuse.
- les thalles complexes ou composites comportent un thalle primaire foliacé adhérent au substrat à partir duquel se dresse un thalle secondaire plus ou moins ramifié ou en trompette (le podétion).

Tableau 1 :Représentation des différents types de thalles lichéniques (Gavériaux, 2009)

Thalle fruticuleux	Thalle foliacé		Thalle crustacés
 <p><i>Ramalina farinacea</i> (L.) Ach.</p>	 <p><i>Parmelia sulcata</i> Taylor.</p>	 <p><i>Lobaria pulmonaria</i> (L.) Hoffm.</p>	 <p><i>Caloplaca flavescens</i> (Huds.) J.R. Laundon.</p>
Thalle squamuleux	Thalle lépreux	Thalle gélatineux	Thalle complexe
 <p><i>Squamarina cartilaginea</i> (With.) P. James</p>	 <p><i>Lepraria alpina</i> (B.de Lesd.) Tretiach &amp; Baruffo</p>	 <p><i>Collema auriforme</i> (With.) Coppins &amp; J. R. Laundon</p>	 <p><i>Cladonia macilenta</i> Hoffm</p>

#### 4. Structure anatomique

Il existe essentiellement deux grands types de structures anatomiques des thalles : homéomère et hétéromère (**figure1**). La distinction est fondée sur la répartition des cellules algales à l'intérieur du thalle (**Aprile et al., 2011**).

##### 4.1. Structure homéomère

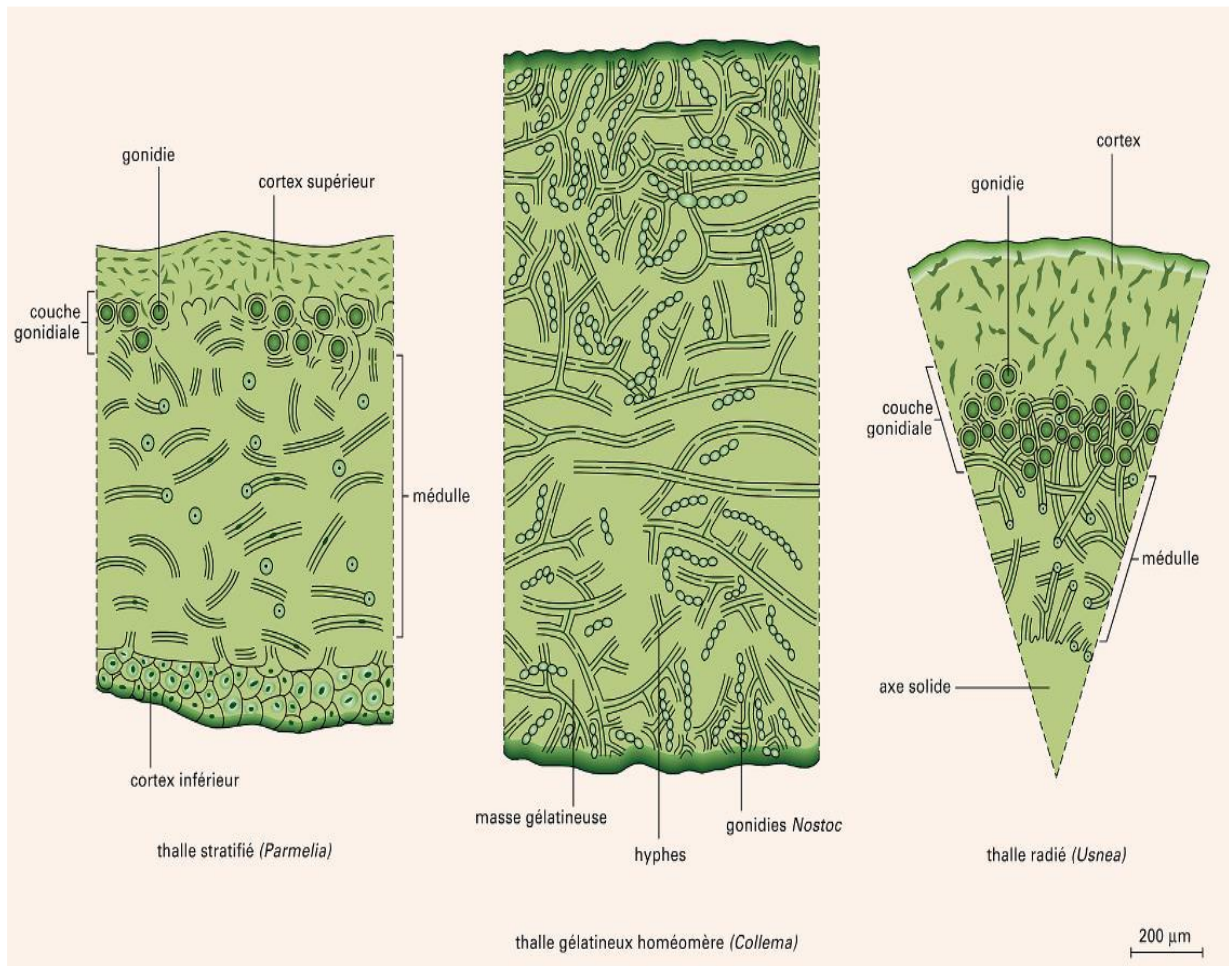
Les cellules algales sont réparties de façon homogène parmi les hyphes. On retrouve cette structure chez les lichens crustacés *Caloplaca*, les lichens gélatineux.

##### 4.2. Structure hétéromère

Sur une coupe transversale de thalle, on observe une disposition par couches bien visibles sur une section transversale (cortex, couche algale, médulle).

- La couche algale : est constituée par des hyphes lâches et contenant des cellules algales (**Ozenda and Clauzade, 1970 ; Asta et al., 2016**). Idéalement située pour recevoir beaucoup de lumière, cette couche importante occupe moins de 10% du volume du thalle (**Gilbert, 2000**).
- La médulle (moelle) : est formée par des hyphes ordinaires encore moins serrées. Ceci agit comme un réservoir d'eau et une zone de stockage pour les hydrates de carbone produits par les algues (**Gilbert, 2000**).
- Le cortex inférieur : comprend des filaments serrés les uns contre les autres (**Souchon, 1971**). Une variété d'organes de fixation peut être développée à partir du cortex inférieur et rarement du cortex supérieur (**Büdel and scheidegger, 2008**).

Dans ce type de structure, il existe deux sous types : la Structure radiée qui se trouve chez les thalles fruticuleux. On y retrouve les mêmes couches, mais disposées de façon concentrique, le cortex inférieur faisant défaut, la structure stratifiée pour la plupart des lichens foliacés, de beaucoup de lichens crustacés et de quelques lichens fruticuleux. En coupe transversale, on observe : un cortex supérieur, une couche algale, une médulle et un cortex inférieur constitué seulement d'hyphes, très denses, pouvant donner naissance à des rhizines.



**Figure 1:** Principales structures histologique rencontrées chez les lichens

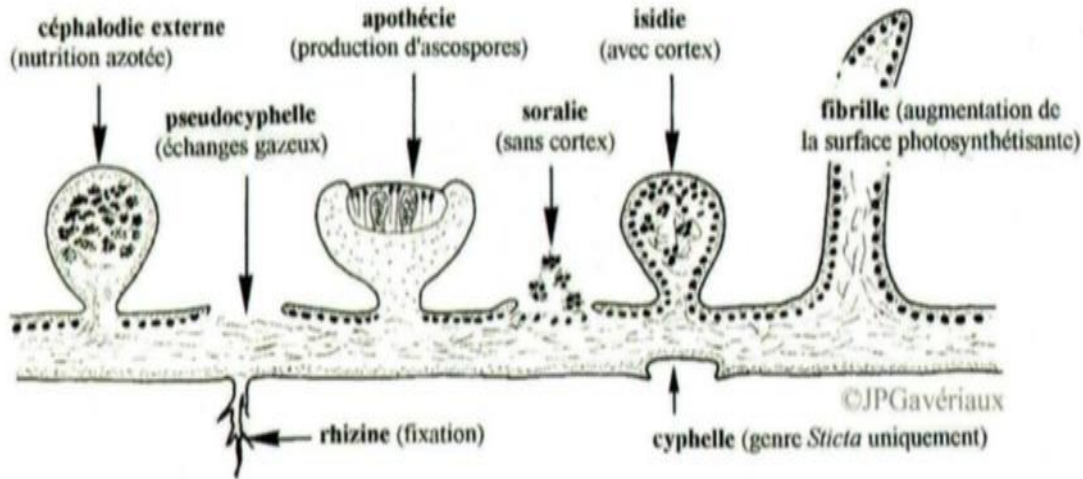
## 5. Organes portés par le thalle

### 5.1 Organes non reproducteurs

Le thalle peut également porter un certain nombre d'organes divers. D'un côté, on peut être en présence d'organes de nature fongique, protégeant contre les radiations, limitant l'évapotranspiration mais n'ayant aucune fonction assimilatrice : poils et cils. D'un autre côté, on retrouve des organes comme des fibrilles augmentant la surface photosynthétisante, spinules, haptères, rhizines facilitant l'adhésion au substrat, papilles, tubercules, céphalodies, cyphelles, nodules, veines et pseudocyphelles ayant un rôle important dans les échanges gazeux avec l'atmosphère (**Figure 2**) (Nash, 2008); (Biéro et al., 2008).

### 5.2. Organes reproducteurs

Des structures plus organisées peuvent également se former. Elles contiennent toujours l'algue et le champignon. C'est le cas des schizidies, des phyllidies, des soralies, des isidies assurant la reproduction végétative et des apothécies (deux sous morphologies : lecanorine (présence de cellules algales) et lécideine (absence de cellules algales) assurant la reproduction sexuée (**figure 2**) (Nash, 2008), (Biéro et al., 2008).



**Figure 2:** Représentations schématiques de certains organes reproducteurs et non reproducteurs (Biéro et al., 2008).

## 6. Reproduction et cycle de développement

Les lichens se reproduisent habituellement de deux manières bien déterminées : soit par la multiplication végétative, soit par la reproduction sexuée.

### 6.1. Multiplication végétative

Les lichens sont des organismes reviviscents. Capables de subsister longtemps à l'état sec, ils deviennent cassants ; leurs fragments dispersés par le vent ou les animaux peuvent engendrer de nouveaux individus.

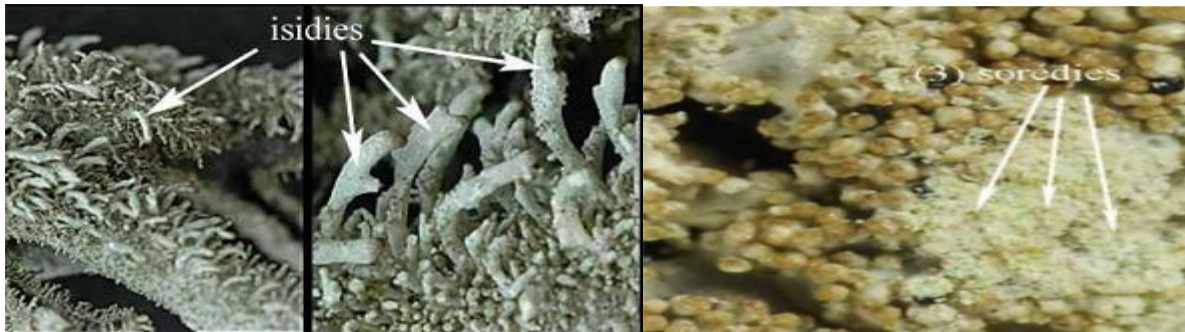
Des structures plus organisées peuvent également se former : les soralies et les isidies (**Figure 3**), elles contiennent toujours le mycosymbiote et le photosymbiote.

#### 6.1.1. Les soralies

Les soralies forment de petites masses farineuses ou granuleuses, elles-mêmes constituées de petits amas comprenant quelques cellules algales entourées d'hyphes. Ces petits amas sont souvent facilement individualisés sous la loupe. Le terme de soralie désigne l'ensemble de la structure, tandis que celui de sorédie correspond aux petits amas qui sont autant de diaspores : exemple : *Imshaugia aleurites* (Ozenda, 2000 ; Serusiaux et al., 2004).

#### 6.1.2. Les isidies

Sont des petites excroissances (bourgeons) formées d'algues et d'hyphes protégées par le cortex. Elles varient en fonction de l'espèce, de bulbaire à cylindrique ou ramifiée, parfois coralloïde. Exemple : *Pseudovernia furfuracea*.



**Figure 3:** Isidies de *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf (à gauche) et sorédies d'*Imshaugia aleurites* (à droite)

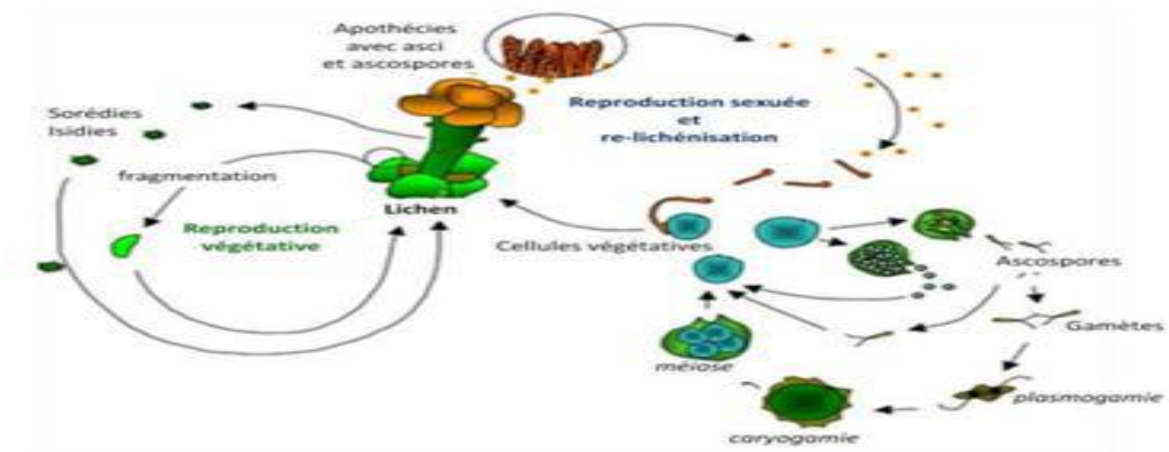
(Source : [http://www2.aclille.fr/myconord/photos\\_afl/Photos\\_AFL\\_C.htm](http://www2.aclille.fr/myconord/photos_afl/Photos_AFL_C.htm))

## 6.2. Reproduction Sexuée

Lors de la reproduction sexuée, deux hyphes fongiques sexuellement différenciées fusionnent et donnent, à la surface du thalle, des structures en forme de boutons : les apothécies, ou de coupes plus ou moins fermées : les périthèces, dans lesquelles des cellules particulières (les asques) vont élaborer les ascospores. Entre les asques se trouvent des cellules stériles : les paraphyses, dont les extrémités renflées peuvent contenir des pigments responsables de la couleur de l'hyménium.

Après leur libération, ces spores issues d'une reproduction sexuée, germent et donnent des hyphes qui capturent des algues pour pouvoir redonner un nouveau thalle lichénique

(figure 4) (Ozenda et Clauzade, 1970).



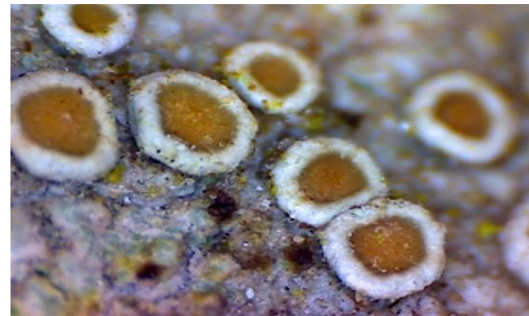
**Figure 4:** Cycle théorique de reproduction des lichens : phase végétative et sexuée (<http://home.cc.umanitoba.ca/~pierceyn/lifecycle.html>)

### 6.2.1 Les apothécies

Les apothécies sont généralement en forme de disque ou de coupe plus ou moins étalés.

Quand elles possèdent un bord de la même couleur que le thalle (bord thallin) on les appelle des apothécies lécanorines car elles sont caractéristiques du genre *Lecanora*, avec un bord de la même couleur que le disque (rebord propre) (**figure 5**).

Les apothécies lécidéines, caractéristiques du genre *Lecidea* ont un rebord de couleur différentes que celle du thalle (**figure 6**). On notera enfin que les apothécies peuvent, par rapport au thalle qui les porte, adopter différentes postures, y compris et à titre d'exemples singuliers celles d'être « en creux » à la face supérieure du thalle (*Solorina*) ou de se former à la face inférieure de l'extrémité des lobes, lesquels se redressent ensuite légèrement (*Nephroma*).



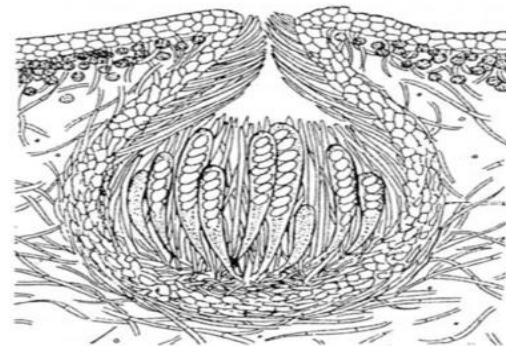
**Figure 5:** Photo d'une apothécie lécanorine

Photo d'une apothécie lécidéine

Source : [http://www.afl-lichenologie.fr/Photos\\_AFL/Photos\\_AFL\\_Liste.htm](http://www.afl-lichenologie.fr/Photos_AFL/Photos_AFL_Liste.htm)

### 6.2.2. Les périthèces

Ils ressemblent à de petits boutons sphériques, généralement noirs dont le diamètre varie entre un à deux millimètres environ. Ils s'ouvrent par un pore (ou ostiole) dans sa partie supérieure et ainsi permet l'expulsion des spores (**figure 7**). A maturité, les asques s'ouvrent et laissent échapper les spores. Les spores germent en émettant des filaments mycéliens. Ces filaments meurent s'ils ne rencontrent pas de cellules d'algue analogues à celles qui entrent dans la constitution du lichen. Si la rencontre a lieu, une nouvelle symbiose s'établit et un jeune lichen se reconstitue.



(a) Photo (AFL)

(b) Dessin (Poelt, 1969)

**Figure 6:** Photo et dessin d'un périthèce

## 7. Echanges nutritionnels entre les partenaires

Au sein de la symbiose, les différents partenaires qui la constituent contribuent chacun à leur manière au développement et à la croissance du lichen. La protection offerte par le mycobionte permet au photobionte de maintenir une photosynthèse active dans des conditions sévères de stress abiotique et donc de maintenir en vie l'organisme tout entier. Lorsque les conditions ne permettent plus au lichen de maintenir son métabolisme (teneur en eau inférieure à 30%), celui-ci passe dans un état de vie ralentie. Une simple ré-humidification suffit alors à réactiver rapidement le métabolisme, c'est le phénomène de reviviscence (Raven et al., 2000 ; Van Haluwyn et al., 2009).

Le mycobionte a un rôle dans la fixation du lichen (grâce notamment aux rhizines) et joue un rôle dans la protection de l'ensemble. Il fournit au photobionte l'eau et les sels minéraux (puisés dans l'environnement extérieur tel que le substrat) ainsi que des vitamines comme par exemple la vitamine C. Dans certains cas il peut aussi vivre en saprophyte en extrayant du milieu des substances organiques, ou en parasite sur un autre lichen.

Le photobionte quant à lui réalise la photosynthèse (organisme autotrophe pour le carbone) et apporte au mycobionte des vitamines (notamment la vitamine B). Dans le cas d'une algue verte, le carbone est fourni au mycobionte sous forme de polyols, dérivés des sucres tandis que pour les cyanobactéries, le carbone est cédé au champignon plutôt sous forme de glucose. Les cyanobactéries sont capables de fixer l'azote atmosphérique, fourni au champignon sous forme d'ammonium. Les polyols et le glucose sont ensuite transformés par le champignon en polysaccharides et en métabolites secondaires, appelés substances lichéniques (figures 8) (Van Haluwyn et al., 2009). L'association symbiotique permet donc la production de composés originaux et spécifiques qui ne pourraient pas être synthétisés par chaque individu seul.

Différents échanges existent entre les différents partenaires symbiotiques (photobionte et mycobionte) et peuvent être résumés comme ci-dessous :

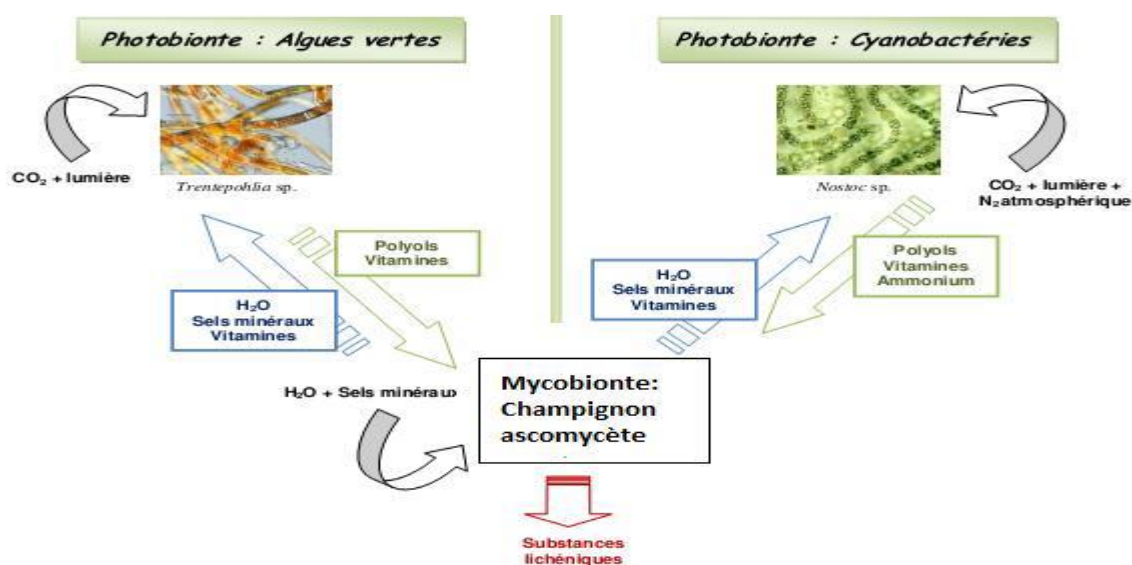


Figure 7: Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens (Parrot, 2014).

## 8. Ecologie et Répartition

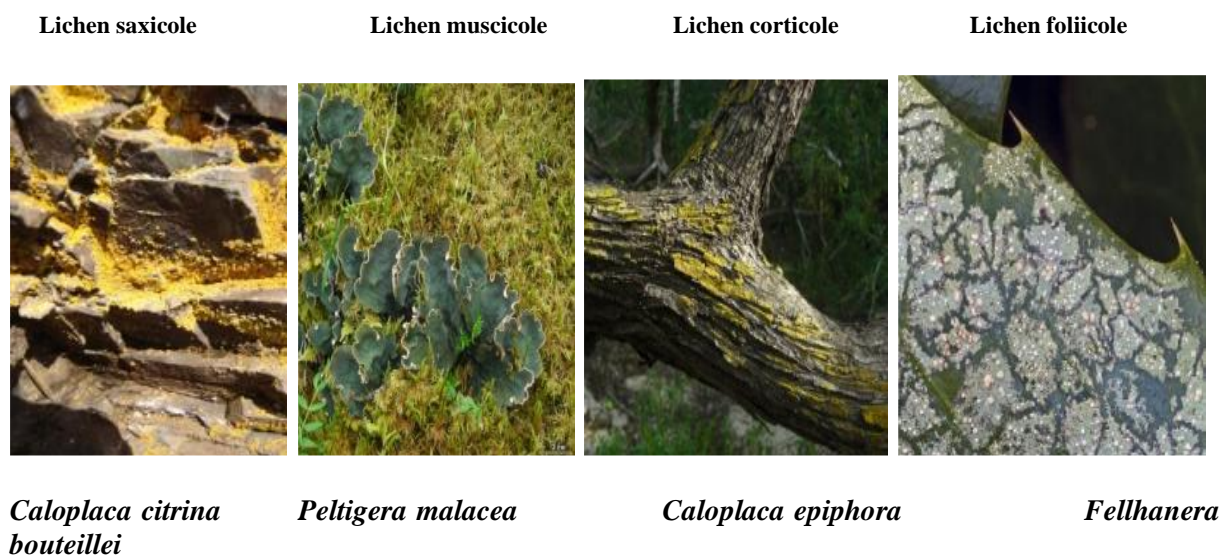
Les lichens colonisent presque toute la surface de la Terre. Ils sont retrouvés dans la plupart des écosystèmes terrestres et aquatiques (ex. *Bacidina inundata*), souvent dans des environnements extrêmes inaccessibles pour la plupart des autres formes de vie (régions polaires, arides et tropicales) (Seaward, 2008). En effet, les lichens peuvent entrer en vie ralentie, notamment à l'état sec, puis reprendre une vie végétative active lorsque les conditions redeviennent favorables. C'est le phénomène de reviviscence.

Les lichens sont aussi des pionniers des roches nues, des sols débarrassés de végétation, des bois morts, d'écorces vivantes, les ossements d'animaux, du ciment et même sur le verre vieilli et les vitraux médiévaux des anciennes cathédrales (Rankovic, 2015).

La capacité des lichens à grandir même dans des conditions climatiques extrêmes tient à leur biologie particulière. En tant qu'organismes poikilohydrés, c'est-à-dire capables de supporter une humidité variable qui dépend des conditions du milieu, ils résistent aux périodes de sécheresse et aux températures très élevées car ils survivent en étant déshydratés grâce à une inhibition des processus métaboliques. Lorsqu'il pleut, le thalle des lichens absorbe rapidement des quantités largement supérieures à sa masse anhydre et le métabolisme est réactivé (Le gac et al., 2006).

La croissance des lichens est très lente, de l'ordre de 0.1 à 10 mm par an, exceptionnellement quelques centimètres. Elle est plus lente en hiver qu'en été, plus rapide sur substrats riches. L'âge des grands lichens est de l'ordre de plusieurs dizaines d'années pour les lichens foliacés et de plusieurs siècles pour les lichens crustacés de grande taille (Goujon, 2004).

Les lichens sont capables de coloniser une large gamme de substrats, non seulement des surfaces naturelles (Figure 9) comme les roches (saxicoles), le sol (terricoles), l'écorce (corticoles), le bois mort (lignicoles), les feuilles (foliicoles), les mousses (muscielles), mais aussi des matériaux artificiels tels que le plastique, le caoutchouc, les métaux ou le verre (Brodo, 1973).



**Figure 8:** Quelques exemples de lichens sur différents types de substrats  
[http://www.waysofenlichenment.net/lichens/alphabetical\\_index.html](http://www.waysofenlichenment.net/lichens/alphabetical_index.html)

Du fait de leur capacité à coloniser des écosystèmes variés : marins, terrestres (arides à tempérés) et même arctiques, les lichens ont mis en place des mécanismes d'adaptation (production d'osmoprotectants par exemple) afin de faire face à différentes contraintes environnementales : stress salins, sécheresse, stress hydriques ... (Longton, 1988)

## 9. Usages et Intérêts des lichens

Les lichens ont été utilisés dès l'antiquité comme plantes médicinales et pour une foule d'usages alimentaires ou artisanaux. Ils ont été employés comme nourriture pour l'homme ou le bétail, mais seulement dans les régions très pauvres ou bien en période de guerre ; et comme source d'antibiotiques ou comme indicateurs des conditions de milieu naturel (Ozenda, 2000).

### 9.1. Usages alimentaires

Les lichens tiennent une place importante surtout dans l'alimentation du Renne et du Caribou des régions arctiques. Il s'agit des genres *Cladonia* et *Cetraria*. Ces mêmes lichens ont été exploités dans ces régions pour nourrir les porcs, les chevaux et les vaches (Asta, 1973).

Dans l'alimentation humaine, les lichens ont joué un rôle moins important. Il faut citer *Cetraria islandica* utilisé dans les pays nordiques sous forme de farine mélangée à la farine panifiable. Cependant la valeur énergétique de ce produit est la moitié de celle du blé (Barthe, 1985).

Divers espèces d'*Umbilicaria* ont été consommées par les indiens des côtes pacifiques sous le nom de "tripes de roches" et l'une d'elle est encore utilisée au Japon (Barthe, 1985).

*Lecanora esculenta* a été consommé dans le désert asiatique et il a même été avancé qu'il pourrait s'agir de la "manne des Hébreux" (Tanaka, 1976). En fait, ces espèces ne constituent qu'un aliment de secours et leur consommation normale est limitée par leur caractère assez indigeste (Paris et Moyse, 1976).

### 9.2. Usages Médicaux

Les lichens sont utilisés depuis des siècles en médecine traditionnelle, soit dans leur entièreté, soit sous forme d'extraits. Les indiens d'Amérique, les égyptiens, les indiens et les chinois employaient les lichens pour traiter les maux, et en premier lieu comme expectorants (Elix, 1996).

Le lichen *Peltigera canina*, un lichen foliacé à cyanobactérie et riche en méthionine, était utilisé en Inde comme remède contre les maux hépatiques. Dans différentes pharmacopées, de nombreuses espèces de lichens possédant une activité thérapeutique sont recensées telles que *Cetraria islandica*, *Cladonia coccifera*, *Usne applicata*, *Peltigera canina*, *Lobaria pulmonaria*, *Xanthoria parietina* et *Evernia prunastri* (Saklani et al., 1992). En Espagne, certaines espèces de lichens étaient utilisées comme diurétiques (*Ramalina bourgeana*), analgésiques (*Xanthoria parietina*), pour traiter les douleurs menstruelles, les problèmes rénaux, ou encore respiratoires (*Pseudevernia furfuracea*) (González-Tejero et al., 1995). En Inde, des mélanges d'au moins deux espèces de *Parmelia*, *Usnea longissima*, *Ramalina subcomplanata* sont vendus sous le nom de « Chharila » et sont utilisés comme astringent, laxatif et carminatif (Shukla et al., 2010).

Des études en Islande et en Allemagne ont conduit au développement de capsules et de tablettes à base d'extraits de ce lichen, utilisées en cas d'obstruction intestinale, d'ulcère gastrique, d'arthrite et d'asthme (**Podterob, 2008**).

Après la confirmation du pouvoir des différentes espèces médicinales, les lichens furent étudiés pour la recherche d'antibiotiques ; beaucoup d'espèces ont révélé des propriétés antibactériennes (**Koyama et al., 1989**). Actuellement, les recherches laissent entrevoir un nouvel essor de l'utilisation thérapeutique des lichens avec la mise en évidence de propriétés antitumorales et inhibitrices de la réplication du virus du SIDA. En Bretagne *cetraria islandica* "mousse d'islande" source riche en acide protolichestérinique actif est utilisé contre les tumeurs cancéreuses (**Gilbert, 2000**).

Les décoctions de lichens étaient d'ailleurs utilisées en médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies (**tableau 2**).

**Tableau 2 :** Lichens utilisés en médecine traditionnelle

Lichens	Utilisations	Références
<i>Roccella fuciformis</i> (L.) DC.	Utilisé contre l'eczéma (India).	Biswas 1947
<i>Nephroma arcticum</i> (L.) Torss.	Une infusion d'eau chaude énergisante (Alaska).	Oswalt 1957
<i>Ramalina capitata</i> (Ach.) Nyl.	Boire comme un thé pour soulager les symptômes de l'asthme (Espagne).	Agelet and Vallès 2003
<i>Parmotrema reticulatum</i> (Taylor) M. Choisy	Utilisé pour traiter la toux, les problèmes de gorge et les problèmes respiratoires non spécifiés (Inde).	Singh et al. 2012 ; O'Neill et al. 2017
<i>Parmelia sulcata</i> Taylor	Frotté sur les gencives des bébés au moment des poussés dentaires pour soulager la douleur (Canada).	Marles et al. 2000
<i>Usnea spp.</i>	Utilisé contre le paludisme (Kenya), la typhoïde, contre les maux d'estomac, le mal de dos, la fièvre, la perte de l'appétit Consommé contre la mauvaise haleine (Irak).	Rankovik, 2015; Kiringe, 2008
<i>Cladonia bellidiflora</i> (Ach.) Schaerer	Traitement des maladies oculaires en mélange avec du lait maternel (USA).	(Garibaldi 1999).
<i>Lobaria pulmonaria</i> (L.) Hoffm.	Utilisé comme crème laxative et pour le traitement de troubles respiratoires (Turkey).	(Atalay et al. 2014).

### 9.3. Usages industriels

#### 9.3.1 Teinture

Les lichens des genres *Lecanora*, *Roccella* désignés sous le nom "d'orseilles" fournissent des matières colorantes rouges ou violettes, utilisé pour la teinture artisanale des tissus (Dorvault, 1955) ; (Paris et Moyse, 1976).

#### 9.3.2. Parfumerie

Cette utilisation est toujours en vigueur actuellement et conserve une importance notable : Les espèces sont principalement *Lobaria pulmonaria*, *Pseudevernia furfuracea* et *Evernia prunastri* (Sen-Salerno et Blakeway, 1987).

### 9.4. Bioindicateurs de pollution

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

Les lichens dont le photobionte est une cyanobactérie du genre *Nostoc* ou une algue verte du genre *Trentepohlia* sont connus pour être plus sensibles aux métaux que ceux dont le photobionte est une algue verte du genre *Trebouxia* (Guschina et Hardwood, 2006).

Les lichens les plus résistants sont capables d'accumuler les polluants ; ce sont des bioaccumulateurs. Cette capacité accumulatrice des lichens est utilisée en diagnostic et concerne en particulier le dioxyde de soufre, le fluor, les éléments-traces métalliques, les radioéléments et les polluants organiques (Van Haluwyn, 1999 ; Purvis, 2014).

Il est à noter que les espèces crustacées, aux échanges faibles et à la croissance plus lente que les espèces foliacées et fruticuleuses, sont moins affectées par la pollution atmosphérique et résistent mieux à l'environnement industriel et urbain. Ainsi, lors d'une première observation de la flore lichénique d'un environnement, un premier diagnostic de la qualité de l'air peut être avancé en fonction des types de thalles majoritairement présents sur les troncs d'arbres.

## Chapitre II : Les métabolites lichéniques

Les lichens produisent une large variété de composés organiques divisés en deux groupes principaux : les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

Les métabolites primaires sont communs à plusieurs organismes et par définition, ils sont essentielles à la survie et la reproduction de l'organisme.

Parmi les composés primaires, on retrouve les acides aminés, les acides gras, les sucres, les protéines, les polyols, les caroténoïdes, les vitamines, etc., qui sont bio-synthétisés par l'algue et le partenaire fongique. Ces composés sont dits intracellulaires, étant donné qu'ils se retrouvent dans la paroi cellulaire et dans les protoplastes. Alors que les métabolites secondaires sont dits extracellulaires, comme ils se retrouvent à la surface de l'hyphe du champignon. Les composés secondaires ne sont pas essentiels à la survie de l'organisme, mais ils y jouent des rôles spécifiques. L'étude phytochimique des lichens se concentre particulièrement aux métabolites secondaires puisque, contrairement aux métabolites primaires, ils sont caractéristiques de l'organisme à l'étude.

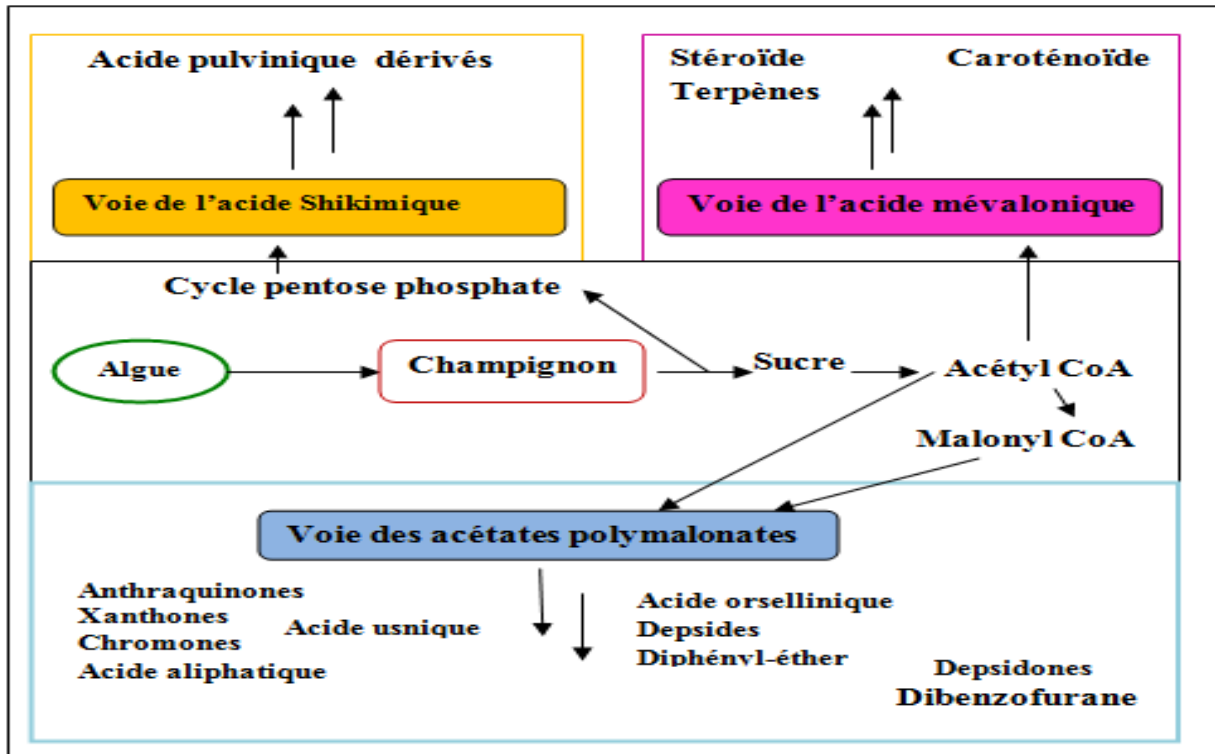
On dénombre actuellement plus de 1050 métabolites qui ont été isolés des lichens. La grande majorité de ces métabolites sont uniquement d'origine fongique, toutefois l'algue peut participer aux étapes finales de la biosynthèse d'un métabolite (**Culberson, 1970**).

L'algue représente environ 3 % de la masse sèche du lichen, c'est pourquoi les métabolites uniquement produits par l'algue ne sont pratiquement jamais isolés étant donné qu'ils sont en très petite quantité dans l'organisme. Parmi les métabolites isolés, il y a environ seulement 5 à 10 % de ces composés qui sont aussi synthétisés par d'autres organismes comme les champignons.

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 (**Culberson et Elix, 1989 ; Elix 1996**).

### 1. Les voies de biogénèse des métabolites secondaires lichéniques

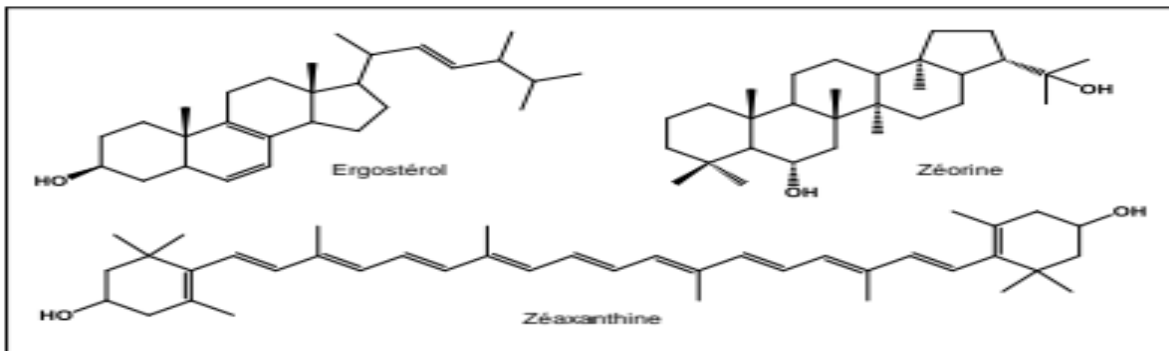
On distingue trois voies de biogénèse proposées dans la littérature : la majorité de ces composés sont dérivées de la voie de l'acétate polymalonate ou polycétide synthase ; les autres métabolites secondaires sont issus des voies de l'acide shikimique et de l'acide mévalonique (**figure 10**) (**Stocker-Wörgötter et al., 2013**).



**Figure 9:** Les différentes voies de biosynthèse des métabolites secondaires lichéniques

### 1.1. Voie de l'acide mévalonique

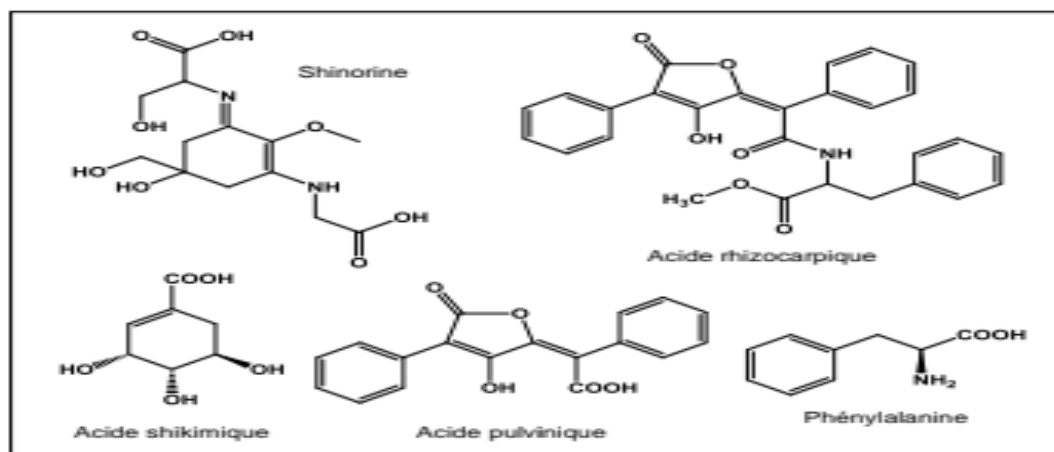
Permet la synthèse de di- et triterpènes, aux stéroïdes et aux caroténoïdes. Tous ces dérivés proviennent de l'assemblage d'unités isopréniques formées à la partir de l'acétylCoA. L'isopentenylpyrophosphate (unité en C5) conduit soit au géranylpyrophosphate (unité en C20), précurseur des diterpènes et des caroténoïdes, soit au squalène (unité en C30), précurseur des stéroïdes et triterpènes. Ces composés ne sont pas spécifiques des lichens et sont très souvent présents. Parmi les métabolites biosynthétisé par la voie de l'acide mévalonique sont présenté dans la figure ci-dessous.



**Figure 10:** Structures de produits dérivés de la voie de l'acide mévalonique

## 1.2. Voie de l'acide shikimique

Celle-ci conduit à la biosynthèse des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane) et de quelques substances azotées, est principalement utilisée pour la synthèse des dérivés de l'acide pulvinique (**figure 12**) ou des mycosporines (**Favre-Bonvin et al., 1987**) chez les lichens.



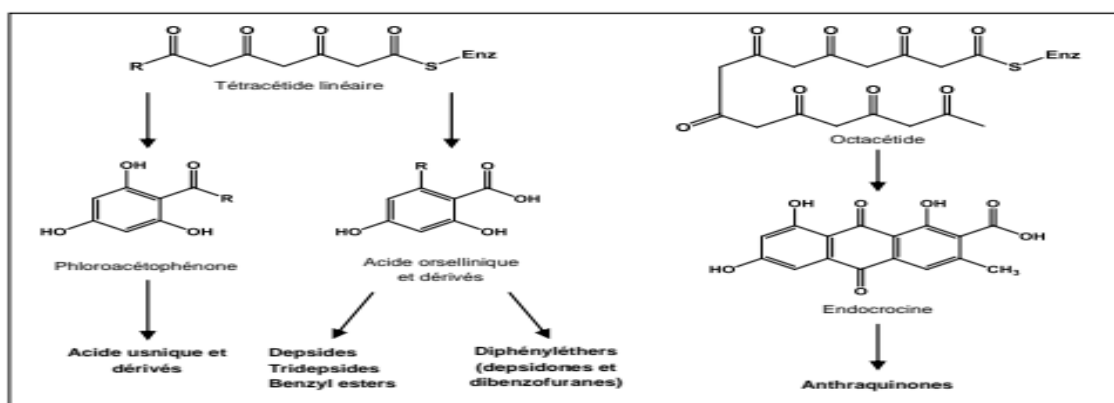
**Figure 11:** Structures chimiques de l'acide shikimique, la phénylalanine et des composés dérivés de l'acide pulvinique

Des études sur la biosynthèse des métabolites des lichens *Letharia vulpina* (**Mosbach, 1964**) et *Pseudocyphellaria crocata* (**Maass et al., 1964**), produisant des pigments jaunes, l'acide vulpinique (substance toxique) et la calycine, ont montré que la phénylalanine et l'acide shikimique sont des précurseurs de ces métabolites (**Stocker-Wörgötter, 2008**).

## 1.3. Voie de l'acétate polymalonate

Cette voie permet la synthèse d'une multitude de composés et dérivés formant une large famille, structurellement diversifiée de produits naturels spécifiques ou non des lichens (**Elix et Stocker-Wörgötter, 2008**) (**figure 12**).

La majorité des composés secondaires retrouvés chez les lichens proviennent de la voie de l'acétate polymalonate.

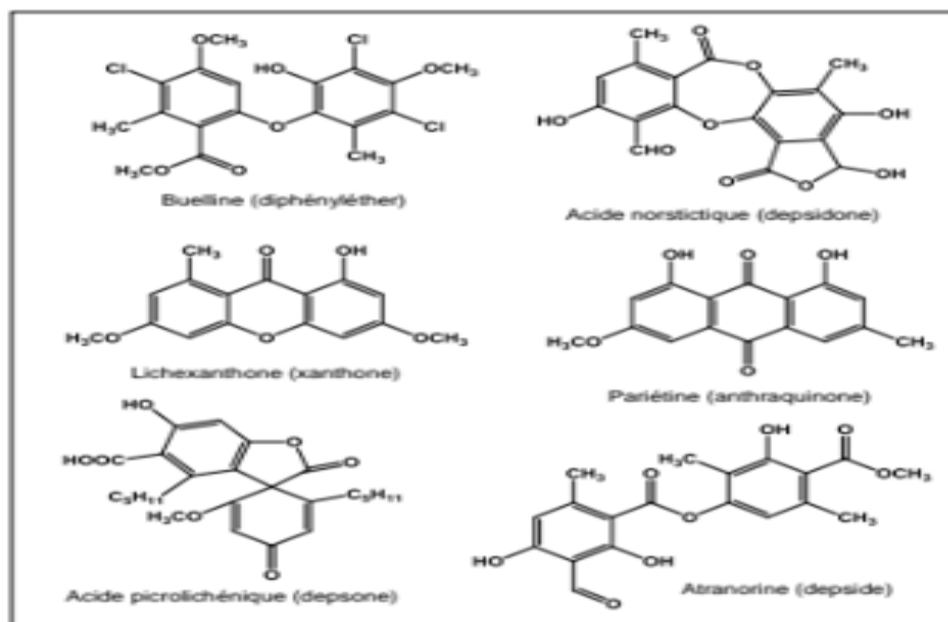


**Figure 12:** Structures de quelques précurseurs des polycétides aromatiques

Ces métabolites appartiennent à la famille :

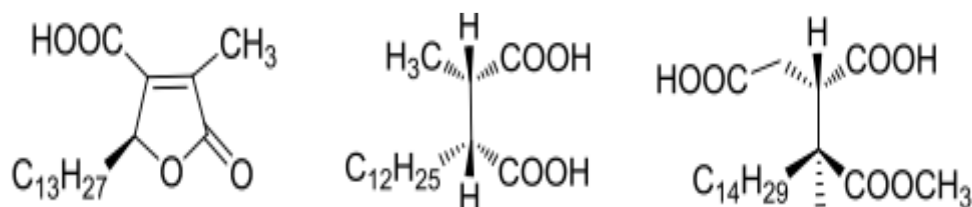
Des polycétides aromatiques : Cette famille représente les depsides, depsidones, depsones et diphenyléthers, dibenzofuranes tel que l'acide usnique, anthraquinones, naphthoquinones, xanthones, chromones, ... (**figure 13**).

De plus, les diphenyléthers sont relativement rares chez les lichens par rapport aux depsides et depsidones. Plus récemment, les xanthones d'origine lichénique ont fait l'objet de recherches récentes (**Le Pogam et Boustie, 2016**) ainsi que les dibenzofuranes et leurs dérivés (**Millot et al., 2016**).



**Figure 13:** Structures de quelques polycétides aromatiques

Des acides aliphatiques : peuvent être divisés en trois groupes : les  $\gamma$ -lactones (ex : acide lichestérinique), les diacides gras (ex : acide rocellique) et les triacides gras (ex : acide rangiformique) (**figure14**). La formation de ces acides lichéniques résulte de la condensation de type aldolisation d'une longue chaîne alcanoyl-SCoA avec une unité d'acide cétonique (**Ismed, 2012**).



**Figure 14:** Structures de l'acide lichestérinique, l'acide rocellique et de l'acide rangiformique

Le **tableau 3** montre Les différents types de composés lichéniques qui dérivent des trois voies métaboliques (**Huneck et yoshimura, 1998**).

**Tableau 3** :Principales classes de métabolites secondaires des lichens (Thi Huyen Vu, 2014)

Voie de biosynthèse	Types de composés	Nombres de composés
<b>Voie des acétates polymalonates</b>	Acides aliphatiques, esters et dérivés	56
	Monoaromatiques phénoliques	32
	Depsides, tridepsides, et esters benzyliques	207
	Depsidones et diphényléthers	131
	Depsones	8
	Dibenzofuranes, acide usniques et ces dérivés	29
	Anthraquinones et dérivés	52
	Chromones et chromanes	13
	Naphtoquinones et bis-naphtoquinones	10
	Xanthones et bis-xanthones	78
<b>Voie des mévalonates</b>	Di-, sesquiter-, et tri-terpènes	88
	Stéroïdes	33
<b>Voie de l'acide shikimique</b>	Terphénylquinones	2
	Dérivés de l'acide pulvinique	13

## 2. Activités biologiques des métabolites secondaires lichéniques

Les lichens produisent une variété de métabolites secondaires selon un procédé très énergivore où les partenaires fongique et photosynthétique travaillent en étroite collaboration (symbiose) pour fournir les éléments essentiels à la biosynthèse. Le rôle des métabolites spécialisés lichéniques au sein de la symbiose est encore peu connu. Ils sont suspectés d'aider le thalle lichénique à se protéger dans son environnement, souvent hostile, contre les herbivores, les pathogènes et des facteurs abiotiques tels que l'irradiation UV. De ce fait, beaucoup de métabolites isolés des lichens présentent de multiples activités biologiques comme l'acide usnique (l'acide (+) -usnique et l'acide (-) -usnique selon les sources lichéniques), présentant à la fois des activités antimicrobiennes, antiprolifératives et aussi connu pour son absorption UV. (Parrot, 2015). L'atranorine aussi présentant à la fois des activités antioxydantes, antimicrobiennes et photoprotectrices Plusieurs études montrent que les métabolites secondaires lichéniques ont une grande variété d'activités biologiques comprenant (tableau 4).

- Activité antimicrobienne : antibiotique, antifongique et antivirale
- Activité cytotoxique, antitumorale (approximativement une trentaine d'études).
- Activité antiherbivore et anti-insecticide (approximativement une vingtaine d'études).
- Activité inhibitrice d'enzymes.
- Activité antioxydante et de photoprotection (approximativement une cinquantaine d'études).
- Activité inhibitrice sur la croissance des plantes (approximativement une quinzaine d'études).

Neanmoins, certaines molécules présentes dans les extraits de certaines espèces comme d'*Evernia prunastri* et de *Pseudevernia furfuracea* ont montré des allergies précisément en parfumerie.

**Tableau 4** :Quelques exemples de métabolites secondaires lichéniques et leurs activités biologiques associées

<b>Métabolites secondaires lichéniques</b>	<b>Activités biologiques</b>	<b>Références</b>
<b>Atranorine</b>	Antioxydante, antibactérienne, antifongique, anti-inflammatoire	Kumar et al., 1999, Yilmaz et al.,2004, Turk et al.,2006, Rankoviš et al.(2008, 2010).
<b>Acide lobarique</b>	Activités antiprolifératives, cytotoxiques	Ögmundsdóttir et al., 1998
<b>Acide benzoïque</b>	Antioxydante	Sisodia et al. 2013
<b>Méthyl haematommate</b>	Activités antifongiques, antibiotiques.	Hickey et al., 1990
<b>Acide stictique</b>	Anticancéreuse, antioxydante, antibactérienne	Rankoviš and Misiš, 2008
<b>Methyl orsellinate</b>	Antidiabétique	Karunaratne et al., 2014
<b>Acide usnique</b>	Antivirale, antitumorale, antioxydante, antibactérienne, antifongique, antipyrétique, analgésique, anti-inflammatoire, hépatotoxique	Lauterwein et al., 1995, Perry et al., 1999, Tay et al., 2004, Odabasoglu et al., 2006, Rankovic et al., (2008, 2014), Paudel et al., 2010.
<b>Barbatic acid</b>	Antioxydant, antimicrobien	Verma et al., 2008, Martins et al.,2010.
<b>Norstictic acid</b>	Antimicrobien, antioxydant, anticancer	Tay et al., 2004, Honda et al., 2010, Ranković et al.,2014
<b>Acide évernique</b>	Antifongique, antibactérienne, antioxydant, anticancéreuse	Halama and Van Haluwin, 2004, Kosanic et al., 2013

## **Partie II Espèces lichéniques étudiées**

## Chapitre I : Présentation de l'environnement d'étude (Parc National d'El Kala)

La présente étude a été réalisée au niveau du Parc National d'El Kala (PNEK), vu qu'il constitue un patrimoine naturel important par la richesse biologique de ses habitats. D'une superficie de presque 78.000 ha, il est composé d'une mosaïque particulière d'écosystèmes, caractérisée par des zones humides dont l'ensemble constitue un complexe considéré comme unique dans le bassin méditerranéen (Benyacoub, 1993).

### 1. Situation géographique

Appartenant au Tell Nord-Oriental algérien, le Parc National d'El Kala est limité au Nord par un cordon dunaire bordant la mer Méditerranée, à l'Est par la frontière algéro-tunisienne, au Sud par les monts de la Medjerda et à l'Ouest par la ville d'El Tarf et les vastes marais de la Mekkada (figure 15). Ses coordonnées géographiques sont : 36°52 latitudes Nord et 8°27 longitudes au niveau de la ville d'El Kala (Benyacoub, 1993).



Figure 15: Localisation du Parc National d'El Kala (P.N.E.K., 2010)

## 2. Description du Parc National d'El Kala

La diversité géomorphologique, pédologique et hydraulique fait du Parc National d'El-Kala une mosaïque de milieux naturels originaux.

### 2.1. Géologie et géomorphologie

La région d'El Kala date de la formation de la chaîne tellienne. L'actuelle structure morphologique résulte d'une activité tectonique datant du tertiaire et du quaternaire. Cette diversité combinée à l'action de l'eau et du vent contribue jusqu'à présent au façonnement du relief (**Marre, 1987**).

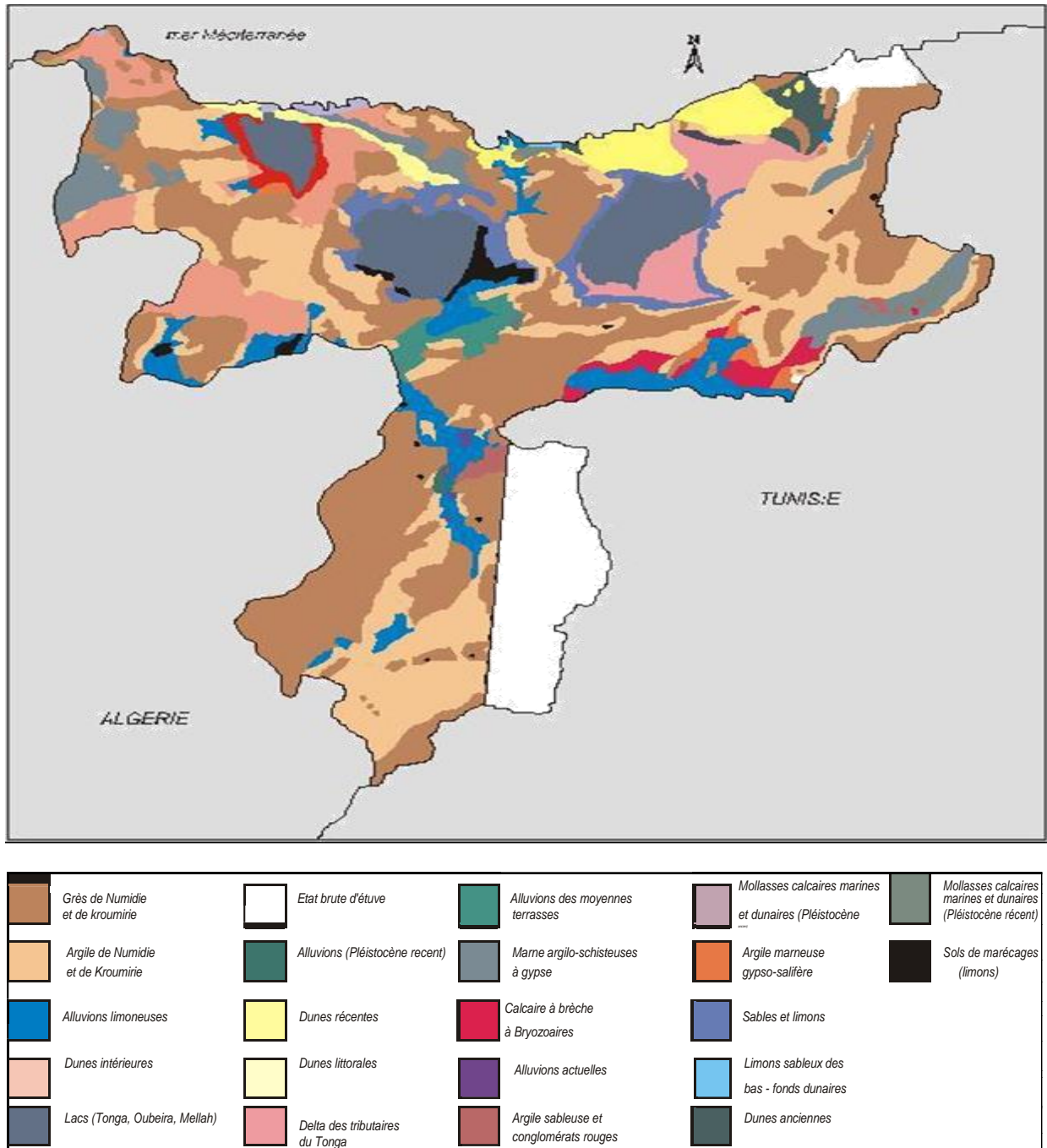
Le relief du Parc National d'El Kala se compose d'une juxtaposition de dépressions dont certaines sont occupées par des formations lacustres ou palustres et des hautes collines de formes variées. Ainsi, nous distinguons, du littoral vers le sud,

- Des formations collinaires basses (dunaires ou non) de 30 à 310m de haut (Djebel Koursi) avec une moyenne de 100m de haut, se longent sur 15km vers le sud et s'interrompent au niveau de la vallée de Oued El Kébir.
- De grandes dépressions inter-collinaires hébergent dans cet ensemble les principaux lacs Tonga, Oubeïra et Mellah.
- Au Sud le relief passe en moins de 40Km de 0 à 1200m d'altitude (Djebel Ghorra).

En effet, le relief se caractérise par un pendage important : 09% de pentes faibles, 11% moyennes et 80% fortes à très fortes, ce qui constitue exceptionnellement un paysage montagneux fortement disséqué par un réseau hydrographique dense (**De Belair, 1990**).

L'époque tertiaire se distingue par la formation des argiles de Numidie qui sont datées de l'Éocène moyen. Ces argiles d'une épaisseur de 300 m environ se développent dans le fond des vallées et en bordure des plaines, tandis que les grès de Numidie datant de l'Éocène supérieur reposent, en concordance sur les argiles précédentes, sur 150 m d'épaisseur, formant la masse principale des collines et la crête du djebel Ghorra. A l'époque quaternaire il y a eu la formation des dépôts fluviaux constitués principalement de limons, de sables et de galets déposés par les Oueds. Quant aux dépôts marins éolisés ils sont formés par un amas dunaire issu de l'érosion par la mer des falaises gréseuses (**Joleaud, 1936**) (**figure 16**).

La couverture pédologique de la région se caractérise par une distribution de chaînes de sols, dont l'évolution est sous l'influence des facteurs liés à la topographie, la végétation en surface, et la roche mère en profondeur, donnant une très grande diversité morphologique (**Durand, 1954 ; Benslama, 1993**). Ainsi, la majeure partie du sous-sol de la région d'El-Kala occupée par le Flysch Numidien est convenable à l'évolution de sols bruns forestiers légèrement lessivés (**Aouadi, 1989**). Dans les milieux humides on rencontre : les Histosols, les sols hydromorphes humifères et les sols à Gley et à Pseudogley (**Benslama, 1993 ; 2002**).



**Figure 16:** Carte Géologique du Parc National d'El Kala (Benyacoub et al., 1998)

## 2.2. Réseau hydrographique

Les ressources hydriques sont importantes et le réseau hydrographique est complexe. Il est décomposé en plusieurs unités. L'Oued El-kebir constitue le cours d'eau le plus important avec ses affluents (Guergour, Boulatane, Bourdim et El-Bhaim).

Selon Benyacoub et al (1998) l'eau est un élément présent dans la région d'El Kala, sous forme de plans d'eau de taille et de nature diverse (lac Tonga, lac Oubeira, lagune d'El-Mellah), nappes souterraines (nappe superficielle et nappe captive profonde superposées d'El Tarf, nappe semi captive et nappe superficielle d'Oum Teboul, nappe du cordon dunaire, et de

nombreuses sources existent sur le territoire du parc, les plus importantes sont celles de Bouglez, Bouredim et El-Bhaim qui totalisent un débit de 150 l/s soit un débit de 12.700m<sup>3</sup>/j. Nous pouvons citer : Ain Boumalek, Boulif, Ain Darrdara, Khanguet-Aoun, El-Hammam, Ain-Laiche, Ain-Melloul, Ain Sidi-Boutribicha (**Samraoui et De Belair, 1997**).

### 3. Données climatiques

El Kala est considéré comme la région la plus humide d'Algérie, elle compte parmi les régions les plus abondamment arrosées avec une variation annuelle 877,4 mm durant la période donnée enregistrées de 1985-2010 selon la station météorologique d'El Kala.

La température moyenne la plus basse a été enregistrée au mois de Janvier (11,3°C), par ailleurs, la température moyenne la plus élevée, se situe au mois d'Aout (25,5 °C), (**tableau 5**). Le quotient pluviométrique d'Emberger Q2 est de 139,73 a permis de situer le parc national d'El Kala dans l'étage bioclimatique subhumide (**Slimani, 2014**).

**Tableau 5** :Variation moyenne de la température et de la pluviométrie (1985-2010).

Mois	T° moy (°C)	P (mm)
<b>Janvier</b>	11.3	114.8
<b>Février</b>	13.6	120.8
<b>Mars</b>	13.4	85.1
<b>Avril</b>	15.5	81
<b>Mai</b>	18.5	84.7
<b>Juin</b>	21 .3	17.6
<b>Juillet</b>	24.4	0.9
<b>Aout</b>	25.5	2.3
<b>Septembre</b>	23.4	49.6
<b>Octobre</b>	21.3	70.4
<b>Novembre</b>	17.5	137.1
<b>Décembre</b>	13	153.1
<b>Total</b>	218.7	877.4

#### 4. Richesses biologiques

Le Parc National d'EL Kala, abrite une richesse faunistique et floristique remarquable :

##### 4.1. Richesse faunistique

La particularité de la région réside aussi dans sa biodiversité. La faune du parc compte environ 37 espèces de mammifères, 190 espèces d'oiseaux dont 55 hivernantes et 135 nicheuses, 42 espèces d'odonates, 76 espèces de Syrphidés, 60 espèces de Carabidés, 45 espèces de Lépidoptères (**Benyacoub et al., 1998**) et 24 espèces de reptiles et 6 amphibiens (**Rouag & Benyacoub, 2006**).

##### 4.2. Richesse floristique

La région d'El Kala abrite au moins un tiers de l'ensemble de la flore d'Algérie. Elle est représentée par les deux grands groupes du règne végétal qui sont les Cryptogames et les phanérogames. Le premier groupe est représenté par une trentaine de fougères, 98 espèces de champignons et 114 espèces lichéniques ; le deuxième groupe est représenté par 780 espèces soit environs 30% des spermapytes de l'Algérie.

Évaluant cette flore par rapport à la flore nationale, elle représente 15% de la flore rare à l'échelle nationale selon **Braun-Blanquet (1928)**.

## Chapitre II : Récolte et Identification des espèces étudiées

### 1. Choix des espèces

Notre choix s'est porté sur 3 espèces lichéniques :

*Parmotrema hypoleucinum* : espèce corticole au niveau du lac tonga, se développant sur deux phorophytes différents : *Olea europea* et *Quercus coccifera* ; le choix du chêne kermès et de l'oléastre comme phorophytes rend compte en premier lieu de l'aire qu'occupent ces essences dans la zone d'étude ; de plus ces substrats corticoles présentent une très grande affinité pour les lichens selon les études préétablis (Semadi, 1989 ; Zedda, 2002 ; Sipman, 2006).

*Parmotrema reticulatum* : espèce corticole Abondante au niveau de la station de Feid el mrad,

*Physcia mediterranea* : espèce saxicole, à Ain tebib, nous signalons que c'est une espèce nouvellement identifiée en Algérie par Pr Monia Ali Ahmed au sein du laboratoire de Biologie végétale et environnement et autentifé par Mr Jean Michel sussey lichenologue à L'AFL en France.

### 2. Descriptions des stations d'études

Le choix des stations est déterminé par différents facteurs : la recherche d'espèces non encore étudiées, par la suite leur abondance et enfin l'accessibilité du milieu.

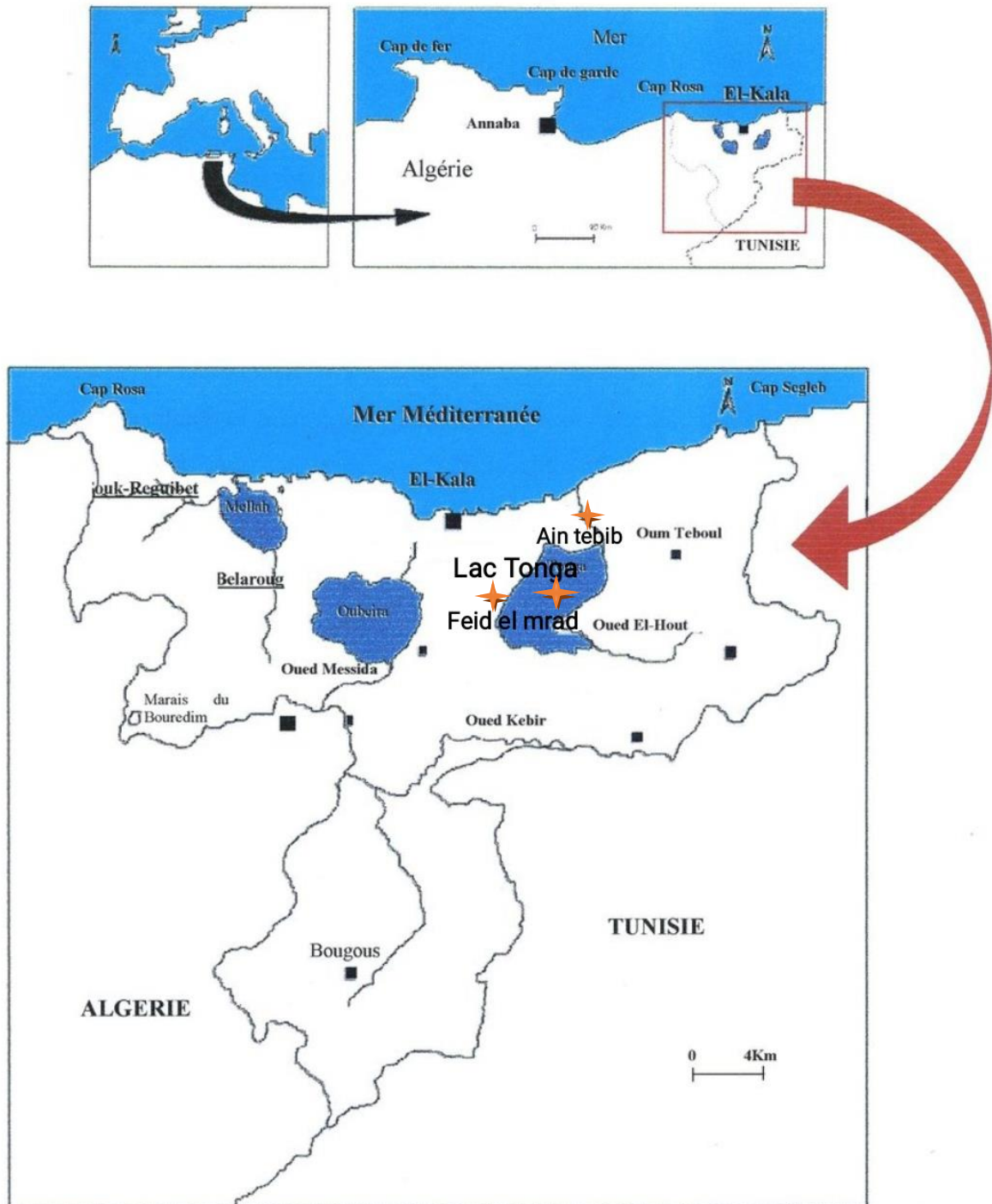
De ce fait, les trois stations de récoltes ont été sélectionné où le chêne liège, le chêne zeen, le chêne kermès et l'olivier présentent des formations homogènes et importantes avec un cortège floristique très varié (*Pistacia lentiscus* L, *Myrtus communis*, *Asphodelus cerasiferus*, *Arbutus unedo*, *Lavandula angustifolia* et *Calicotome villosa*...) (tableau 6).

Le tableau ci -joint regroupe l'ensemble des stations choisies en précisant l'altitude, la végétation dominante et les coordonnées GPS.

**Tableau 6** :Différents stations de récoltes

Noms des stations	Altitude	Végétation dominantes	Coordonnées GPS
Lac Tonga	160m	<i>Pinus pinea</i> , <i>Quercus coccifera</i>	36° 51'38''N / 08 ° 28'46''E
Ain Tebib	120m	<i>Quercus suber</i>	36° 49'06''N / 08 ° 31'39''E
Feid el mrad	48m	<i>Quercus suber</i>	36° 52'45''N / 08 ° 30'48''E

Nous retrouverons ci-dessous la carte de répartition des différentes stations (figure 17).



**Figure 17:** Localisation géographique des stations d'études dans le Parc National d'El Kala



**Figure 18:** Stations échantillonnées au niveau du Parc National d'El Kala

### 3. Échantillonnages et conservation des espèces

Les 2 *Parmelia* familles des *Parmeliaceae* sont des espèces foliacées se développant sur écorce d'arbre (corticole) ont été facilement détachées de l'écorce ; par contre l'espèce *Physcia* de la famille des *Physciaceae*, a été délicatement détaché de la roche à l'aide d'un couteau, on note que toutes les espèces ont été prélevées de telle façon à détacher la totalité du thalle.

- Les premiers échantillons de *Physcia mediterranea* (Ain Tebib) et *Parmotrema hypoleucinum* (Lac Tonga) ont été récoltés en juin 2017.

- Une deuxième récolte de *Parmotrema reticulatum* a été effectuée durant le mois d'Avril 2018 au niveau de Feid el mrad. (**tableau 7**).

Après prélèvement, chaque spécimen a été mis dans une enveloppe sur laquelle on note les caractéristiques de la récolte, puis laisser à l'air libre pour séchage et enfin conservé sec dans des enveloppes à l'abri de la lumière afin de pouvoir les identifier au laboratoire.

**Tableau 7 :** Différentes espèces étudiées et leurs substrats

Espèces	Code	Stations	Substrat
<i>Parmotrema hypoleucinum</i> (J. Steiner) Hale	Par hyp 1	Lac Tonga	<i>Olea europea</i> (Corticole)
	Par hyp 2	Lac Tonga	<i>Quercus coccifera</i> (Corticole)
<i>Physcia mediterranea</i> Nimis	Phy med 3	Ain Tebib	Saxicole
<i>Parmotrema reticulatum</i> (Taylor) M. Choisy	Par ret 4	Feid el mrad	<i>Quercus suber</i> (Corticole)

## 4. Identification d'espèces lichéniques étudiées :

### 4.1 Observation macroscopique

Pour chaque espèce, l'observation macroscopique a été effectuée à l'aide d'une loupe binoculaire de type (Leica EZ4 D) en prenant en considération l'aspect général du thalle ainsi que les organes reproducteurs (soralies, apothécie ...).

## 4.2 Réactions thallines

Ces réactions sont très utilisées sur le terrain et au laboratoire. Elles apportent des informations indispensables pour progresser dans les clés de détermination. Trois substances (C, K et P) sont principalement utilisées.

### a. L'eau de javel ou hypochlorite de sodium (notée C) :

On utilise la solution concentrée du commerce (celle qui est dépourvue de colorants ou d'aromatisants), le réactif est déposé sur le cortex, la médulle préalablement dégagée avec une lame de rasoir, le bord de l'apothécie... Instantanément ou dans les quelques secondes qui suivent une coloration se développe (ou non).

### b. La potasse ou hydroxyde de potassium (notée K) :

En solution aqueuse (10 %), doit être renouvelée.

### c. La paraphénylènediamine (para 1-4 phénylènediamine notée P) :

Préparée au moment de l'emploi en dissolvant dans un verre de montre, un ou deux petits cristaux de paraphénylène-diamine dans une goutte d'alcool absolu (éthanol anhydre).

Ce réactif est toutefois très toxique, la solution alcoolique s'oxyde très rapidement, devient brune et ne peut plus être utilisée après quelques heures.

Les résultats de ces réactions colorées sont notés C+, K+, P+ suivi du nom de la couleur obtenue (Ex : cortex C+ rouge si on obtient une coloration rouge après avoir déposé C sur le cortex) ou C-, K-, P- lorsqu'il n'y a pas de modification de la teinte. Certaines couleurs peuvent être fugaces (**Clauzade et Roux, 1985 ; Van Haluwyn et Asta, 2009**).

## 4.3 Observation microscopique

Les échantillons sont examinés à l'aide d'une loupe binoculaire qui permet aussi de pratiquer des coupes précises. Les coupes d'apothécies et de thalle sont ensuite montées entre lame et lamelle soit dans l'eau ou dans un colorant (le bleu coton lactophénol) et observées au microscope optique (Leica DCF420) avec différents grossissements.

## Chapitre III : Résultats et discussions

### 1. Description botanique

Toutes les espèces ont été identifiées par Professeur Monia Ali Ahmed, lichénologue et directeur de recherche de l'équipe « Pathologie des écosystèmes » au laboratoire de Biologie Végétale et Environnement à l'Université Badji-Mokhtar, Annaba, Algérie, seule *Physcia mediterranea* a été encore authentifié par M. Jean Michel Sussey, lichénologue de l'Association française de lichénologie (AFL)France. Afin d'identifier nos espèces nous avons fait appel à plusieurs flores (**Clauzade et Roux, 1985** ; **Van Haluwyn et Asta, 2009** ; <http://www.afl-lichenologie.fr/> ; **LIAS light – A Database for Rapid Identification of Lichens. [liaslight.lias.net/](http://liaslight.lias.net/)**).

Il aussi intéressant en taxonomie de connaître les synonymes des espèces et le **tableau 8** enregistre les différents synonymes utilisés des 3 espèces étudiées selon <https://inpn.mnhn.fr>

**Tableau 8** :Différents synonymes utilisés des 3 espèces étudiées

Espèces	Synonymes	Familles
<i>Parmotrema hypoleucinum</i> (J. Steiner) Hale	<i>Parmelia hypotropa</i> auct <i>Parmelia subincana</i> (Maheu & A. Gillet) <i>Parmotrema werneri</i> M. Choisy	Parmeliaceae (Zenker,1827)
<i>Physcia mediterranea</i> Nimis	<i>Physcia aipolia</i> f. saxicola <i>Physcia aipolia</i> subsp. <i>scopulorum</i> <i>Physcia scopulorum</i>	Physciaceae (Zahlbr,1898)
<i>Parmotrema reticulatum</i> (Taylor) M. Choisy	<i>Parmelia reticulata</i> Taylor <i>Parmelia perforata</i> Wulfen <i>Parmelia concors</i> Kremp <i>Parmelia virens</i> var. <i>sorediata</i> Müll. Arg	Parmeliaceae (Zenker,1827)

#### ► Espèce 1 : *Parmotrema hypoleucinum* (J. Steiner) Hale

Elle est dotée d'un thalle foliacé, de couleur gris vert clair, peu adhérent au substrat lobes larges, très ascendants, très contournés ; face inférieure blanche avec quelques rhizines noires ; face supérieure réticulée costulée. Les lobes les plus périphériques présentent des soralies marginales avec des cils noirs à la marge. Apothécies non observées.

Photosymbiote : algue verte autre que trentépothlia.

#### Habitat :

Généralement sur des arbres dans des habitats ouverts, rarement sur des rochers, dans le maquis élevé, dans des formations intermédiaires entre le maquis et la chênaie verte et dans la chênaie-liège. C'est une espèce acidophile, aérohygrophile, photophile ou héliophile, non ou peu nitrophile. Largement répandue en méditerranée.

► **Espèce 2 : *Physcia mediterranea* Nimis (taxon nouvellement identifié)**

*Physcia aipolia* f. *saxicola* = *Physcia aipolia* subsp. *Scopulorum* = *Physcia scopulorum*

Thalle foliacé en rosette aux lobes très allongés, convexes, gris clair, macules bien visibles, pas de soralies, pas d'isidies. Apothécies ; lécanorines, disque noir, marge thalline crénelée, spores brunes à 1 cloison, 14-17,1 x 7,5-9,6 µm selon la littérature, Pycnides avec conidies droites 5-6 µm.

Photosymbiote : algue verte (genre *Trebouxia*).

**Habitat :**

Venant sur les rochers siliceux. C'est une espèce héliophile, halophile et nitrophile ; ombroclimat subhumide. Présente sur le littoral corse. (Roux et coll., 2017)

► **Espèce 3 : *Parmotrema reticulatum* (Taylor) M. Choisy**

Son thalle est de type foliacé (5-20 cm), lobé au pourtour, gris blanchâtre ou gris verdâtre, face supérieure présentant des macules disposées en réseau uniquement visible sous la loupe (x20). Soralies plus ou moins globuleuses, peu nombreuses, principalement sur le bord des lobes centraux. Face inférieure noire, brune sur le bord des jeunes lobes. Rhizines noires, simples, abondantes, sauf sur le bord où elles sont peu nombreuses et dispersées (sur 2-3 mm environ) du thalle. Absence de cils noirs au pourtour du thalle.

Photosymbiote : algue verte du genre *Trebouxia*.

**Habitat :**

Corticole, lignicole, plus rarement muscicole ou saxicole. Dans des forêts claires, ou sur des arbres isolés, dans des stations bien éclairées. Dans des régions à climat assez chaud, et suffisamment humide, dans les régions méditerranéo-atlantique et océaniques et subocéaniques.



*Parmotrema hypoleucinum* (Steiner) Hale



*Parmotrema reticulatum* (Taylor) M. Choisy

Ascomycota - Lecanoromycetideae - Lecanorales – Parmeliaceae



*Physcia mediterranea* Nimis


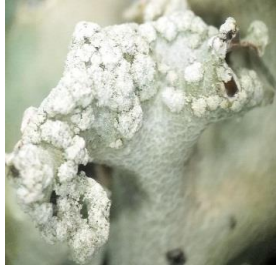





Ascomycota - Lecanoromycetideae - Lecanorales - Physciaceae

**Figure 19:** Talles des espèces lichéniques récoltées

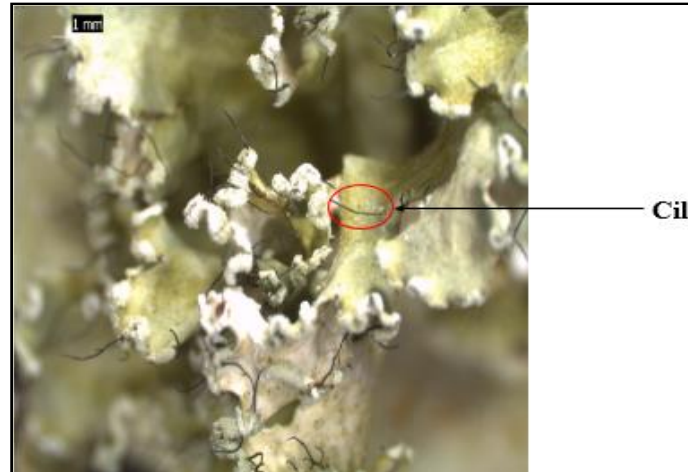
**2. Caractéristiques macroscopiques**

Les caractéristiques concernant l'aspect morphologique général de chaque espèce sont consignées dans le **tableau 9**.

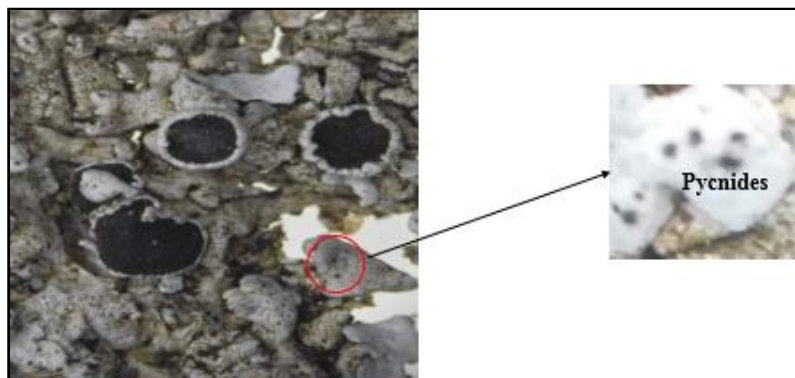
**Tableau 9:** Caractéristiques morphologiques des espèces récoltées

Caractéristiques macroscopiques				
Espèces	Aspect générale	Soralies	Apothécies	Pycnides
<i>Par hyp</i>			Absence	Absence
<i>Phy med</i>		Absence		
<i>Par ret</i>			Absence	Absence

(*Par hyp*) = *Parmotrema hypoleucinum* est caractérisé par un thalle grand à lobes larges très ascendants et contournés, face inférieure blanche, présente à la marge quelques cils noirs visible à l'œil nu (**figure 20**), par contre l'espèce (*Par ret*) = *Parmotrema reticulatum* est dépourvue de cils noirs, le caractère le plus remarquable de *Parmotrema reticulatum* c'est la présence des macules rétinienne sur la face supérieure du thalle.



**Figure 20:** Aspect générale du thalle de *Parmotrema hypoleucinum*



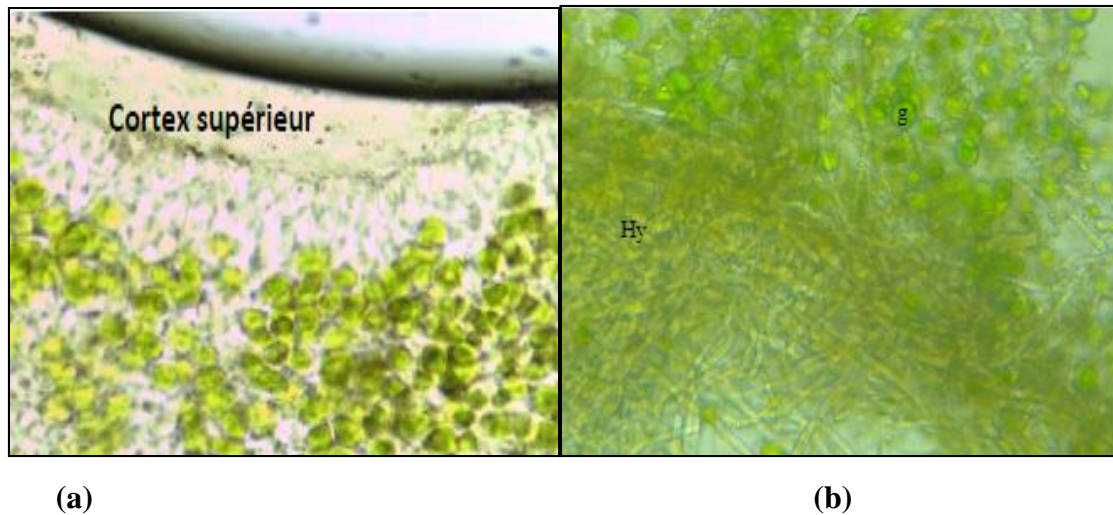
**Figure 21:** Aspect générale du thalle de *Physcia mediterranea* avec les organes reproducteurs (apothécies et pycnides)

Les apothécies de l'espèce (*phy med*) = *physcia mediterranea* sont de type lécanorine, avec un bord de la même couleur que le thalle (**figure 22**). Sous une loupe binoculaire les pycnides sont apparues comme de très petites cavités contenant à l'intérieur des conidies qui sont souvent utilisés pour caractériser les genres et les espèces lichéniques. (**Gavériaux, 2009**).

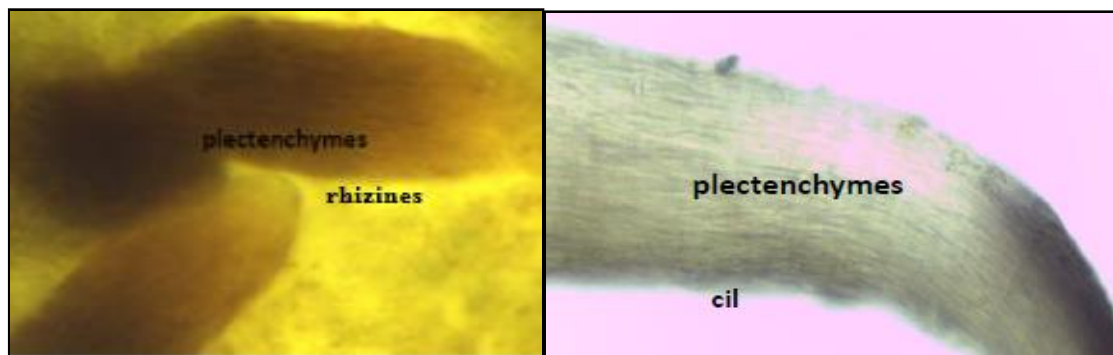
### 3. Caractéristiques Histologiques

Certaines espèces lichéniques exigent des coupes histologiques afin de confirmer leur identification. D'après cette étude microscopique du thalle on a pu constater que la structure d'un thalle lichénique est moins variable que sa morphologie, les espèces lichéniques foliacées que nous avons étudiées sont de structure hétéromère stratifiée qui est caractérisée par l'existence de plusieurs couches superposées bien visibles sur une section transversale, on remarque la présence de trois parties se présente comme suit (**figures 23,24 et 25**) (**Clouzade et roux, 1987**).

- Cortex supérieur, constitué d'hyphes très serrés, sorte d'enveloppe protectrice externe.
- Médulle (zone médullaire) :
  - Couche algale, dans laquelle nous trouvons les hyphes (filaments de champignon), mais beaucoup moins denses que dans le cortex, formant un réseau contenant les cellules algales.
  - Couche non algale, constitué d'hyphes très lâches.
- Cortex inférieur, seulement constitué d'hyphes, très denses.

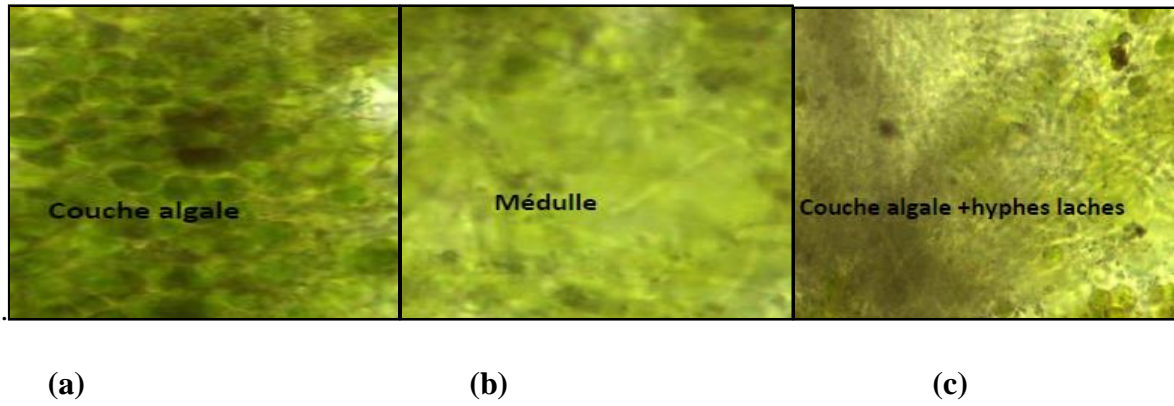


**Figure 22:** Coupe transversale (a, b) du thalle de *Parmotrema hypoleucinum* (x400)

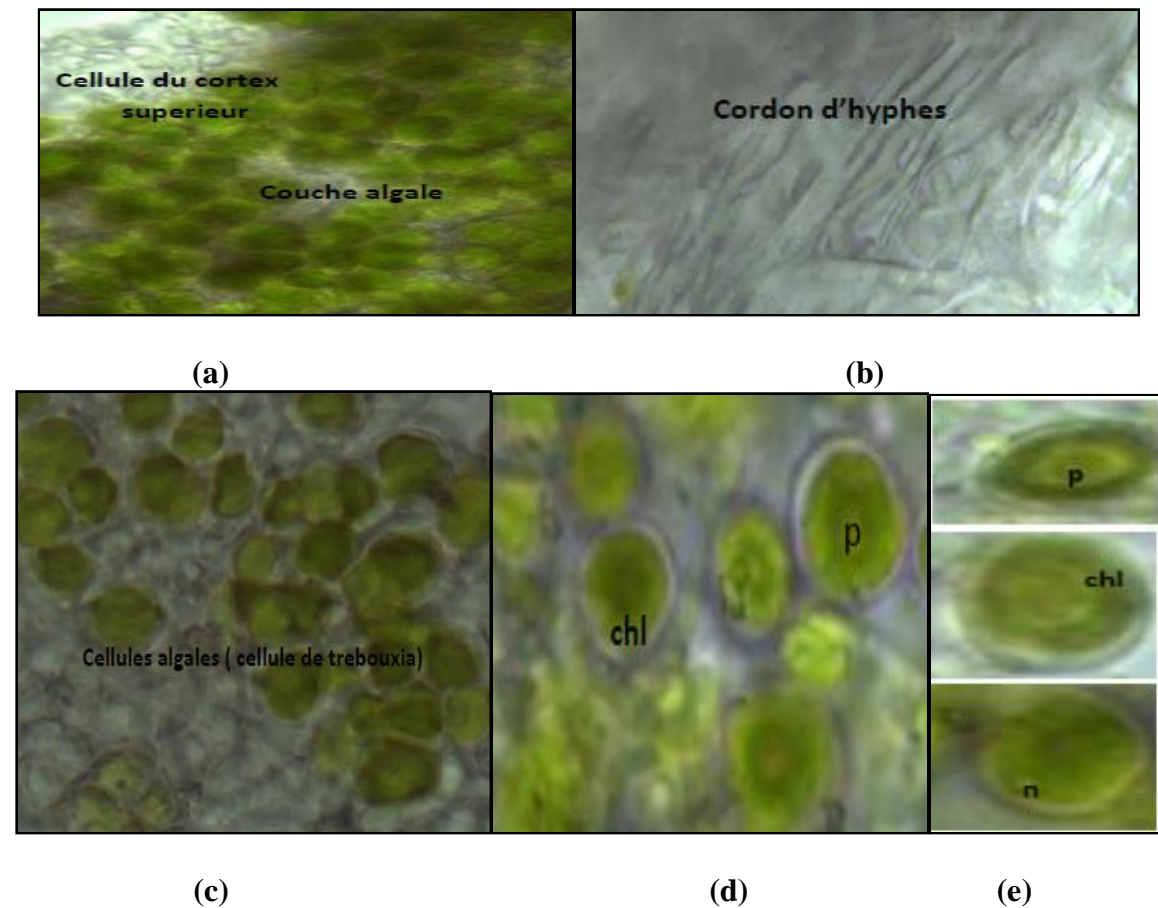


**Figure 23:** Coupe transversale des rhizines et cils au niveau du thalle de *Parmotrema hypoleucinum* (x400).

D'après Sérusiaux et al., 2004, les cils ont à peu près la même structure que les rhizines, formés de l'agglomération de filaments mycéliens lâches ou denses nommés plectenchymes. (figure 23).



**Figure 24:** Coupe transversale du thalle de *Physcia mediterranea* (x400)

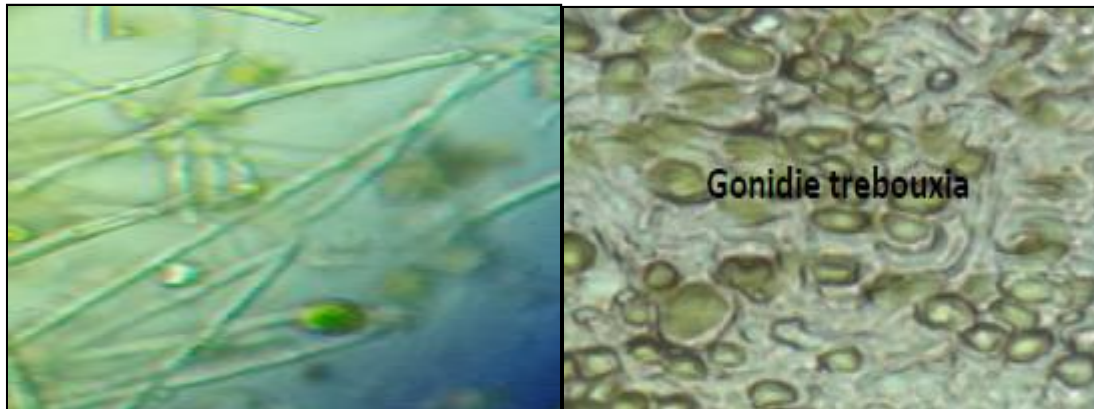


**Figure 25:** Structures histologiques du thalle de *Parmotrema reticulatum*(x40) P : pyrénolide ; n : noyau ; chl : chloroplaste (x100).

Chez les lichens les hyphes sont des structures filamenteuses formant des plectenchymes à hyphes libres ou lâches situés dans les couches algales (**figure 25, 26**) et des plectenchymes à hyphes soudés dont on distingue les prosoplectenchymes, hyphes à paroi épaisse constituant les cortex

**Selon Asta (1994)**, Ce sont les hyphes qui sont à l'origine de la morphologie du thalle. Ils occupent 90 % de La biomasse totale du lichen.

La couche algale constitué par des hyphes plus lâches et contenant des cellules algales appartenant aux chlorophycées (chlorococcales) on les rapporte au genre *Trebouxia* (Clauzade et Ozanda, 1970), présent chez la moitié des lichens, ses cellules sont sphériques, plus rarement ovoïdes (figure 25 c et d), la paroi cellulaire est lisse extérieurement, elle contient un seul chloroplaste irrégulièrement lobé avec un pyrénoïde central, le noyau est en position pariétale (Figure 25 e).

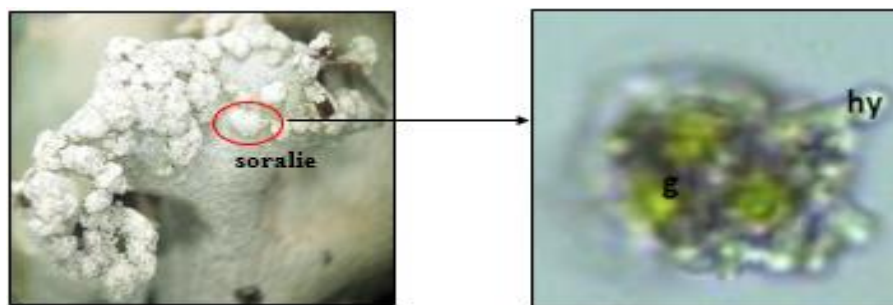


**Figure 26:** Photobionte de *Parmotrema hypoleucinum* et *Physcia mediterranea* (de gauche à droite) : Tretepholia et Trebouxia (algues vertes).

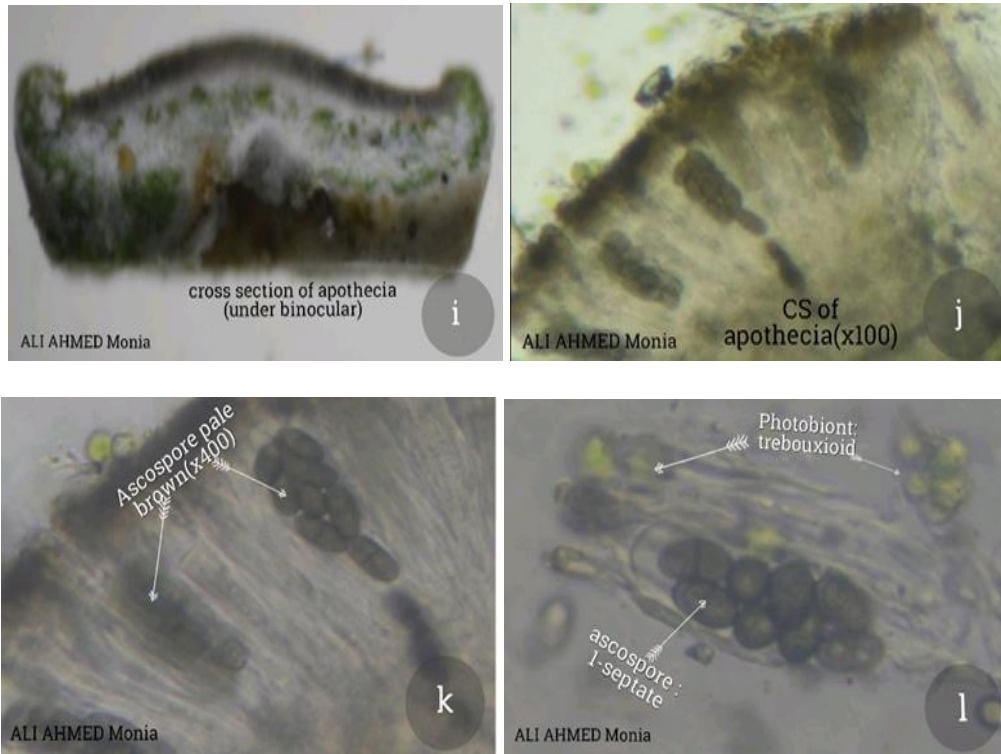
Pour les espèces étudiées le photosymbiote est de type *Trebouxia* sauf pour *Parmotrema hypoleucinum* il s'agit de l'algue filamenteuse *Tretepholia* qui est caractérisée par des cellules colorées en jaune orangé leur cytoplasme contenant des gouttelettes d'huile, riches en caroténoïdes, ces cellules perdent leur pigment orangé, et deviennent moins teintées de vert clair (Ozanda et Clauzade, 1970), ce photobionte est très connu chez le genre *Roccella* (Nash, 2008).

Nous avons également réalisé des sections sur les organes reproducteurs asexués tels que les soralies de *Parmotruma hypoleucinum* qui permettant la multiplication végétative de l'espèce ainsi que sur les organes reproducteurs sexués (les apothécies) de *Physcia mediterranea*.

Le thalle de *Parmotrema hypoleucinum* montre des Soralies marginales, situées sur le bord des lobes des thalles où elles forment un renflement sorédial (figure 27).



**Figure 27:** Détail d'une soralie de *Parmotrema hypoleucinum* (x 400) (g : gonidie, hy : hyphe)



**Figure 28:** Structures histologiques de l'apothécie de *Physcia mediterranea*. (x 400)

*Physcia mediterranea* se reproduit à l'aide des apothécies en général assez nombreuses, sont de forme lécanorine (**figure 28**) sa coupe montre la présence de l'épithécium qui est la partie supérieure de l'apothécie puis l'hyménium qui se compose d'asques brunes à 8 spores cloisonnées, ellipsoïdes selon la littérature (**Paz Bermudez et al.1998, Senese et Critelli 2000, Ioppi et al 2004**). Enfin l'hypothécium qui est la partie ascogène et l'excipulum (rebord de l'apothécie) (**Wirth, 1995**).

Sur le plan histologique, les métabolites secondaires du lichen sont déposés soit dans le cortex ou plus souvent la médulle. Les composés corticaux les plus habituels sont l'acide usnique et l'atranorine, Les substances sont souvent exprimées différemment au niveau des différentes couches autrement dit, Les substances corticales typiques peuvent être distinguées des composés habituellement trouvés dans la médulle. Cela pourrait être lié à leur fonction biologique : jouant le rôle de filtre par rapport à la lumière (**Marques, 2013**)

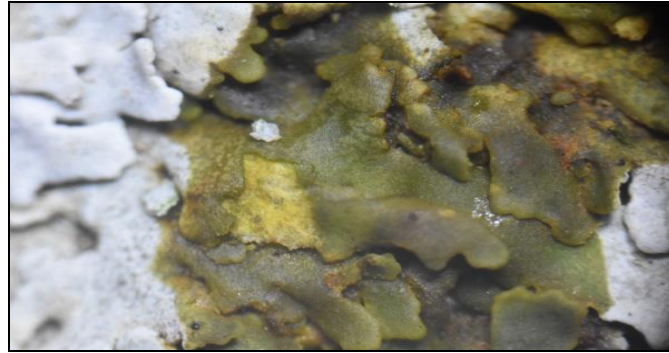
#### 4. Réactions thallines

Les colorations observées sur le cortex et la médulle sont notées ci-dessous.

**Tableau 10 :** Résultats des réactions thallines des espèces lichéniques étudiées.

Espèces	K	C	KC	P
<i>Parmotrema hypoleucinum</i>	K+ (jaune)	C-	KC-	Orange ou rouge
<i>Physcia mediterranea</i>	K+ (jaune)	C-	KC-	Pd-
<i>Parmotrema reticulatum</i>	K+ (jaune)	C-	KC-	Pd+ (orange)

(-) Aucune coloration, (+) Coloration



**Figure 29:** Thalle de *Physcia mediterranea* K<sup>+</sup> (jaune)

D'après les résultats des réactions de coloration effectuées sur les 3 espèces, nous avons remarqué que ces espèces présentent une réaction avec l'hydroxyde de potassium (K<sup>+</sup>) de couleur jaune (**figure 29**), cette réaction est due à la présence d'atranorine et de chloroatranorine de la famille des depsides. *Parmotrema hypoleucinum* a réagi positivement avec la paraphénylènediamine (Pd<sup>+</sup>) couleur orange ou rouge qui peut exprimer la présence de l'un des métabolites secondaires suivants : acide constictique, acide norstictique ou acide stictique qui appartiennent à la famille des depsidones (**Nash et al., 2002**). La réaction positive avec la paraphénylènediamine (Pd<sup>+</sup>) sur le thalle de *Parmotrema reticulatum* de couleur orange est due à la présence d'acide salazinique qui est un composé majeur et d'acide consalazinique (**Udeni Jayalal et al., 2013**).

### **Conclusion :**

Les réactions thallines ont pu confirmer l'identification des espèces que nous venons d'étudier et ceci selon les différentes clés de détermination. En conclusion les trois espèces étudiées *Parmotrema hypoleucinum*, *Physcia mediterranea*. et *Parmotrema reticulatum* renferment deux grandes familles chimiques (depsides et depsidones), celle des composés phénoliques ayant d'importantes activités photoprotectrices et antioxydantes.

Afin d'apporter des informations supplémentaires sur la composition chimique et la diversité chimique des espèces étudiées des analyses plus approfondies sont appliquées sur des extraits préparés à partir des thalles lichéniques préalablement nettoyés et broyés seront détaillé dans les parties suivantes.

**Partie III Etude Phytochimique & Activité antioxydante des  
espèces étudiées**

## Chapitre I Préparation des extraits lichéniques

### 1. Choix des solvants

Le choix des solvants utilisés pour l'extraction successive est de polarités différentes, ceci permet d'obtenir des extraits qui présentent une composition chimique variable. Nous avons choisi trois solvants : l'hexane qui permet d'extraire les composés non polaires, le chloroforme vise à extraire les composés moyennement faibles et l'éthanol permet de récupérer les produits très polaires.

### 2. Procédés d'extraction utilisés

Selon la littérature, différentes séries d'extractions peuvent être réalisées en présence d'heptane, hexane, toluène, éther d'éthylque, dichlorométhane, tétrahydrofurane, acétone, acétate d'éthyle, ou de méthanol (Verma et al., 2011 ; Millot et al., 2012).

Dans ce travail, des extractions séquentielles utilisant le n-hexane, le chloroforme et l'éthanol ont été mises en œuvre sur *Parmotrema hypoleucinum* (*Par hyp 1* et *Par hyp 2*), *Physcia mediterranea* (*Phy med 3*) et *Parmotrema reticulatum* (*Par ret 4*) (figure 30).

Le tableau ci-dessous enregistre les masses de chaque espèce lichénique après broyage.

**Tableau 11** :Masses des espèces lichéniques

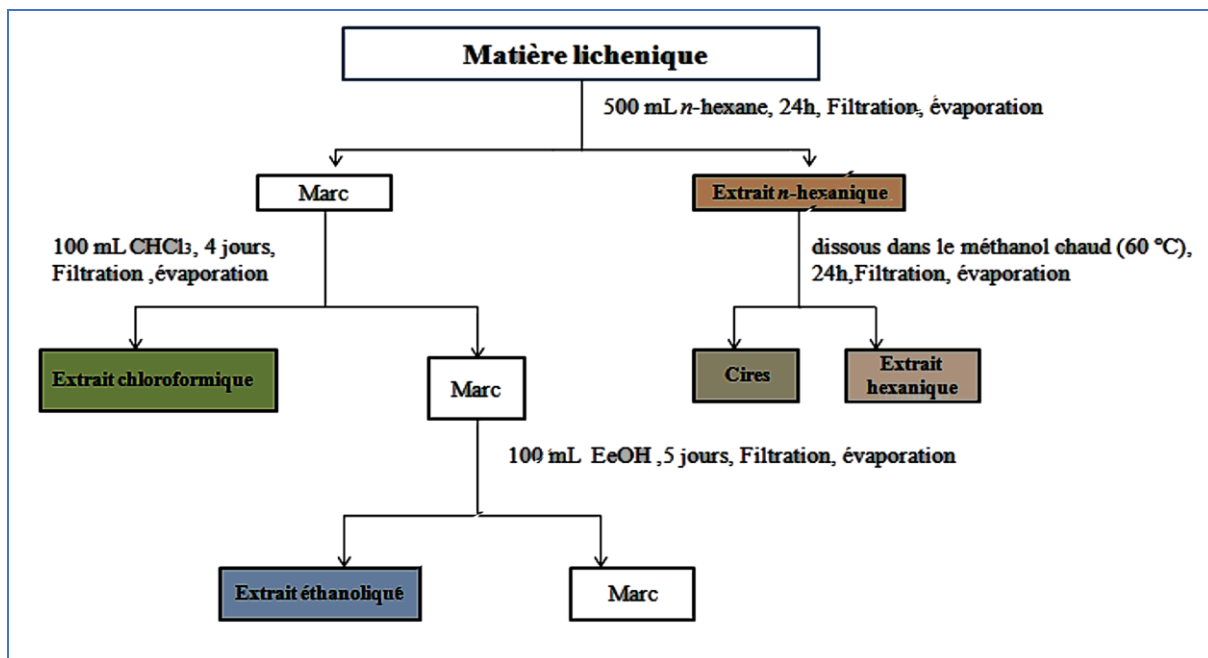
Especes	<i>Par hyp 1</i>	<i>Par hyp 2</i>	<i>Phy med 3</i>	<i>Par ret 4</i>
Masse (g)	40g	40g	24g	18g

L'extraction a été faite par soxhlet dans un premier temps avec le n-hexane (500 ml) à chaud pendant 24 heure, après ce temps les solvants ont été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif sous pression réduite pour obtenir les différentes masses des extraits accompagnées de leur rendement. Les extraits de n-hexane sont ensuite dissous dans le méthanol chaud (60 ° C) et laisser refroidir à température ambiante de sorte que les produits insolubles cristallisent. Avec ce traitement, la partie insoluble dans le méthanol (Cires) et la partie soluble dans le méthanol froid (Hexane) sont obtenues pour chaque extrait de n-hexane.

Pour chaque extrait de n-hexane, la partie insoluble dans le méthanol a produit des Cires que l'on nommes Cire 1, Cire 2, Cire3 et Cire 4 et la partie soluble dans le méthanol a produit de l'hexane est nommée Hexane 1, Hexane 2, Hexane 3 et Hexane 4.

► Les échantillons des thalles lichéniques sont ensuite utilisés pour une seconde extraction par macération dans le chloroforme pendant 4 jours. Après filtration et évaporation nous avons obtenu les différentes masses des extraits chloroformiques avec leur rendement correspondant.

► Une troisième extraction a été effectuée par macération à Ethanol pendant 5 jours. Les extraits ont été filtré et évaporé afin d'obtenir les différentes masses des extraits éthanoliques avec leur rendement correspondant.



**Figure 30:** Extractions séquentielles effectuées sur *Parmotrema hypoleucinum*, *Physcia mediterranea*, *Parmotrema reticulatum*. (Marc= macéra).

Rendements massiques obtenus par l'extraction séquentielle par l'hexane, le chloroforme et l'éthanol ont été comparés.

Le rendement d'extraction a été déterminé de la manière suivante :

$$\text{rendement D' extraction totale\%} = \frac{\text{masse total de l'extrait}}{\text{masse lichénique}} \times 100$$

## Chapitre II Résultats et discussion de l'étude phytochimique

### 1. Rendement d'extraction

Les résultats que nous avons obtenus indiquent qu'à partir de la masse en poudre pour chacune des espèces lichéniques étudiée, *Parmotrema hypoleucinum* sur deux phorophytes différentes (*par hyp 1* (*Olea europea*) et *par hyp 2* (*Quercus coccifera*)), *Physcia mediterranea* (*phy med 3*) et *Parmotrema reticulatum* (*par ret 4*) nous disposons de trois extraits (hexane, chloroforme et éthanol) de polarités différentes pour chaque espèce et suite à une évaporation à sec des extraits. Nous avons remarqué que les contenus en composés lichéniques sont variables selon les espèces (**tableau 12**) et même au sein d'une même espèce selon le solvant utilisé.

Le rendement d'extraction est exprimé en pourcentage (%), il est calculé à partir du poids du résidu sec obtenu après évaporation sous vide et la prise d'essai initiale.

Les résultats de rendement d'extraction successive sont représentés dans le **tableau 12** et graphiquement dans la **figure 31**.

**Tableau 12** : Rendement d'extraction des différents extraits des espèces étudiées.

	<i>Parmotrema hypoleucinum</i> ( <i>par hyp 1</i> )	<i>Parmotrema hypoleucinum</i> ( <i>par hyp 2</i> )	<i>Physcia mediterranea</i> ( <i>phy med 3</i> )	<i>Parmotrema reticulatum</i> ( <i>par ret 4</i> )
Hyxane	1,65%	0,68%	4,28%	2,61%
Chloroforme	0.57%	0.49%	1.65%	0,66%
Ethanol	5,96%	6,04%	3,33%	14,71%

L'utilisation de solvants à polarité différentes permet de séparer les composés selon leur degré de solubilité, Elle permet tout d'abord avec l'hexane d'extraire les composés non polaires, tandis que le chloroforme vise à extraire les composés de polarité faible à intermédiaire. Finalement, l'éthanol permet de récupérer les produits très polaires.

Nous constatons, que les rendements massiques les plus faibles sont obtenus avec le chloroforme (solvant moyennement polaire). Et les plus élevés ont été trouvés par l'éthanol (solvant polaire), donc des pourcentages d'extractions différents ont été obtenus par les différents solvants.

En général, la masse sèche d'un organisme peut contenir entre 0,1 et 5 % de métabolites lichéniques (**Stocker-Wörgötter, 2008**). La technique d'extraction employée a donc été très efficace puisque, au total, pour les trois extraits bruts des espèces investigués, un pourcentage de 0.49 à 14.71 % de la masse sec du lichen a été extraite.

Les deux phorophytes (*par hyp 1*) et (*par hyp 2*) sont présentent des rendements massiques proches avec le chloroforme et l'éthanol, à l'exception de l'hexane le rendement le plus élevé étant celui de l'extrait brut de *par hyp 1*, on peu conclure que ce dernier est plus riche en composés apolaires que (*par hyp 2*).

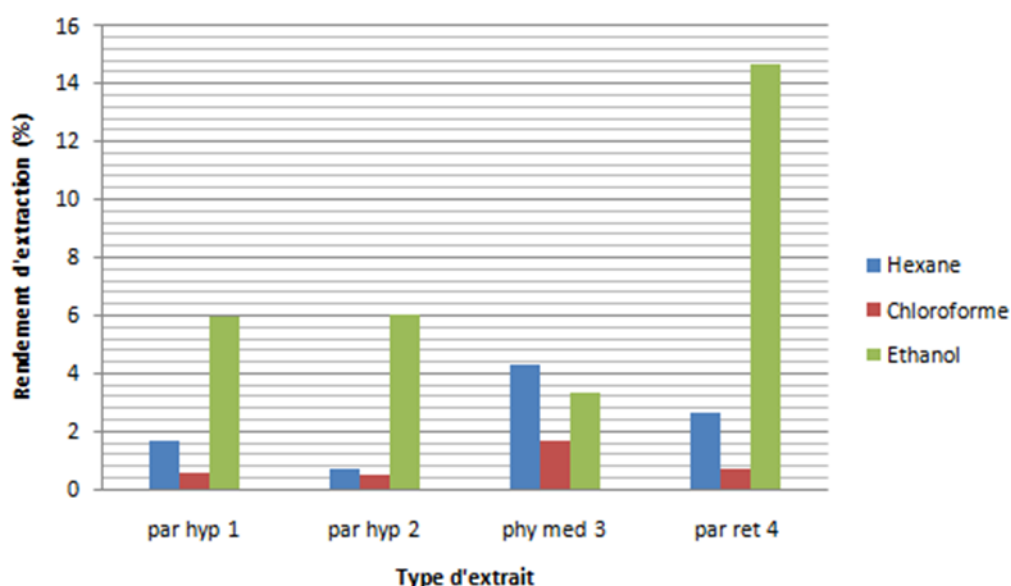
Pour ces deux phorophytes, les rendements massiques les plus faibles ont obtenus avec les solvants apolaires (hexane et chloroforme), et les plus élevés avec l'éthanol ; cela suppose que les deux phorophytes contiennent plus de composés polaires que de composés apolaires.

Les profils chimiques des extraits des deux phorophytes ont ensuite été comparés par analyse menée sur HPLC/ESIMS/MS et GCMS pour l'hexane, permettent d'établir une comparaison plus précise des profils phytochimiques.

Chez *Parmotrema reticulatum*, L'extraction à l'EeOH qui donne le meilleur résultat (14,71%) De plus, la proportion de composés fortement polaires semble importante chez ce lichen.

Selon Huneck et yoshimura, 1998, les solvants moyennement polaires ou non polaires sont considérés comme peu efficaces pour l'extraction des acides lichéniques. 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 ; Thi Huyen Vu, 2014). Ceci est cohérent avec nos résultats à l'exception de celui de *Physcia mediterranea* l'hexane donne le rendement le plus élevé par rapport à l'extrait éthanolique.

La différence de rendement noté dans notre étude est peut-être due à la composition chimique qui diffère d'une espèce à un autre, la teneur éventuelle en principe actifs, la nature du solvant utilisé et la technique d'extraction utilisée (Duraffourd et Lapraz, 2002).



**Figure 31:** Rendements massiques obtenus pour l'extraction successive par l'hexane, chloroforme et l'éthanol.

Afin d'apporter des informations supplémentaires sur la composition chimique et la diversité chimique des espèces étudiées des analyses plus approfondies sont appliquées sur des extraits préparés à partir des thalles lichéniques préalablement nettoyés et broyés seront détaillé dans les parties suivantes.

## 2. Profil phytochimique de *Parmotrema hypoleucinum* (J. Steiner) Hale collectée sur deux phorophytes différents :

*Parmotrema hypoleucinum* (J. Steiner) Hale, une espèce de la famille des Parmeliaceae récoltée dans le Parc Nationale D'El kala (Lac tonga -Secteur Brabtia) en Algérie, a été étudié afin de déterminer sa composition métabolique et ses empreintes chimiques. *P hypoleucinum* (J. Steiner) Hale a été récolté sur deux phorophytes différents, **Par hyp1** sur (*Olea europaea*) et **Par hyp 2** sur (*Quercus coccifera*).

Les métabolites secondaires de chaque échantillon de lichen ont été étudiés, par extraction séquentielle à l'hexane au Soxhlet pour les produits de faible polarité. La masse végétale de l'extraction précédente a été mise au chloroforme à température ambiante pour obtenir l'extrait chloroformique pour les produits de polarité intermédiaire et enfin elle a été extraite à l'éthanol à température ambiante pour l'extraction des produits à plus forte polarité.

L'extrait d'hexane de chaque échantillon (**Par hyp 1** et **Par hyp 2**) est dissous dans le méthanol chaud, le laisser se refroidir lentement pour obtenir les produits insolubles dans le méthanol froid. On sépare ainsi les produits insolubles dans le méthanol : **1-Cires** pour (**Par hyp 1**) et **2-Cires** pour (**Par hyp 2**) ; les produits solubles dans le méthanol froid : **1-Hexane** pour (**Par hyp 1**) et **2-Hexane** pour (**Par hyp 2**).

La séparation et l'analyse des composés chimiques de *Parmotrema hypoleucinum* ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (CG/MS) suivi par chromatographie liquide haute performance-ionisation électrospray couplée à une spectrométrie de masse-masse. (HPLC-ESI-MS-MS).

GC-MS pour l'analyse des composés volatiles, qui sont facilement séparés en fonction de leur pression de vapeur et de leur groupement fonctionnel (**Rouessac. F & Rouessac. A, 1997**), HPLC-ESI-MS-MS se fait sans estérification, Selon la littérature, l'analyse par HPLC est la mieux adaptée pour la séparation des constituants d'extraits bruts provenant de lichens (**Huneck & Yoshimura,1996**).

Electrospray orbitrap est apparu comme un outil très rapide et polyvalent pour l'identification rapide des substances lichéniques (**Castro et al, 2017**) car elles ont une apparence similaire et qu'il est difficile de les distinguer (**Jayalal,2013**).

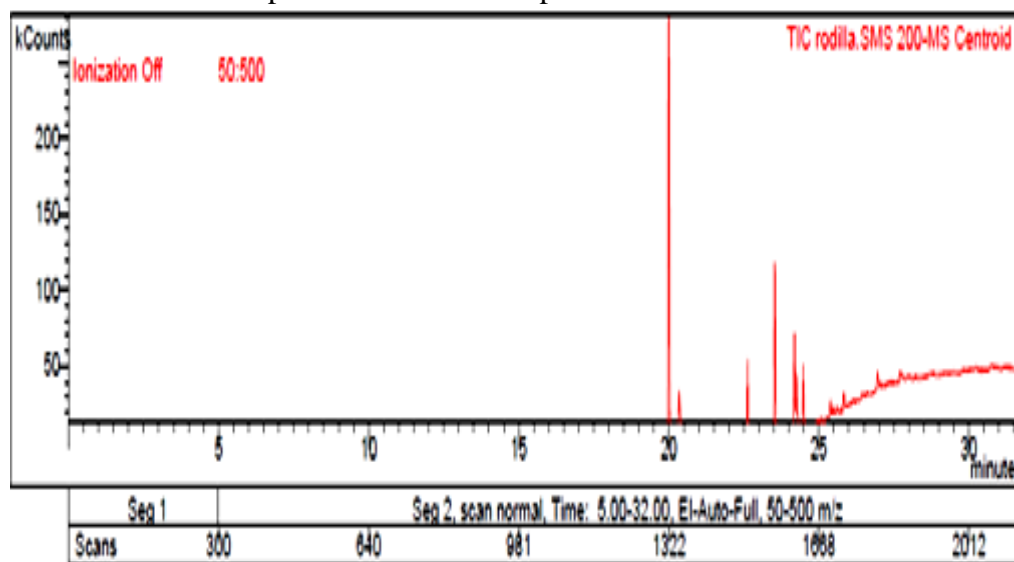
### 2.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique de *Parmotrema hypoleucinum* récoltée sur deux phorophytes différents par GC/MS

Initialement, une aliquote des échantillons 1-Hexane, 2-Hexane, 1-Cires et 2-Cires ont été estérifiées avec du diazométhane pour estérifier les groupes les plus acides des composés. Ces échantillons estérifiés ont été analysés par la suite par GC-MS pour identifier les composés de plus faible polarité.

### 2.1.1 Analyse chimique de l'extrait hexanique soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 1-Hexan et 2-Hexane de *Parmotrema hypoleucinum* récoltée sur deux phorophytes différents par GC/MS

A partir des données recueillies des chromatographes et des spectres de la spectrométrie de masse et après traitement des résultats, nous avons pu mettre en évidence **8 composés** chimiques dans l'extrait d'Hexane soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, **1-Hexane** de *Parmotrema hypoleucinum* (*Par hyp 1*).

Les composés identifiés avec leur temps de rétention (RT), la formule moléculaire, la masse moléculaire et le % spectre de masse sont présentés dans les **tableaux 13 et 14**.



**Figure 32:** Profil chromatographique de l'extrait d'Hexane soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 1-Hexane de *Parmotrema hypoleucinum* (*Par hyp 1*).

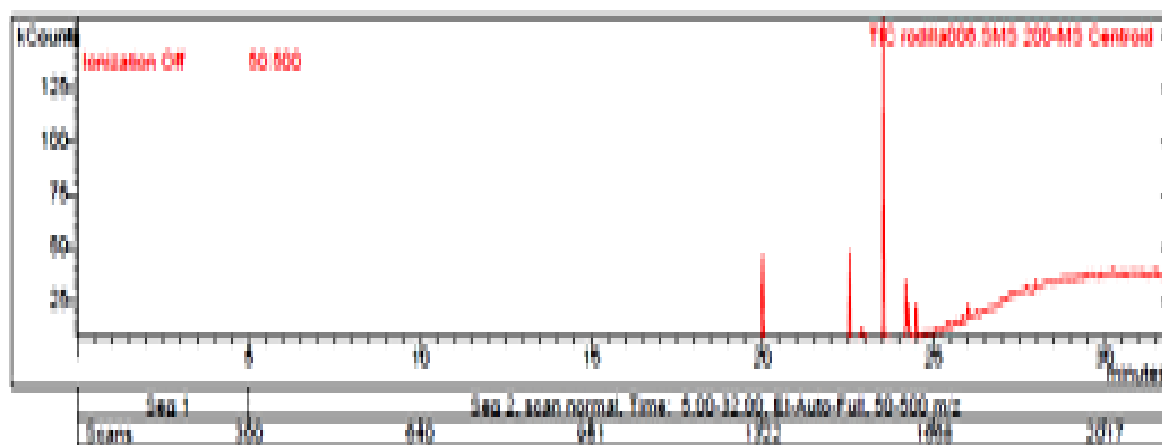
**Tableau 13 :** Composés chimiques de l'extrait d'Hexane soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 1-Hexane de *Parmotrema hypoleucinum* (*Par hyp 1*) par (GC-MS)

No	(RT)	Composés identifiés	Masse	(%)	Formule moléculaire
1	19:84	Methyl 4-hydroxy-2-methoxy-3, 5,6-trimethylbenzoate	224	0.5	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>
2	20 :00	Methyl 2,4-dihydroxy-3, 5,6-trimethylbenzoate	210	62.4	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
3	20 :34	Methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate (Atraric acid)	196	8.6	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
4	22 :63	Methylhexadecanoate (acide Palmitique)	270	5.3	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
5	23 :53	13-methyl-17-norkaur-15-ene (hibaene)	272	10.1	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>
6	24 :19	Methyl 9,12-octadecadienoate (acide linoléique)	294	4.2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
7	24 :25	Methyl (Z)-9-octadecenoate (acide oleique)	296	2.1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
8	24 :48	Methyloctadecanoate (acide stearique)	298	3.6	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O
9	25 :39	Non udentifié	288	0.8	—

L'extrait 1-Hexane est constitué majoritairement de l'acide Methyl 2,4-dihydroxy-3, 5,6-trimethylbenzoate (62.04 %) ,13-methyl-17-norkaur-15-ene (hibaene) (10.1%),acide Atrarique (8.6%), acide palmitique (5.3%), linoléique(4.2%), stéarique (3.6%), oléique (2.1%),et un composé non identifié(0.8%) (**figure 32 et tableau 13**).

**D'après notre recherche bibliographique jusqu'à ce jour aucune étude n'a été accomplie sur la composition chimique de l'extrait hexanique de l'espèce *Parmotrema hypoleucinum*.** Cependant d'autres espèces du même genre tel que *P. robustum* (Degel.) Hale et *P. andinum* (Mull. Arg.) Ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques (**Benitez et al. 2017**).

Pour l'analyse chimique de l'extrait d' Hexane soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, **2-Hexan** de *Parmotrema hypoleucinum* (**Par hyp 2**), 6 composés ont été identifiés, le composé majoritaire est le 13 -méthyl-17 -norkaur-15- ene avec un pourcentage (36.7%),suivi par l'acide palmitique (2.8%), l'acide phénolique 2,4-dihydroxy-3,5,6-triméthylbenzoïque (2.5%), l'acide stéarique(1.4%) ,l'acide linoléique(1.2%) et l'acide oléique (1.0%) (**figure 33 et tableau 14**).



**Figure 33:** Profil chromatographique de l'extrait d' Hexane soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 2-Hexan de *Parmotrema hypoleucinum* (Par hyp 2)

**Tableau 14 :**Composés chimiques de l'extrait d' Hexane soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 2-Hexan de *Parmotrema hypoleucinum* (Par hyp 2) par (GC-MS)

N°	RT	Composés identifiés	Masse moléculaire	%	Formule moléculaire
1	20 :01	Methyl 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoate	210	2.5	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
2	22 :55	Methylhexadecanoate (acide palmitique)	270	2.8	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
3	23 :54	13-Methyl-17-norkaur-15-ene	272	36.7	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>
4	24 :19	Methyl (Z, Z)-9,12-octadecadienoate (acide linoléique)	294	1.2	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
5	24 :23	Methyl (Z)-9-octadecenoate (acide oleique)	296	1.0	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
6	24 :38	Methyloctadecanoate (acide stearique)	298	1.4	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>

Le composé identifié comme Hibaene (13-methyl-17-norkaur-15-ene) est le produit avec un temps de rétention de 23:53 en GC-MS, son spectre de masse montre l'ion moléculaire à m/z 272 et provient de la déshydratation de l'alcool (-) - ent - Kauran-16 $\alpha$ -ol dans la source d'ionisation du spectromètre de masse, donc le produit naturel doit être l'alcool (-) - ent - Kauran-16 $\alpha$ -ol.

Dans l'extrait 2-Hexane de *P. hypoleucinum* sur (*Quercus coccifera*), on a détecté un nombre inférieur de composants et tous ont été identifiés dans l'extrait **1-Hexane de *P. hypoleucinum*** sur (*Olea europaea*). **Les acides gras les plus importants dans les deux extraits (1-Hexane et 2-Hexane) ont été identifiés comme étant les acides palmitique, linoléique, oléique et stéarique (Tableau 14).** Le composé phénolique 2, 4 dihydroxy-3, 5,6-triméthylbenzoïque et l'acide (-) - ent-16 $\alpha$ -Kauran-ol alcool sont également identifiés dans les deux échantillons, le **1-hexane** et le **2-Hexane**. Seuls dans l'échantillon **1-Hexane ont été identifié** : l'acide 4-hydroxy-2-méthoxy-3, 5,6-triméthylbenzoïque et l'acide 2,4-dihydroxy-3,6-diméthylbenzoïque.

**Tableau 15** : Composés en communs de l'extrait 1-Hexane et 2-Hexane de *P.hypoleucinum* collecté sur différents substrats : *Olea europaea* et *Quercus coccifera*

Composés communs	(%) Sur différents phorophytes	
	<i>Olea europaea</i> (1-Hexane)	<i>Quercus coccifera</i> (2-Hexane)
Methyl 2,4-dihydroxy-3, 5,6 triméthylbenzoate	<b>62.04</b>	2.5
Acide palmitique	5.3	2.8
13-Methyl-17-norkaur-15-ene	10.1	36.7
Acide linoléique	4.2	1.2
Acide oléique	2.1	1.0
Acide stéarique	3.6	1.4
Totale	87.34%	45.6%

D'après l'identification et l'évaluation de la production de métabolites secondaires du lichen épiphyte *Parmotrema hypolecinum* collecté sur différents substrats : *Olea europaea* et *Quercus coccifera*, nous constatons **un contenu en acides gras élevé chez l'espèce *P.hypoleucinum* sur *Olea europaea***, de même pour les dérivés de méthylbenzoate (Methyl 2,4-dihydroxy-3, 5,6 triméthylbenzoate) (62.04 % , **tableau 15**), **mais des quantités beaucoup plus faibles pour l'alcool**, 13-Methyl-17-norkaur-15-ene (10.1%) par rapport à *P.hypoleucinum* sur *Quercus coccifera*.

Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux scientifiques rapportés sur l'étude comparative des composés chimique de *Ramalina lacera* récoltée sur différents substrats (*Crataegus Sinaicus*, *Pinus Halepensis* et *Quercus Calliprinos*) dont l'analyse par GC/MS a montré la présence des acides gras en quantité variable dans les trois substrats (**Lumir et al., 2008**).

Parmi les acides gras identifiés : l'acide palmitique et l'acide oléique, ce sont souvent les acides gras les plus abondants chez les algues brunes et les algues rouges (**Tasende., 2000**), il semble probable que le photobionte du lichen synthétise ces acides (**Torres et al., 2003**).

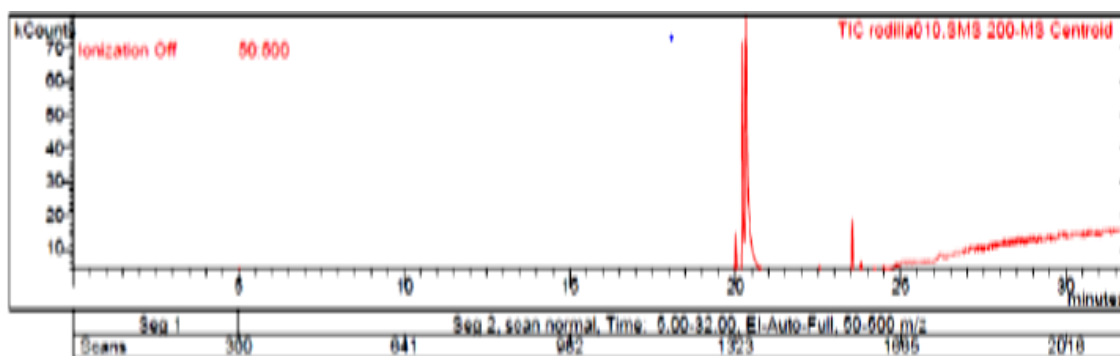
Les acides gras saturés tels que l'acide palmitique et l'acide stéarique qui sont présents dans notre espèce étudiée, sont synthétisés naturellement dans les champignons et étant donné que les lichens contiennent environ 90% de mycobiote, ces résultats concordent.

Les acides gras qui ont été détectés dans l'extrait hexanique de *Parmotrema hypoleucinum* sur les 2 phorophytes ont montré un effet antioxydant remarquable, tels que : l'acide linoléique, l'acide oléique, l'acide palmitique (Habibi Tirtash et al, 2011) ; également l'acide linoléique et l'acide oléique ont inhibé l'activité de plusieurs champignons pathogènes : *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pyrenophora avenae* et *Crinipellis perniciosus* (Walters et al., 2004).

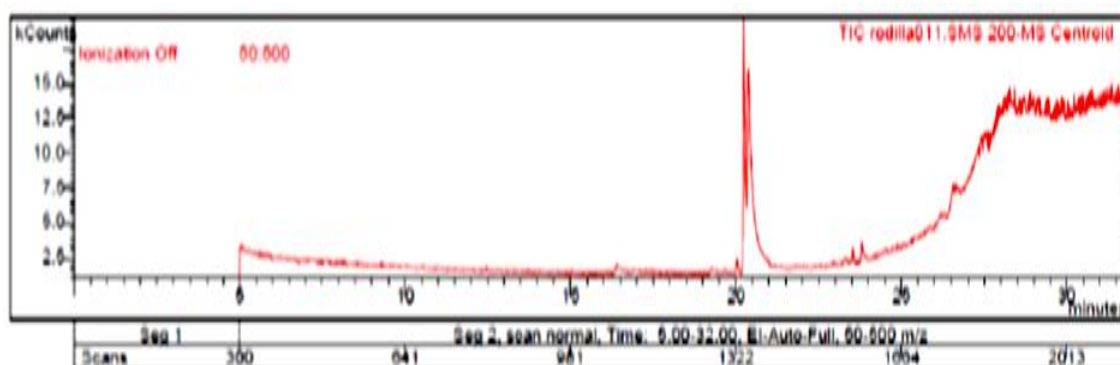
Le dérivé d'acide méthylbenzoïque (Methyl 2,4-dihydroxy-3, 5,6 triméthylbenzoate) est un composé majoritaire de (Par hyp 1) avec un taux 62.4%, il est couramment présent dans différentes espèces lichéniques : *Stereocaulon halei* (putra et al 2020), *Parmotrema mesotropum* (Mallavadhani et al, 2019), *Cassipourea malosana* (Nishiyama et al, 2019) , *Cetraria islandica* (Vladimirova et Georgiyants, 2013), *Usnea longissima* (Akbar, 2020), *Stereocaulon paschale* (Carpentier et al 2017) et *Parmelia sulcata* Taylor (Ari et al, 2015).

### 2.1.2 Analyse chimique de l'extrait hexanique insoluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 1-Cire et 2-Cire de *Parmotrema hypoleucinum* récoltée sur deux phorophytes différents par GC/MS.

Les figures 34 et 35 représentent le profil chromatographique de l'extrait d'hexane, la partie insoluble dans le méthanol, 1-Cire et 2-Cire de l'espèce *Parmotrema hypoleucinum* sur *Olea europaea* (Par hyp 1) sur *Quercus coccifera* (Par hyp 2)



**Figure 34:** Profil chromatographique de l'extrait d'Hexane insoluble dans le MeOH estérifié au diazométhane, 1-Cire de *Parmotrema hypoleucinum* (Par hyp 1).



**Figure 35:** Profil chromatographique de l'extrait d'Hexane insoluble dans le MeOH estérifié au diazométhane, 2-Cire de *Parmotrema hypoleucinum* (Par hyp 2).

Les résultats de l'analyse de la composition chimique de l'extrait hexanique 1-Cire et 2-Cire de l'espèce *Parmotrema hypoleucinum*, par Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à spectrométrie de masse sont présentés dans les **tableaux 16 et 17**.

**Tableau 16** : Composés chimiques de l'extrait d' Hexane insoluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 1-Cire de *Parmotrema hypoleucinum* (Par hyp 1) par (GC-MS)

N°	RT (min)	Nom du composé	Masse moléculaire	%	Formule moléculaire
1	20:02	Methyl 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoate	210	1,1	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
2	20:21	Methyl 4-hydroxy-2-methoxy-3,6-dimethylbenzoate (acide 2-méthoxy-atrarique)	210	26,6	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
3	20:33	Methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate (acide atrarique)	196	38,9	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
4	22:51	Non identifié	312	0,9	—
5	22:51	13-Methyl-17-norkaur-15-ene (-) - ent-16 $\alpha$ -Kauran-ol alcool)	272	1,8	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>

**Tableau 17** : Composés chimiques de l'extrait d' Hexane insoluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane, 2-Cire de *Parmotrema hypoleucinum* (Par hyp 2) par (GC-MS).

N°	RT (min)	Nom du composé	Masse moléculaire	%	Formule moléculaire
1	20 :24	Methyl 2,4-dihydroxy-3, 5,6-trimethylbenzoate	210	0,9	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
2	20 :35	Methyl 2,4-diméthoxy-6-méthylbenzoate	210	41,4	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
3	20 :38	Methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate (acide atrarique)	196	48,9	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>

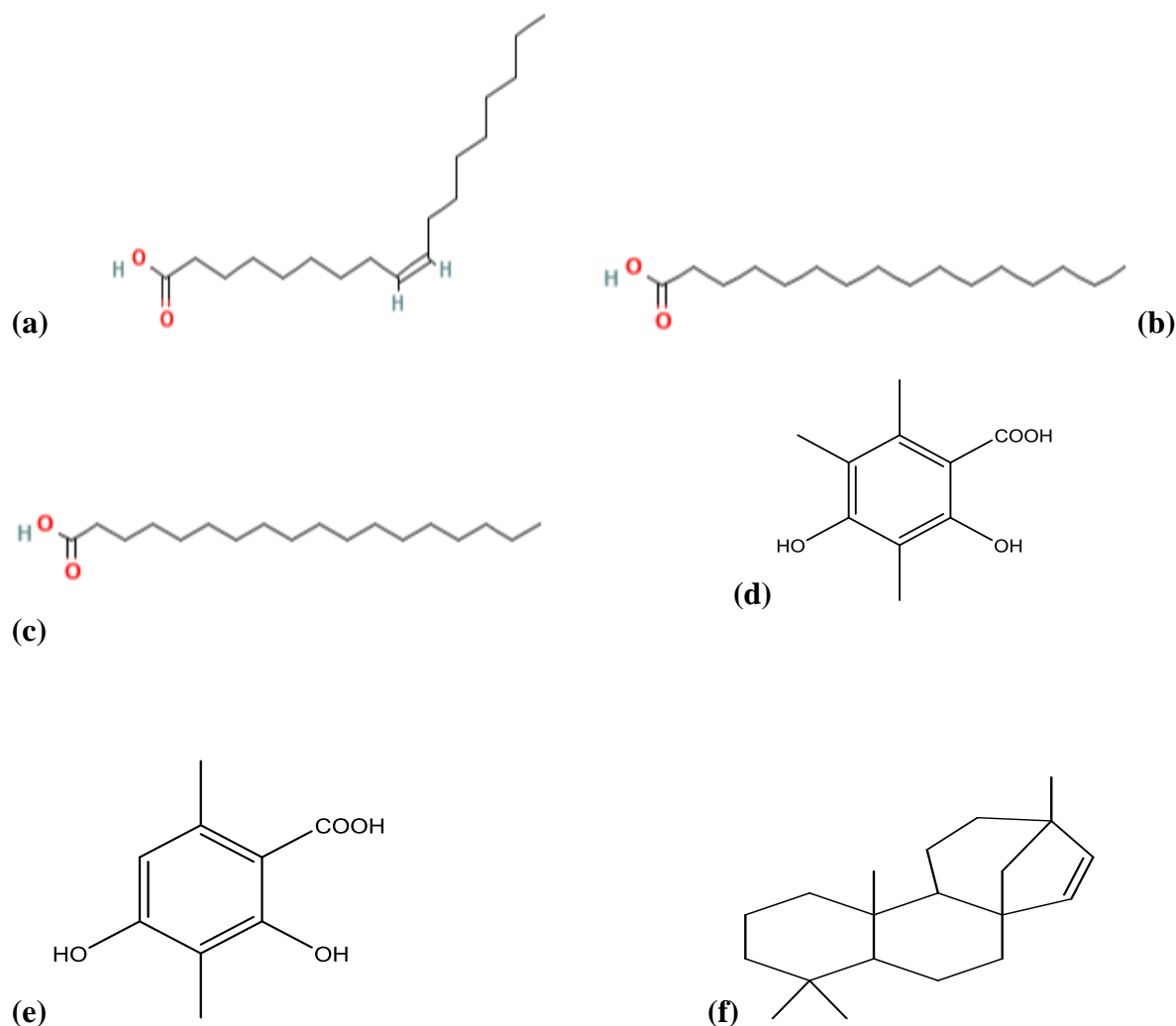
Pour les fractions obtenues par cristallisation de l'extrait hexane dans le méthanol, l'extrait **1-Cire** et l'extrait **2-Cire** sont estérifiés par diazométhane et analysés par GC-MS.

Dans l'extrait 1-Cire, nous avons détectés **5 composés**, dont 4 sont **identifiés** et 1 composé n'a pas été identifié (**NI**), ce produit n'apparaît pas dans l'extrait 2-Cire. L'alcool kaurène-squelettique se trouve dans l'extrait 1-Cire (1,8%) et n'a pas été trouvé dans l'extrait 2-Cire. Sur les 3 autres composés, deux ont été identifiés dans l'extrait 1-Cire et l'extrait 2-Cire avec des pourcentages variable : l'acide 2,4-dihydroxy-3, 5,6-triméthylbenzoïque (1,1%,0,9%) et l'acide atrarique (38,9%,48,9%).

Dans l'extrait 1- Cires, l'acide 4-hydroxy-2-méthoxy-3,6-diméthylbenzoïque (26,6%) est également identifié et ce produit n'apparaît pas dans l'extrait 2-Cires, à la place l'acide 2,4-diméthoxy-6- méthylbenzoïque (41,4%) apparaît dans l'extrait 2-Cire.

L'ester méthylique de l'acide-orinolcarboxylique (acide atrarique) était le composé monoaromatique le plus abondant chez les deux extraits, ces résultats sont en accord avec des

résultats publiés précédemment ont montré que les extraits acétoniques d'*Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* et *Parmelia sulcata* sont caractérisés par la présence d'**acide atrarique** comme un **composé majoritaire** (Stojanovic et al., 2011), le cas inverse pour le dérivée benzoïque (methyl 2,4-dihydroxy-3, 5,6-trimethylbenzoate).



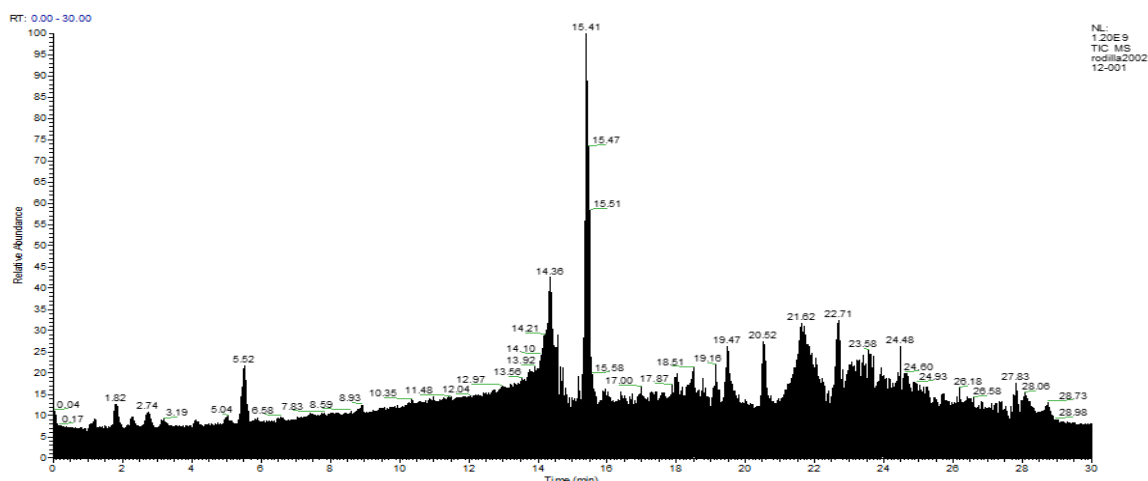
**Figure 36:** Structure chimique de quelques composés en commun dans *P. hypoleucinum* (1 et 2) [(a) acide oleique,(b) acide palmitique,(c) acide stearique,(d) acide methyl 2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylbenzoate,(e) acide atrarique et (f) 13-methyl-17-norkaur-15-ene]

## 2.2. Analyse chimique de l'extrait hexanique de *Parmotrema hypoleucinum* collectés sur deux phorophytes différents par HPLC-MS/MS :

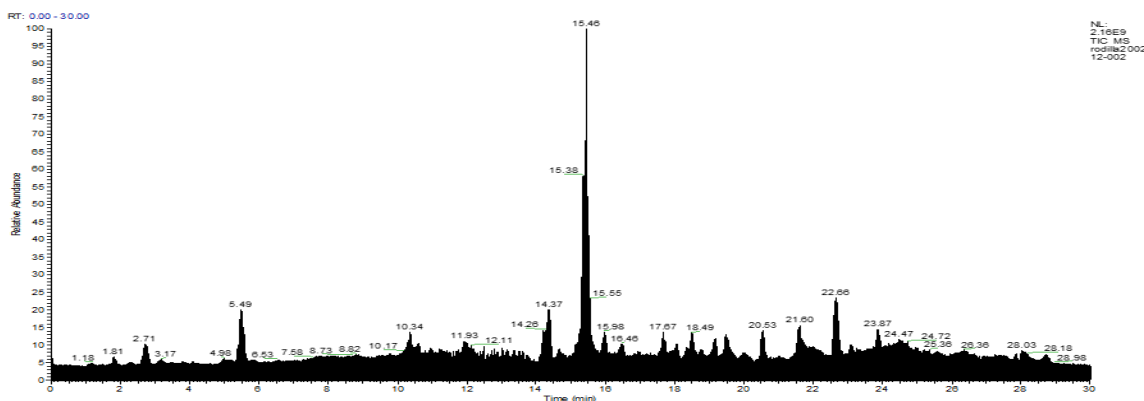
### 2.2.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique soluble dans le MeOH 1-Hexane et 2-Hexane de *Parmotrema hypoleucinum* collectés sur deux phorophytes différents par HPLC-MS/MS

Dans l'analyse par HPLC-ESI-MS/MS des fractions **1-Hexane** et **2-Hexane** de *P. hypoleucinum*, **95** métabolites ont été détectés dans la fraction **1-Hexane**, dans laquelle nous avons proposé **78** structures et **16** non identifiées (NI). **91** métabolites ont été trouvés dans la fraction **2-Hexane** dont nous avons proposé **78** structures et **13** NI.

Les figures 37 et 38 présentent les chromatogrammes HPLC qui ont permis de réaliser cette analyse et identification des composés indiqués, ces résultats sont également présentés dans le tableau 18.



**Figure 37:** Chromatogramme de l'extrait d'Hexane soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 1 – Hexane de *Parmotrema hypoleucinum*.

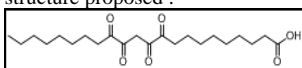
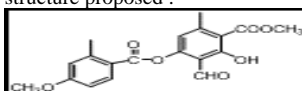
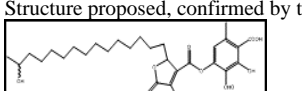


**Figure 38:** Chromatogramme de l'extrait d'Hexane soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 2 – Hexane de *Parmotrema hypoleucinum*.

**Tableau 18** :Identification des substances lichéniques de l'extrait d'hexane soluble dans le MeOH de *Parmotrema hypoleucinum*, (*Olea europea*), 1-Hexane et (*Quercus coccifera*), 2-Hexane

Pics	RT (min)	[M- H]- (m/z)	MT (m/z)	Formule moléculaire	Formule moléculaire	Composés identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)
				<b>1-Hexane</b>	<b>2-Hexane</b>		
1	2.67	181.0502	182,0574	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	<b>3-Methylorsellinic acid</b>	<b>167.9040 152.9167 137.0598</b>
2	2.72	187.0970	188,1043	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	3,5-dimethoxycyclohexanecarboxylic acid	143,8651 141,867 123,0807
3	2.75	293.0669	294,0741	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	6-(hydroxymethyl)-3,5 bis(methoxycarbonyl)-2,4-dimethylcyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	249.0771 234.0530 207.0659
4	3.08	243.1239	244,1311	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	3,5,6-hydroxymethyl-2,4-dimethylcyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	236.7610 183.1025 176.6474
5	3.15	151.0393	152.0465	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	<b>Atranol</b>	<b>123.0444 105.0335 81.0335</b>
6	3.20	225.1129	226.1201	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	5-Formyl-3-hydroxymethyl-2,4,6-trimethylcyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	110.0362 97.0284 207.1023
7	3.47	199.0973	200.1046	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	3,5-Dihydroxy-2,4,6-trimethylcyclohexanecarboxylic acid	
8	3.55	195.0660	196.0730	-----	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	3,5-diMethylorsellinic acid	160.8414 151.0759 109.0649
9	3.58	149.0237	150.0310	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	4-Formylbenzoic acid	90.9224 106.9892 91.9303
10	3.82	241.1081	242.1153	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	5-Formyl-3,6-dihydroxymethyl-2,4-dimethylcyclohex-1-enecarboxylic acid	218.8167 172.6485 69.0333
11	4.10	201.1129	202.1202	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	2,4-Dihydroxy-3,5,6-trimethylcyclohexane-1-carboxylic acid	164.8350 197.6263 139.1124
12	4.95	199.1337	200.1409	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	2-Hydroxy-10-undecenoic acid	162,8384 164,8355
13	5.00	185.0006	186.0079	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> C <sub>1</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> C <sub>1</sub> O <sub>3</sub>	<b>Chloroatranol</b>	<b>141.8674 159.8779</b>
14	5.10	213.1130	214.1203	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	2-Undecenedioic acid	140.9478 124.9796 104.4180
15	5.21	169.0863	170.0936	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	4-Hydroxy-2,5-dimethylcyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	
16	5.49	163.0392	164.0470	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	<b>p-Coumaric acid</b>	<b>65.0022 77.0386 119.0494 166,2639</b>
17	5.60	209.1181	210.1253	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	6-(1-Oxopentyl)-1-cyclohexene-1-carboxylic acid	146,9850 164,8947 105,0336
18	5.87	215.1286	216.1359	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Undecanedioic acid	
19	6.57	227.1288	228.1360	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	trans-Dodec-2-enedioic acid	
20	7.44	282.2078	283.2150	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	N-Dodecanoyl-L-Homoserine lactone	139,1121 183,1027 238,2175
21	7.67	329.2336	330.2252	-----	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	9,10-dihydroxy-8-oxo-12-octadecenoic acid	171,1021 211,1337 139,112
22	7.77	209,0817	210,0889	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	3,4-dimethoxyhydrocinnamic acid	122,0363 150,0678
23	8.70	373,1294	374,1366	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>7</sub>	4-O-demethyldivaricic acid	177,0188 195,0295 151,0393
24	9.01	253,1809	254,1882	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	9-hydroxy-10,12-pentadecadienoic acid	69,0335 57,0334
25	9.53	243,1601	244,1675	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	Tridecanedioic acid	183,1025 146,9606 118,9653
26	10.13	359,1139	360,1211	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	<b>Barbatic acid</b>	<b>151,0393 163,0394</b>
27	10.30	375,1086	376,1159	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	8-hydroxybarbatic acid	163,0392 167,0342 149,0236 325,0715
28	10.35	373,0931	374,1001	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	Baeomycesic acid	177,0188 195,0295 151,0393 123,0442
29	10.59	311.2230	312.2302	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	9Z-Octadecenedioic acid	--
30	10.77	351,2178	352,2256	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>5</sub>	Structure proposed 	--
31	10.87	233.1547	234.1619	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	Fukinanolide	101,0039
32	10.89	323.2230	324.2303	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	allo-Protolichestrinic acid	305,2125 261,2225
33	10.91	411,0045	412,0118	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> C <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> C <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	leoidin	293,9857 308,0008 351,9911 375,0272
34	10.91	396,9888	397,9961	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> C <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> C <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	lecideoidin	320,9729
35	11.49	403,1399	404,1473	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	4'-O-demethylsekikaic acid	227,144 177,1279
36	12.28	313,2388	314.2266	-----	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	Octadecanedioic acid	
37	13.00	269,2124	270,2195	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	2-oxopalmitic acid	251,2017 155,1071 171,1022
38	13.04	389.1245	390.1315	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	8-Hydroxydiffractaic acid	163,0393 149,0236 325,0719
39	13.34	293.2124	294.2202	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	2-Hydroxylinolenic acid	277,1021 235,171 195,1383
40	13.58	291.1968	292.2041	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	α-Licanic acid	--

Partie III Etude Phytochimique & Activité Antioxydante Des Espèces Etudiées

41	14.38	295,2279	296,2351	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	2-Hydroxylinoleic acid isomer	—		
42	14.39	455,1711	456,1783	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	glomelliferonic acid	281,0822	352,1681	367,1913
43	14.40	295,2278	296,2352	-----	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	18-Hydroxylinoleic acid	277,218	254,0209	171,1021
44	14.68	321,2437	322,2509	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	Hydroxyeicosatrienoic acid	209,197	57,0335	69,0334
45	14.95	305,2125	306,2197	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	14-oxo-7,10,12-nonadecatrienoic acid	261,2225	111,0805	177,1643
46	15.19	297,2436	298,2508	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	9-Oxooctadecanoic acid	171,102	155,1069	279,2333
47	15.25	295,2280	296,2351	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	Coriolic acid	155,144	125,097	251,2403
48	15.36	297,2435	298,2508	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	Ricinoleic acid	171,102	279,2333	155,1069
49	15.42	373,0925	374,0999	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	<b>Atranorin</b>	<b>163,0393</b>	<b>119,0493</b>	<b>177,0187</b>
50	15.43	177,0187	178,0259	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	6,7-Dihydroxycoumarin	68,9971		
51	15.44	277,2536	278,2610	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O	7,10,12-nonadecatrien-1-ol	—		
52	15.46	365,2330	366,2403	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	Muronic acid	277,2536	57,0334	251,8486
53	15.70	277,2538	278,2612	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Linolenic acid			
54	15.98	367,2488	368,2562	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	murolic acid	263,2379	277,2545	295,2652
55	16.16	311,2594	312,2667	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	Lichesterylic acid	183,0116	96,959	216,0092
56	16.29	461,2550	462,2619	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	Non identifié			
57	16.37	471,3481	472,3553	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Non identifié			
58	16.45	381,2282	382,2356	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	praesorediosic acid	339,3658	293,2499	71,049
59	16.47	210,9834	211,9873	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> C <sub>1</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> C <sub>1</sub> O <sub>4</sub>	7-chloro-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran -5- carboxylic acid.	—		
60	16.47	381,2285	382,2355	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	19-acetoxy-protolichesterinic acid	293,2499	59,0126	71,049
61	16.51	407,0540	408,0611	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> C <sub>1</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> C <sub>1</sub> O <sub>8</sub>	<b>Chloroatranorin</b>			
62	16.90	421,9285	422,9363	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> C <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> C <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	diploicin	353,2004	80,964	
63	16.97	201,1493	202,1564	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	11-hydroxyundecanoic acid	73,0284	99,9248	164,8356
64	16.97	385,2960	386,3032	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>5</sub>	Non identifié	—		
65	17.59	387,2544	388,2616	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	Non identifié	—		
66	17.68	389,1242	390,1314	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	Leprolomin	—		
67	17.69	395,2442	396,2520	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub>	-----	structure proposed : 	—		
68	17.80	357,0983	358,1057	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	structure proposed : 	—		
69	17.97	449,3276	450,3354	C <sub>35</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	Non identifié	—		
70	18.04	253,2173	254,2244	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Palmitoleic acid	83,0494	110,9479	145,869
71	18.33	241,2172	242,2245	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Pentadecanoic acid			
72	18.35	455,3531	456,3605	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	<b>Ursolic acid</b>	<b>352,1682</b>		
73	18.50	279,2330	280,2403	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	<b>Linoleic acid</b>	<b>96,9591</b>	<b>208,467</b>	
74	18.66	299,2595	300,2667	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	2-Hydroxyoctadecanoic acid	59,0127		
75	18.78	279,2332	280,2403	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Linoleic acid isomer, cis,trans	—		
76	19.03	497,2548	498,2626	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	-----	superpicrolicenic acid	—		
77	19.16	255,2329	256,2401	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	<b>Palmitic acid</b>	<b>158,1438</b>	<b>174,6323</b>	
78	19.49	281,2485	282,2559	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	<b>Oleic acid</b>	<b>96,959</b>	<b>235,1344</b>	<b>213,5261</b>
79	19.62	269,2488	270,2561	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	15-Methylhexadecanoic acid	230,4065	182,5247	143,8039
80	19.89	269,2488	270,2561	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Heptadecanoic acid	98,9549	235,744	187,0438
81	19.99	483,3481	484,3553	C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Non identifié	—		
82	20.07	327,2543	328,2616	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>	2-Hydroxyeicosanoic acid	255,233	89,0233	
83	20.17	473,2548	474,2626	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	Non identifié	—		
84	20.54	283,2643	284,2716	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	<b>stearic acid</b> (octadecanoic acid)	<b>227,2842</b>	<b>194,5713</b>	<b>261,6109</b>
85	20.74	309,2801	310,2875	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	Eicosenoic acid	96,959	122,9747	
86	21.02	441,3377	442,3448	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	Unidentified	—		
87	21.14	297,2801	298,2873	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	Nonadecanoic acid	169,0864	125,0963	
88	21.70	311,2957	312,3029	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	(Eicosanoic acid) Arachidic acid	—		
89	22.02	597,4164	598,4242	C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub>	-----	Non identifié	—		
90	22.02	669,4739	670,4817	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>7</sub>	-----	Non identifié	—		
91	22.02	545,2758	546,2836	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	Structure proposed, confirmed by the ions 	—		
92	22.52	579,2368	580,2446	C <sub>36</sub> H <sub>36</sub> O <sub>7</sub>	-----	Non identifié	—		
93	22.66	753,4057	754,4135	C <sub>37</sub> H <sub>62</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>37</sub> H <sub>62</sub> O <sub>14</sub>	Non identifié	—		
94	22.68	637,4841	638,4908	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>	Non identifié	—		
95	22.69	751,4779	752,4857	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>9</sub>	Non identifié	—		
96	23.78	603,3334	604,3412	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	Non identifié	—		
97	23.81	633,3798	634,3876	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> O <sub>7</sub>	-----	Non identifié	—		
98	24.12	467,4109	468,4187	C <sub>30</sub> H <sub>56</sub> O <sub>4</sub>	-----	12-Triacontenedioic acid	—		
99	24.51	605,3483	606,3561	C <sub>37</sub> H <sub>50</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>37</sub> H <sub>50</sub> O <sub>7</sub>	Non identifié	—		

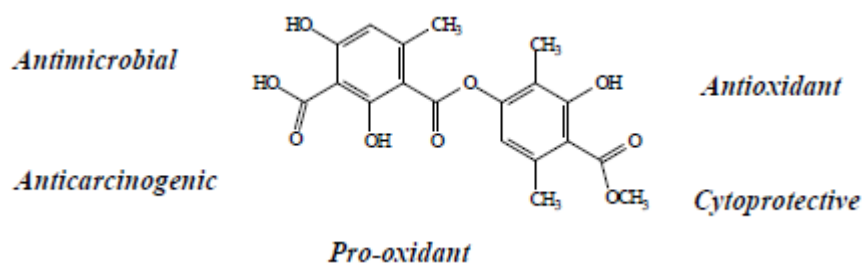
Parmi ces produits, **73 composés** en communs qui ont été identifiés pour la première fois dans un extrait hexanique à l'aide d'UHPLC-ESI-MS-MS en mode négatif, les produits les plus caractéristiques des lichens dans les deux fractions (*Par hyp 1* et *Par hyp 2*) sont : acide 3-méthylorsellinique, atranol, acide 4 formylbenzoïque, chloroatranol, p-coumarique acide, atranorine et chloroatranorine. (**Pics 1, 5, 9, 13, 16,49 et 61**).

**L'acide 3-méthylorsellinique** (Hydroxybenzoic acid derivatives) a été isolé chez *Parmotrema stuppeum* par (**Jayaprakasha et Rao, 2000**), en 1928 a été identifié à l'origine comme un produit de dégradation de l'acide barbatinique (**St. Pfau , 1928**). **Rao et al., 1967** ont mentionnés que l'acide 3-méthylorsellinique est une sous-unité importante de divers dépôts trouvés dans les lichens et en 1976 l'acide 3-méthylorsellinique a été isolé en tant que co-métabolite de son dimère, l'acide 4-O-déméthylbarbatique et l'asterriquinone à partir d'*Aspergillus terreus* par des chercheurs de l'Université de Kanazawa, Japon.( Yamamoto et al., 1976) ; a été aussi considéré comme un standard utile pour la déplication des métabolites secondaires fongiques (**Nielsen et al., 2011**). Une étude a démontré son activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* dans le test MIC (**Rabelo et al., 2012**)

**Atranol, Chloroatranol et Chloroatranorine** (dérivés de l'acide benzoïque) ont été isolé par **Marante et al en 2003**, ont pu inhiber la prolifération d'U937 et lignées cellulaires de leucémie monocyttaire HL-60, a été également démontré que ces mêmes composés avaient une activité antioxydante.

Il est intéressant de noter que la chloroatranorine est considéré comme étant un composé allergène habituellement présent dans les extraits de mousse de chêne (*Evernia prunastri*) (**Joulain and Tabacchi, 2009**).

**Le pic 49** présente l'**Atranorin** est un composé important du groupe des depside, Il a été identifié comme étant le 3-hydroxy-4-méthoxycarbonyl-2,5-diméthylphényl-3-formyl-2,4-dihydroxy-6-méthylbenzoate (**Goel et al., 2011**) .



**Figure 39:** Structure de l'atranorin et activités biologiques

Il a été présent dans diverses espèces de lichens, parmi lesquelles *Cladina kalbii*, *Lethariella canariensis*, *Hypotrachyna revoluta* et *Usnea articulata* (**Marante et al., 2000; Santos et al., 2011; Ranković et al., 2014; Tzakou et al., 2007**). Il possède également plusieurs propriétés biologiques telles que l'activité antimicrobienne (**Papadopoulou et al., 2007**), anticancérigène, antioxydante (**Kosanić et al., 2014**), cytoprotectrice et pro-oxydante (**Melo et al., 2011**) (**figure39**).

**Ivanova et al., 2010** ont confirmé que l'atranorin isolé de *Parmelia subrudecta* est un puissant inhibiteur des bactéries *Staphylococcus aureus* multi résistantes, également actif

contre *Bacillus subtilis*. En 2017, **Rui Zhoulet al** ; démontré pour la première fois que l'atranorin a une activité inhibitrice contre la motilité des cellules cancéreuses du poumon.

Une étude a révélé que l'atranorin, isolé de *Parmelia tinctorium*, s'est avéré agir comme un découpleur de la phosphorylation oxydative sur les mitochondries du foie de souris, cette action a été attribué à ses propriétés de lipophilie et d'activité protonophore. La même étude a montré que l'atranorine n'exerçait pas d'action stimulante sur l'activité ATPase. Ces résultats suggèrent que l'atranorin peut être une piste potentielle pour la recherche et le développement d'agents actifs contre les maladies infectieuses et le stress oxydatif induit par les radicaux libres (**Khatwa, 1996**).

Le **composé 9** a été identifié comme étant de l'**acide 4 formylbenzoïque**, Les ions de fragmentation observés à m/z 90,9224 106,9892 et 91,9303, il a été isolé et identifié pour la première fois chez *Physcia Mediterranea* Nimis (**kerboua. et al., 2021**).

En ce qui concerne l'**acide p-coumarique (pic 16)** une étude basée sur la GC/MS, montre que l'acide p-coumarique est un monomère et oligomère impliqué dans la biosynthèse de la cutine et de la subérine chez les plantes, qui agissent comme une barrière à l'entrée d'agents pathogènes, donc était fortement induits après l'inoculation du pathogène (Hamzehzarghani et al. 2008). La cutine est un polymère d'acides gras hydroxylés principalement en C16 et C18 (**Kolattukudy, 2005 ; Kumar et al., 2016**), tandis que les monomères de subérine ont des longueurs de chaîne dominantes de polymères aliphatiques en C16, C18 et C22 (**Kolattukudy et al., 1975**).

Malgré le manque d'études spécifiques sur *Parmelia*, l'évaluation des espèces de *Parmelia* en tant que sources de filtres UV pourrait être attendue dans un proche avenir, comme le suggère l'activité photoprotectrice rapportée pour des composés comme l'atranorine ou l'acide usnique, qui ont déjà été trouvés dans ce genre.

Dans le profil **des acides gras** on retrouve les acides suivants **communs aux 2 échantillons** : 2 hydroxy-10-undécénoïque, 2-undécènedioïque, undécanedioïque, trans-2dodécènedioïque, 9-hydroxy-10,12-pentadécadiénoïque, tridécanedioïque, 9Zoctadécènedioïque, 2-oxopalmitique, nonadécanoïque et arachidique. Parmi lesquelles, **5 acides gras sont nouvellement identifiés** pour les lichens à l'aide UHPLC-ESI-MS-MS en mode négatif et qui sont :

2 hydroxy-10-undécénoïque, 9-hydroxy-10,12-pentadécadiénoïque, tridécanedioïque, 2-oxopalmitique et un décanedioïque correspondants aux **pics 12, 24, 25, 37,18** (anion moléculaire à m/z respectivement : (199.1337, 253.1809, 243.1601, 269.2124, 215.1286). 9Zoctadécènedioïque, 2-undécènedioïque, trans-2-dodécènedioïque (traumatic acid) et nonadécanoïque correspondants aux pics 29,14, 19 et 87 (anion moléculaire à m/z 311.2230, 213.1130, 227.1288 et 297.2801) ont été détecté pour la première fois chez *Physcia Mediterranea* Nimis (**Kerboua et al., 2021**).

On retrouve, **les lactones** qui sont des **acides aliphatiques** qui résultent de l'aldolisation d'un alcanoyl-SCoA à longue chaîne avec une unité cétonique. (Limoge, 2015). Ont également été identifiées : N-dodécanyol-L homosérine lactone et fukinanolide (Sesquiterpene lactone).

D'autres dérivés tels que la léoïdine, la lécidoïdine, un alcool tel que le 7, 10,12-nonadécatriène-1-ol et un **acide triterpénique** identifié comme **l'acide ursolique**.

**N-dodécanoyl-L homosérine lactone** qui correspond au **pic 20** avec un ion  $[M - H]^-$  à  $m/z$  283.2150 est connue pour affecter la croissance et le développement des plantes à fleurs, y compris les cultures, et des algues marines. Ainsi, il est un rôle potentiellement important dans l'agriculture et l'aquaculture.

Les deux depsidones Leodine et lécidoïdine correspondent respectivement aux pics 33 et 34 ont donné les fractions 411,0045  $m/z$  et 396,9888  $m/z$ . Leodine a été isolé chez *Lecanora gangaleoides* Nyl. (Devlin et al., 1986) ; Lécidoïdine est isolé d'une espèce australienne de *Lecidea* (Douglas et al., 1979).

A notre connaissance **l'alcool 7, 10,12-nonadécatriène-1-ol, c'est la première fois que ce composé est détecté chez les lichens**. Son **pic 51** correspondrait à l'ion  $[M - H]$  à 277.2536  $m/z$ .

Le **pic 72** a été identifié comme **L'acide ursolique** (ion  $[M - H]^-$  à  $m/z$  456.3605), a inhibé la croissance des cellules de carcinome épidermoïde humain en affectant l'activité de la tyrosine kinase (Hollosoy et al., 2000). L'utilisation d'acide ursolique pour la fabrication d'un agent anticancéreux pour supprimer les métastases a été brevetée (Ishikawa et al., 1997).

Selon la littérature, Les acides aliphatiques, beaucoup plus rares dans les lichens que dans les végétaux, semblent se former de manière très différente au cours du cycle des acides tricarboxyliques.

Dans la comparaison des composés **polyphénoliques** caractéristiques des lichens dans ces deux échantillons, **15** composés ont été **identifiés** (pics :23, 26, 27, 28, 32, 35, 38, 42, 52, 54, 55, 58, 60, 62 et 66)

Le **pic 23** a été identifié comme étant **l'acide 4-O-déméthyldivaricatique**, a été signalé chez *Parmelia. Luteonotata*, *P. physcioides*, *P. pictada*, *P. pseudofatiscens*, *P. rigida* et *P. subverrucella* (Sharma et al., 2013).

Le **pic 26** a présenté un ion pseudomoléculaire à  $m/z$  360.1211, qui a produit des ions fragmentés à  $m/z$  151.0393 et 163.0394, et ainsi, a été identifié comme **l'acide barbatique**. Ces fragmentations sont similaires à celle rapportée par (Alfredo Torres-Benítez et al., 2017) dans *Parmotrema andinum*. L'acide barbatique est un depside important qui agit sur : la photosynthèse, photosystème II, antitumorale. (Manojlovic et al., 2010), inhibe les réactions non redox lors de la synthèse des leucotriènes (LTB4), supprime la prolifération des kératinocytes (Kumar et al., 1999).

Le **pic 27** a été attribué à **l'acide 8-hydroxybarbatique**, montrant un anion moléculaire à  $m/z$  376.1159. Sa fragmentation produit des ions à  $m/z$  163.0392, 167.0342, 149.0236 et 325.0715, a été identifié dans l'extrait méthanolique du lichen *Everniopsis trulla* par UHPLC-DAD-MS (Castro et al., 2017).

Le **pic 28**, avec un ion  $[M - H]^-$  à  $m/z$  374.1001, a été identifié comme étant **l'acide Baeomycésique**, Sa fragmentation produit des ions à  $m/z$  177.0188,195.0295,151.0393 et

123.0442, Selon **Haraldsdottir et al.** , ce composé a présenté une activité inhibitrice de lignées de cellules cancéreuses humaines.

Le **pic 32** et le **pic 55** ont été identifiés comme étant **l'acide allo-protolichesterinic** et **l'acide lichestérylique** dont les anions moléculaires étaient à m/z 324.2303 et 312.2667, leurs fragmentations produit respectivement des ions à m/z 305.2125 et 261.2225, 183.0116, 96.959 et 216.0092 ; ces 2 acides ont été trouvés dans *Cetraria ericetorum* et *Cetraria islandica* (**Huneck et Yoshimura, 1996**), et aucune étude n'a été signalé sur leur bioactivité.

Les **pics 35, 38,52 et 66** ont été identifié comme l'acide 4'-O-demethylsekikaic ,8-hydroxydiffractaïque, muronique et leprolomin, ont montré des ions [M – H] – à m/z 403,1399, 389.1245, 365.2330, 389.1242, ont été également identifié par UHPLC/ESI/MS /Analyse MS dans l'extrait hexanique de *Physcia méditerranée* (**Kerboua et al., 2021**)

Le **pic 42** a été identifié comme étant **l'acide glomelliferonique**, qui a montré un ion [M- H]- à m/z 455,1711 a été signalé par (**Huneck et Youschimra, 1996**).

Le **pic 54** a été identifié comme étant de **l'acide murolique** (anion moléculaire à m/z 367.2488) a été trouvés chez *U. rubicunda* *U. subfloridana* (**Francisco et al., 2018**)

Le **pic 58** a été attribué à **l'acide praesorediosique** dont l'anion moléculaire était à m/z 381.2282. Sa fragmentation a produit des ions à m/z 339.3658, 293.2499 et 71.049, cet acide a été signalé chez *P. praesorediosum* (**Huynh et al., 2016**)

Le **pic 60** a été identifié comme étant **l'acide 19-acetoxyprotolichesterinic**, qui a montré un ion [M – H]– à m/z 381.2285, ce composé a été trouvé dans le genre Parmotrema.

Enfin, **la diploïcine** a été affecté au **pic 62** (anion moléculaire à m/z 421.9285), a été isolé en **1904** par **Zopf** à partir d'un lichen d'espèce indéterminée (**Hunek et al., 1969**). Des recherches ultérieures ont montré qu'il était présent dans *Buellia canescens* (**Culbertson, 1963**) et *Lecidea cargaleoides* (**Koller et al., 1934**).

**L'acide barbatique**, l'acide tétraoxodocosanoïque et l'acide superpicrolichénique, ont été identifiés dans l'échantillon 1-Hexane.

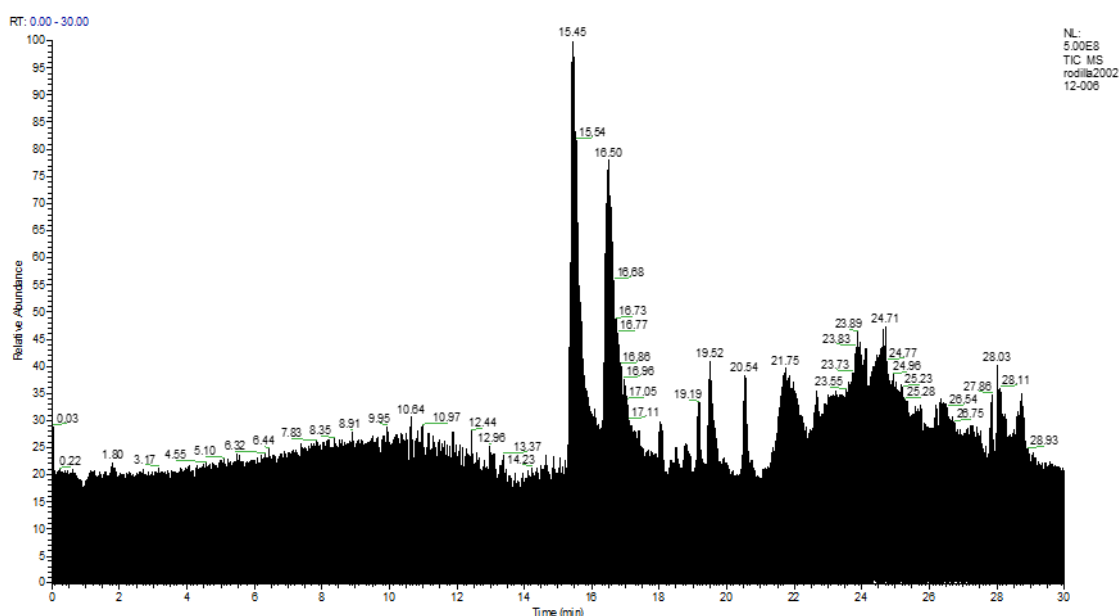
L'acide 3,5-diméthylorsélinique,9,10- dihydroxy-8-oxo-12-octadécénoïque, l'acide octadécanedioïque et l'acide 18-hydroxylinoléique, ont été identifiés dans l'échantillon 2-Hexane.

Dans l'échantillon 1-Hexane, il y a **17** métabolites qui n'ont pas pu être identifiés et dans l'échantillon 2-Hexane nous avons **13** métabolites non identifiés.

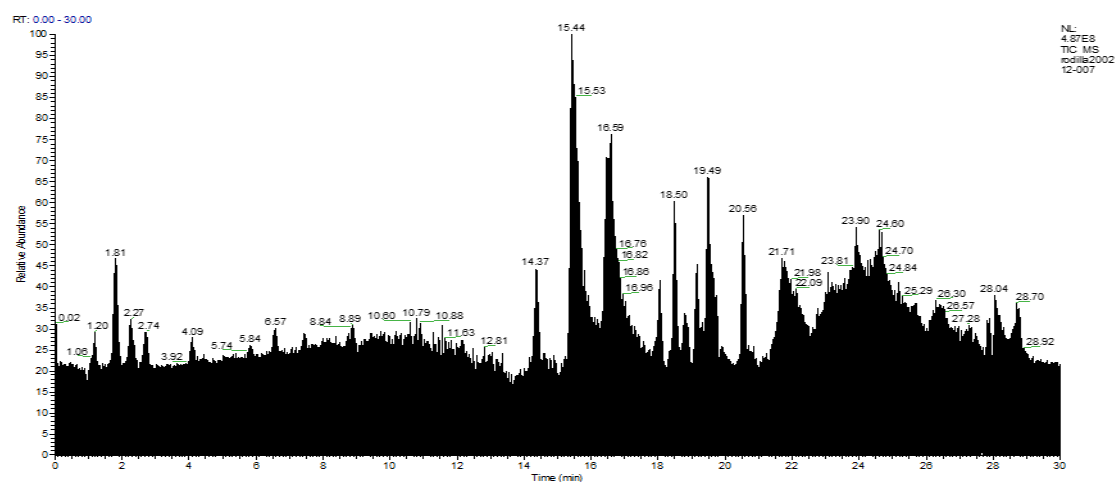
### 2.2.2. Analyse chimique de l'extrait hexanique insoluble dans le MeOH 1-Cire et 2-Cire de *Parmotrema hypoleucinum* collecté sur deux phorophytes différents par HPLC-MS/MS

Dans l'analyse des extraits **1-Cires** et **2-Cires** en utilisant UHPLC-ESI-MS-MS en mode négatif, il a été possible de détecter : dans **1-Cires 56 produits**, dont **11 produits non identifiés**. Dans **2-Cires, 53 produits** ont été détectés et **13 produits n'ont pas pu être identifiés**.

Les chromatogrammes et l'analyse des composés 1-Cires et 2-Cires sont présentés dans les **figures 40** et **41** et dans le **tableau 19**.



**Figure 40:** Chromatogramme de l'extrait d'Hexane insoluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 1 – Cire de *Parmotrema hypoleucinum*



**Figure 41:** Chromatogramme de l'extrait d'Hexane insoluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 2 – Cire de *Parmotrema hypoleucinum*

**Tableau 19** : Identification des substances lichenique de l'extrait d'hexane insoluble dans le MeOH de *Parmotrema hypoleucinum*, (*Olea europea*), 1-Cire et (*Quercus coccifera*), 2- Cire

Pic	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MT (m/z)	Formule moléculaire	Formule moléculaire	Composés identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)
				<b>1 Cires</b>	<b>2 Cires</b>		
1	2.67	146.9397	147.9475	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	-----	Dihydroxyfumaric acid	121.7335 103.9193 87.9242
2	0.04	190.9281	191.9359	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	-----	Methanetetra-carboxylic acid	129.9942 102.9476 98.6743
3	1.80	116.9276	117.9354	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	-----	Butendioic acid	109.2366 99.9248 94.7628
4	2.19	112.9845	113.9932	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	2,3-dioxobuten-1,4-dial	98.6227 86.3908 68.9946
5	2.72	187.0971	188.1049	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	3,5-dimethoxycyclohexanecarboxylic acid	143.8646 123.0809 97.0652
6	4.12	201.1129	202.1207	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	2,4-dihydroxy-3, 5,6-trimethylcyclohexane-1-carboxylic acid	164.8358 162.8387 139.1118
7	5.51	163.0395	164.0473	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	-----	p-Coumaric acid	150.6340 145.8898 137.8545 117.9279
8	5.85	268.1919	269.1997	C <sub>12</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>28</sub> O <sub>6</sub>	<b>Non identifié</b>	
9	6.57	227.1286	228.1364	-----	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	trans-dodec-2-enedioic acid	
10	7.46	282.2077	283.2155	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	N-dodecanoyl-L-Homoserine lactone	238.2177 183.1021 139.1121
11	8.09	174.9556	175.9634	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	-----	2-Hydroxy-3,4-dioxopentanedioic acid	132.9812 118.9653 116.9277
12	8.15	293.1762	294.1840	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	-----	gingerol	236.1055 221.1542 192.1152
13	8.39	323.2230	324.2308	-----	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	allo-protolichestrinic acid	305.2125 261.2227 225.1492
14	9.50	350.2337	351.2415	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	Xylitolaurate	
15	10.88	233.1546	234.1624	-----	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	Fukinanolide	217.1233 136.9390 101.0040
16	11.43	334.2389	335.2467	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	<b>Non identifiés</b>	
17	11.75	311.2231	312.2309	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	9Z-octadecenedioic acid	293.2149 269.2124 213.1493
18	13.16	293.2126	294.2204	-----	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	2-hydroxylinolenic acid	256.8876 221.1548 192.1154
19	13.95	319.2280	320.2358	-----	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	5-hydroxyeicosatetraenoic acid	282.6629 218.0733 145.0298
20	14.37	295.2280	296.2358	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	18-Hydroxylinoleic acid	277.2177 183.1386 238.0103
21	14.67	321.2436	322.2514	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	-----	Hydroxyeicosatrienoic acid	293.2481 277.2222 253.7910
22	14.90	346.2390	347.2468	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	9,10,14-trihydroxy-12-oxooctadecanoic acid	
23	14.98	297.2434	298.2512	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	9-oxooctadecanoic acid	279.2329 261.2226 183.0117
24	15.36	177.0186	178.0264	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	6,7-Dihydroxycoumarin	107.0129 91.0177 65.0022 68.9970
25	15.44	373.0929	374.1007	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	<b>Atranorin</b>	<b>347.4986 287.3080 177.0187 163.0393</b>
26	16.42	210.9801	211.9879	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> Cl	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> Cl	7-chloro-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carboxylic acid.	---
27	16.47	407.0539	408.0617	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> Cl	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> Cl	<b>Chloroatranorin</b>	<b>374.2436 210.9801 163.0393 119.0493</b>
28	17.57	277.2175	278.2203	-----	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Octadeca-9,12,15-trienoic acid	---
29	17.65	389.1246	390.1324	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	-----	8-Hydroxydiffractaic acid,	325.0721 281.0822 163.0394 149.0237
30	17.77	265.1480	266.1558	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	(4E,6E,9E)-Pentadeca-4,6,9-trienedioic acid	225.9377 195.2177 158.7972 96.9590
31	18.03	253.2331	254.2249	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Palmitoleic acid	216.0091 197.0273 183.0115 163.0391
32	18.28	402.3016	403.3094	-----	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> O <sub>6</sub>	<b>Non identifié</b>	---
33	18.34	241.2173	242.2251	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Pentadecanoic acid	114.0116 71.2751
34	18.35	455.3534	456.3612	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	-----	Oleanolic acid	407.3320
35	18.50	279.0936	280.2409	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	<b>Linoleic acid</b>	<b>96.9594 202.4945 150.7684</b>
36	18.66	489.3375	490.3453	-----	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>8</sub>	<b>Non identifié</b>	---
37	18.86	403.2645	404.2723	-----	C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	<b>Non identifié</b>	---

38	18.91	267.2331	268.2409	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	cis-9-Heptadecenoic acid	96.9590	98.9549	188.3805
39	19.15	255.2329	256.2407	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	<b>Palmitic acid</b>	<b>236.5331</b>	<b>139.4856</b>	<b>230.9335</b>
40	19.35	459.3271	460.3349	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	<b>Non identifié</b>			
41	19.51	281.2487	282.2565	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	<b>Oleic acid</b>	<b>103.8178</b>	<b>117.3111</b>	<b>94.59</b>
42	19.75	459.3272	460.3350	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	-----	Methyl glucose isostearate	386.3174	332.2710	
43	19.89	269.2488	270.2566	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Heptadecanoic acid			
44	19.99	307.2645	308.2723	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	11,14-Eicosadienoic acid	289.2538	251.7862	96.9588
45	20.07	457.3722	458.3800	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub> O <sub>5</sub>	<b>Non identifié</b>	---		
46	20.18	295.2645	296.2723	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	10E-nonadecenoic acid	---		
47	20.54	283.2643	284.2721	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	<b>Stearic acid</b> (Octadecanoic acid)	<b>183.0114</b>	<b>221.2569</b>	<b>168.0114</b>
48	20.82	309.2800	310.2878	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	Eicosenoic acid	96.9590	277.9540	241.2167
49	20.86	505.3326	506.3404	-----	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>9</sub>	<b>Non identifié</b>	---		
50	21.05	457.3722	458.3800	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub> O <sub>5</sub>	-----	<b>Non identifié</b>	---		
51	21.71	311.2957	312.3035	-----	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	(eicosanoic acid) arachidic acid			---
52	22.62	297.1532	298.1610	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	<b>Non identifié</b>	---		
53	22.67	637.4836	638.4914	C <sub>24</sub> H <sub>60</sub> O <sub>12</sub> N <sub>7</sub>	-----	<b>Non identifié</b>	---		
54	22.77	339.3268	340.3346	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	Docosanoic acid	---		
55	23.08	309.1743	310.1821	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	<b>Portentol</b>	<b>122.9747</b>	<b>96.9590</b>	<b>79.9563</b>
56	23.58	353.2003	354.2081	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	<b>Non identifié</b>	---		
57	23.81	311.1689	312.1767	C <sub>13</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	<b>Non identifié</b>	---		
58	23.89	367.3579	368.3657	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	Lignoceric acid	349.3456	249.0620	96.9590
59	24.01	397.2266	398.2344	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	<b>Stephanol</b>	<b>351.3650</b>	<b>228.9638</b>	<b>122.9748</b>
60	24.60	293.1793	294.1871	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	Heptadecatrienedioic acid	---		
61	24.94	325.1844	326.1922	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	<b>Non identifié</b>	---		
62	25.33	395.3895	396.3973	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	-----	Hexacosanoic acid	---		
63	25.89	337.2055	338.2133	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	6-Oxonadeca-8,11-dienedioic acid	---		
64	26.10	339.2000	340.2078	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	<b>Non identifié</b>	---		
65	26.24	381.2317	382.2395	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	19-Acetoxylichesterinic acid	122.9748	96.9590	
66	26.75	425.2581	426.2659	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	-----	<b>Asebotoxin I</b>	<b>339.2003</b>	<b>194.8833</b>	<b>122.9748</b>
67	27.53	321.2106	322.2184	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	Nonadecatrienedioic Acid	---		
68	27.85	304.9143	305.9221	---	-----	<b>Non identifié</b>	---		

Les **composés identifiés** étaient principalement des composés polyphénoliques, des **acides gras**, des **lactons** et des **acides carboxyliques**.

Pour les acides et diacides identifiés dans le **1-Cire** il y a **23** métabolites et dans **2-Cire** nous avons **27** métabolites. Comme acides benzoïques et leurs dérivés, nous avons l'acide p-coumarique et l'acide 6,7-dihydroxycoumarine. Parmi les composés polyphénoliques et les esters, dans **1-Cire** et **2-Cire** ont été identifiés : l'acide allo protolichestrinique, Atranorine, Acide 7-chloro-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-carboxylique, Chloroatranorine, acide 8-hydroxydiffractaïque et 19-acide acétoxylichestrinique, les lactons comme l'acide N-dodecanoyl-L-Homoserine lactone et Fukinanolide.

Nos résultats sont en accord avec plusieurs investigations phytochimiques réalisées sur des espèces Européennes, Asiatiques et Africaines du genre *Parmotrema*, où différents types de depsides, depepidones, orcinols, dibenzofuranes et en particulier l'atranorine (composé majoritaire) y ont été isolés.

Les profils GC-MS et HPLC-ESI-MS/MS de la fraction soluble et insoluble dans le méthanol (1-Hexane et 2-Hexane, 1-Cire et 2-Cire) des extraits hexaniques de l'espèce *Parmotrema*

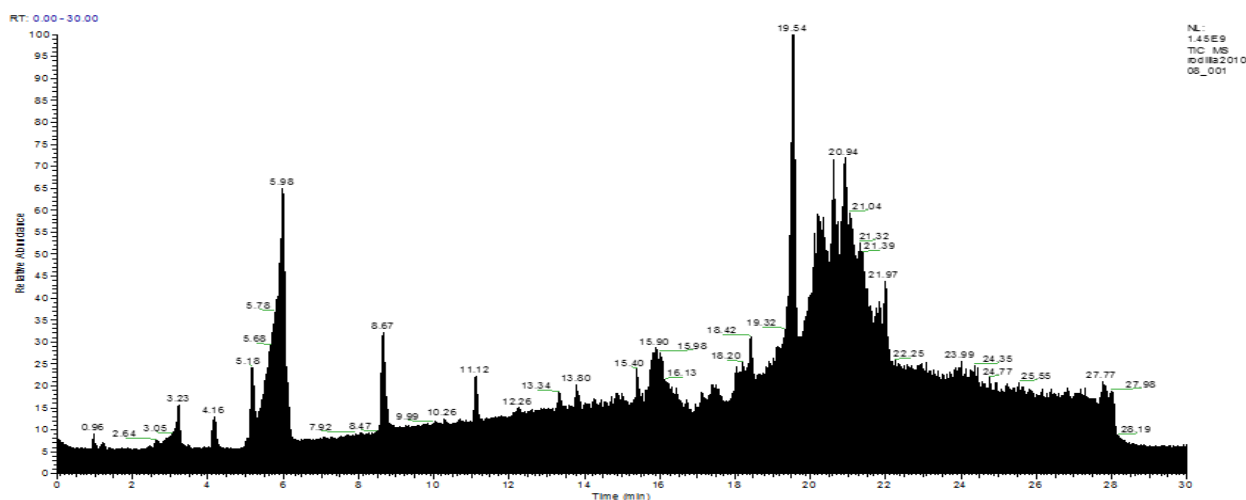
*hypoleucinum* sur (*Olea europea* et *Quercus coccifera*) présentent des composés chimiques peu différents, et en quantité variable pour l'analyse GC-MS.

Dans les travaux menés en 2016 par **Widhelm et al**, dans une analyse générale sur la relation chimique dans le groupe de *Parmotrema perforatum* (Parmeliaceae, Ascomycota), chaque espèce sorédiée descend d'une espèce apothéciée, avec les mêmes produits chimiques secondaires. Le lichen *Parmotrema hypoleucinum* est dérivé de l'ancêtre *Parmotrema preperforatum* représenté par ses métabolites secondaires tels que les acides : stitique, contictique et norstictique. Ces acides n'ont pas été extraits dans l'extrait d'Hexane, ils n'existent pas dans la partie insoluble dans le méthanol, le 1-Cires et le 2-Cires ; ni dans la partie soluble dans le méthanol : 1-Hexane et 2-Hexane.

### 2.2.3 Analyse chimique de l'extrait chloroformique de *Parmotrema hypoleucinum* collectés sur deux phorophytes différentes par UHPLC-ESI-MS/MS :

L'étude phytochimique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) avec source Electrospray (ESI) en mode négatif des extraits chloroformiques de *Parmotrema hypoleucinum*, l'extrait 1-chloroforme de *P. hypoleucinum* sur *Olea europea* représenté par **P.hyp 1** et l'extrait 2-chloroforme de *P. hypoleucinum* sur *Quercus coccifera* par **P.hyp 2**.

Les composés identifiés avec une polarité moyenne, dans les extraits de 1-chloroforme et de 2-chloroforme sont présentés par les chromatogrammes **Figure 42** et **Figure 43** et les résultats de l'identification des composés par le **tableau 20**, qui sont présentés ci-dessous :



**Figure 42:** Chromatogramme de l'extrait de 1-chloroforme de *P. hypoleucinum*

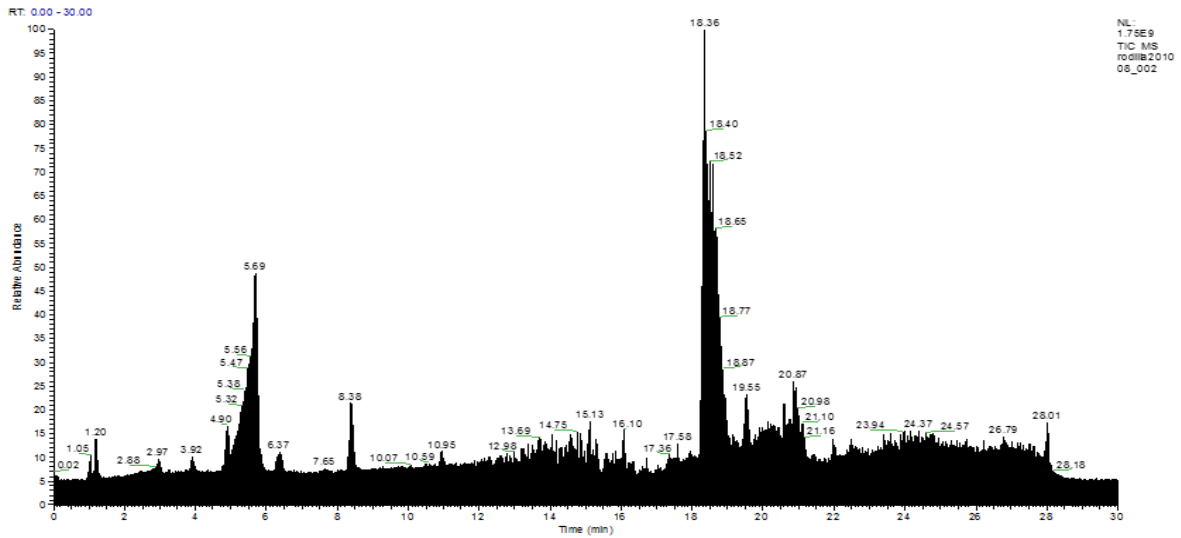


Figure 43: Chromatogramme de l'extrait de 2-chloroforme de *P. hypoleucinum*

Tableau 20 : Identification des substances lichéniques de l'extrait chloroformique de *Parmotrema hypoleucinum*, (*Olea europea*), 1-Chloroforme et (*Quercus coccifera*), 2-Chloroforme.

Pics	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MT (m/z)	Formule moléculaire		Composés identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)			
				1-Chlor	2-Chlor					
1	0.98	174.9557	175.9635	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	-----	2-Hydroxy-3,4-dioxopentanedioic acid	118.9654	90.9703	146.9608	105.9574
2	1.01	145.0975	146.1053	-----	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	2-Hydroxyheptanoic acid	99.9247	116.9469	90.6847	
3	1.05	112.9845	113.9923	-----	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Squaric acid	68.9946	85.3754		
4	1.12	182.9882	183.9960	-----	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Chelidonic acid	68.9946	79.9563	155.022	136.5849
5	1.14	341.1091	342.1169	-----	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	Sucrose	89.0233	101.0233	113.0234	119.0340
6	1.52	215.0097	216.0175	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	D-diacetyltartaric anhydride	144.0083	171.0196		
7	1.74	433.0778	434.0856	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	Avicularin	209.0089	165.0186	137.0236	283.0615
8	1.76	403.0675	404.0753	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	Euxanthic acid	167.0344	193.014	211.0246	341.067
9	1.92	417.0468	418.0546	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>11</sub>	-----	Shoyuflavone C	240.0429	252.0429	212.0479	255.0667
10	2.41	433.0780	434.0858	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	Morin 3- $\alpha$ -L-arabinopyranoside	283.0614	240.0427	255.0663	268.0379
11	2.57	401.0518	402.0596	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub>	Shoyuflavone B	240.0427	268.038	121.0286	283.0614
12	2.64	403.0672	404.0750	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	Euroxanthone B	270.0536	121.0285	285.0771	226.0633
13	3.15	447.0934	448.1012	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	Quercitrin	121.0285	329.1035	314.0799	286.0852
14	3.23	401.0515	402.0593	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub>	<b>Constictic acid</b>	<b>240.0427</b>	<b>268.0380</b>	<b>121.0286</b>	<b>283.0614</b>
15	3.38	182.9882	183.9960	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Cl	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> Cl	3-Chloro-4-formylbenzoic acid	68.9946	110.1285	94.9158	
16	3.48	187.0972	188.1050	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	-----	Azelaic acid				
17	3.63	371.0412	372.0490	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	-----	<b>Norstictic acid</b>	<b>240.0428</b>	<b>212.0476</b>	<b>268.0380</b>	<b>283.0616</b>
18	3.90	313.0722	314.0800	-----	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Cirsimaritin	280.0379	225.0553	212.0475	254.0580
19	3.91	442.1145	443.1223	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub>	-----	NI	312.0882	297.0648	240.1029	
20	3.99	373.0567	374.0645	-----	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	Menegazziaic acid	239.071	227.0347	255.031	267.0663
21	4.02	399.0361	400.0439	C <sub>19</sub> H <sub>12</sub> O <sub>10</sub>	-----	Kynapcin-28	68.9970	240.0428	268.0379	212.0474
22	4.13	357.0617	358.0695	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	Succinyldisalicilic acid	225.0555	254.0583	239.0350	280.0382
23	4.24	401.0515	402.0593	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub>	-----	Siphulellic acid	254.0584	226.0626	239.0348	210.0687
24	4.27	373.0568	374.0646	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	-----	Protocetraric acid	239.0712	227.0348	255.0303	311.0565
25	5.03	417.0830	418.0908	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	Conphysodalic acid	254.0584	267.0300	282.0536	297.0772
26	5.09	385.0568	386.0646	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	<b>Stictic acid</b>	<b>267.0302</b>	<b>254.0585</b>	<b>282.0536</b>	<b>226.0630</b>
27	5.18	387.0721	388.0799	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	Cryptostictic acid	284.0692	251.0351	256.0740	239.0352
28	6.02	385.0565	386.0643	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	3,3'-Carbonylbis[6-(methoxycarbonyl)benzoic acid]	254.0584	267.0301	282.0534	226.0632
29	6.14	431.0984	432.1062	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	(Genistin)	281.0458	253.0507	300.1005	328.0951
30	6.32	209.0849	210.0927	-----	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	Sinapyl alcohol	96.9590	79.9563		
31	7.63	309.1017	310.1095	-----	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	1-O-cis-cinnamoyl- $\beta$ -D-glucopyranose	80.9641			
32	8.11	373.0568	374.0646	-----	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	Menegazziaic acid isomer	267.0666	255.0665	229.0504	311.0567

33	8.67	371.0408	372.0486	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	Substictic acid	227.0349	243.0299	255.0665	211.0762
34	9.54	293.1763	294.1841	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	Nordihydrocapsiate	221.1543	136.0886	192.1153	177.0913
35	10.26	771.1205	772.1283	C <sub>38</sub> H <sub>28</sub> O <sub>18</sub>	C <sub>38</sub> H <sub>28</sub> O <sub>18</sub>	fucufuroeckol A hepta-acetate	167.0343	651.1152	683.1418	325.0726
36	10.61	426.9681	427.9759	-----	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>14</sub>	NI	—			
37	11.11	475.3278	476.3356	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>	Tetrahydroxypentacosanedioic acid	429.3224	157.1226	241.1422	197.1550
38	12.21	345.0982	346.1060	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	-----	4-0-Demethylbarbatic acid	181.0501	137.0600	163.0394	119.0492
39	13.12	265.1482	266.1560	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate	96.9591			
40	13.34	467.0985	468.1063	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	Gyrophoric acid	167.0343	149.0237	123.0442	255.0667
41	13.36	317.0670	318.0748	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	-----	Lecanoric acid	123.0442	167.0343	149.0237	105.0335
42	13.80	503.3593	504.3671	C <sub>27</sub> H <sub>52</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>52</sub> O <sub>8</sub>	Tetraglycerol monooleate	457.3540	443.3385	185.1545	241.1450
43	14.47	517.3745	518.3823	C <sub>28</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	-----	docosanoic acid	457.3538	185.1543	241.1443	
44	14.83	359.0776	360.0854	-----	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	Ramalinalic acid	181.0502	137.0601	163.0394	
45	15.40	365.2334	366.2412	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	Muronic acid	277.2541	297.1534	96.9593	169.1595
46	16.02	367.2491	368.2569	-----	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	Protoconstipatic acid	263.2383	277.2536	323.2585	155.1432
47	16.28	297.1532	298.1610	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	NI	—			
48	17.11	309.1743	310.1821	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	-----	Portentol	96.9590	122.9749		
49	17.14	177.0187	178.0265	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	6,7-dihydroxycoumarin	68.9971	105.0336		
50	17.37	309.1743	310.1821	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	Botrydial	96.9590	122.9749		
51	18.01	311.1690	312.1768	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	Heptahydroxytridecanol (nvl mol)	183.0116	170.0039	239.0745	
52	18.03	407.0541	408.0619	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> Cl	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> Cl	Chloroatranorin	163.0393	210.9801	181.0501	119.0493
53	18.05	210.9801	211.9879	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	2-methoxy-3,4-dichloro-6-methyltetrahydropyran-5-one (nvl mol)	138.9951	75.0230	103.0178	131.0133
54	18.32	353.2004	354.2082	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	tetraoxonadecanoic acid	96.9590	122.9748		
55	18.36	421.2265	422.2343	-----	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	Sarmentogenin	80.9641			
56	18.85	397.2268	398.2346	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	-----	Stephanol	96.9590	122.9748		
57	19.13	387.2544	388.2622	-----	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	Dehydrodeoxycholic acid	96.959	122.9747		
58	19.16	441.2530	442.2608	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	-----	Asebotoxin IV	96.9591	122.9747		
59	19.32	325.1846	326.1924	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	-----	Linderanolid	183.0117	197.0274	170.0038	
60	19.55	253.2172	254.2250	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	palmitoleic acid	216.2756	83.0491	128.2464	104.0607
61	19.64	255.2331	256.2409	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	-----	palmitic acid	226.5856	152.5403	115.0398	78.5999
62	19.74	293.1796	294.1874	-----	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	Gingerol	96.9590			
63	19.92	279.2332	280.2410	-----	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Linoleic acid	96.9590	129.0358	101.0231	
64	20.35	267.2332	268.241	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	2-heptadecenoic acid	96.959	98.9549		
65	20.51	283.2645	284.2723	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	stearic acid	117.5899	78.3229	72.5682	
66	20.88	281.2488	282.2566	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	oleic acid	206.4382	138.8067	119.1887	100.3896
67	22.25	565.3784	566.3862	C <sub>32</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	-----	NI	—			
68	23.08	679.4650	680.4728	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> O <sub>12</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> O <sub>12</sub>	NI	—			
69	23.11	761.5977	762.6055	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> O <sub>12</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> O <sub>12</sub>	NI	—			
70	23.14	395.3897	396.3975	-----	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	Hexacosanoic acid	363.7315			
71	23.84	337.2057	338.2135	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	Idebenone	96.9590	122.9747		
72	23.91	367.3583	368.3661	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	-----	Lignoceric acid	—			
73	24.13	637.4844	638.4922	-----	C <sub>34</sub> H <sub>70</sub> O <sub>10</sub>	NI	—			
74	24.25	639.3973	640.4051	C <sub>31</sub> H <sub>60</sub> O <sub>13</sub>	-----	NI	—			
75	24.44	381.3741	382.3819	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	-----	Pentacosanoic acid	96.9591			
76	24.56	339.2000	340.2078	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	Heptahydroxypentadecanol	183.0117	96.9590		
77	24.60	679.4650	680.4728	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> O <sub>12</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> O <sub>12</sub>	NI	—			
78	24.80	535.3132	536.3210	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>11</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>11</sub>	NI	—			

Dans l'échantillon 1-chloroforme, **60 produits** ont été détectés, dont **52 produits** identifiés et **8 produits n'ont pas été identifiés**, et dans l'échantillon 2-chloroforme, **58 composés ont été détecté, dont 51 produits ont été identifiés et 7 composés non identifiés.**

Parmi ces principales molécules identifiées dans les deux échantillons, faisant partie des classes lichéniques suivantes :

Depsides, depsidones, aromatique, acides aliphatique et acides gras

Les depsides sont des composés aromatiques des lichens formés par estérification de deux unités d'orcinol (Nguyen et al., 2013). Par conséquent, la fragmentation des depsides donne habituellement naissance à un ion fragment caractéristique dû au clivage de la liaison ester (Musharraf et al., 2015 ; Nguyen et al., 2017). **Cinq depsides ont été identifiés (pics 38, 40, 41, 44 et 52)** en utilisant UHPLC avec analyse ESI / MS-MS en mode négatif.

Les pics 38 et 41 ont été identifiés comme étant l'acide 4-O-Demethylbarbatic et acide lecanoric, montrant des ions  $[M - H]^-$  à  $m/z$  346,106 et 318,074, ces deux composés ont été détectés dans l'extrait 1-chloroforme, souvent présent chez le genre Parmotrema, l'acide lecanorique a été déjà détecté chez trois espèces de Parmotrema (*P. tinctorum*, *P. andinum*, *P. austrosinense*), (Kumar et al., 2018). L'acide 4-O-Demethylbarbatic a été signalé chez *P. physcioides* (Elix, 1984)

Les Pics 40 et 52 avec un ion pseudomoléculaire  $[M-H]^-$  à  $m/z$  468,1063 et 408,0619 ont été identifiés comme étant de l'acide Gyrophorique et Chloroatranorine.

Le composé 44 a été identifié comme l'acide Ramalinaic (anion moléculaire à  $m/z$  360.0854), présent dans l'extrait 2-chloroforme uniquement.

### Depsidones

Huit depsidones correspondant aux pics 14, 17, 20, 23, 24, 26, 27 et 33 ont été identifiés. Le pic 14 a été identifié comme étant l'acide Constictique, qui a montré un ion  $[M- H]^-$  à  $m/z$  402,0593. Le pic 17 avec un ion  $[M- H]^-$  à  $m/z$  372.0490 a été identifié comme étant l'acide Norstictique.

Les pics 20 et 23 ont été identifiés comme l'acide Menegazziaic et l'acide Siphulellic, qui ont montré un ion  $[M - H]^-$  à  $m/z$  374,0645 et 402,0593, ces deux composés ont été détectés dans l'échantillon 2-chloroforme. Pic 24 a été identifié comme étant l'acide Protocetraric (anion moléculaire à  $m/z$  374.0646), l'acide Protocetraric couramment trouvé dans le genre Ramalina a été détecté dans *R. fastigiata* et *R.farinacea* (Brakni et al., 2018). Trois autres depsidones (acide Stictic, Cryptostictic et acide Substictic) correspondant aux pics 26,27 et 33 respectivement leurs principaux ions à  $m/z$  386,0646, 388,0799 et 372,0486. Ces résultats sont en accord avec ceux de (Castro et al., 2017) , ( Pogam et al.,2015) et ( Musharraf et al.,2015).

### Composés Aromatiques

Un composé aromatique Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate (pic 39) a été détecté pour la première fois dans le genre Parmotrema. Son spectre ESI en mode négatif a donné une molécule déprotoné  $[M-H]^-$  à  $m/z$  266.1560 tandis qu'un fragment majeur à  $m/z$  96.9591 suggère la présence d'un groupe carboxylique. Ces données MS sont cohérentes avec ceux de Salgado et al., 2018 qui a identifié l'acide Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate dans *Usnea antarctica* en utilisant la spectrométrie de masse en mode négatif (UHPLC-ESI-OT-MS-MS).

Un autre composé aromatique, l'acide 6,7-dihydroxycoumarine (pic 49, anion moléculaire à  $m/z$  178.0265). Il a été trouvé dans l'extrait hexanique de *Physcia mediterraneae* nouvelle espèce Algérienne (Kerboua et al., 2021).

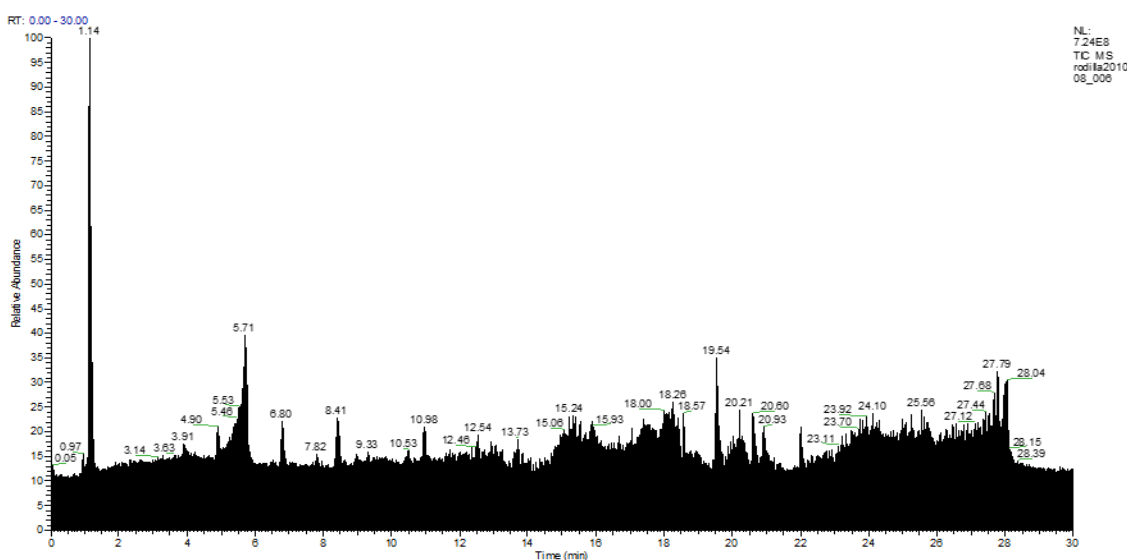
## Acides aliphatiques

Trois acides aliphatiques (**pic 16, 45 et 46**) ont été détectés dans l'extrait chloroformique. Le **pic 16** a été identifié comme l'**acide azelaïque**, qui a montré un ion  $[M - H]^-$  à  $m/z$  188.1050. Cet acide est efficace dans le traitement de plusieurs affections cutanées, telles que l'acné, l'inflammation et l'hyperpigmentation. En tant qu'inhibiteur compétitif de la tyrosinase in vitro, il a été utilisé pour traiter le mélasma, le lentigo malin et l'hyperpigmentation post-inflammatoire (Sieber et al. 2014), ce composé il a été trouvé dans l'extrait **1-Chloroforme**. Les **pics 45 et 46** ont été identifiés comme l'**acide muronique** et l'**acide protoconstipatique** qui ont montré respectivement un ion  $[M - H]^-$  à  $m/z$  366.2412 et 368.2569. Les principaux ions étaient à  $m/z$  277.254, 297.1534, 96.9593 et 169.1595 pour l'acide muronique, tandis que pour l'acide protoconstipatique, les ions étaient à  $m/z$  263.2383, 277.2536, 323.2585 et 155.1432. Ce dernier a été détecté dans l'échantillon **2-chloroforme**.

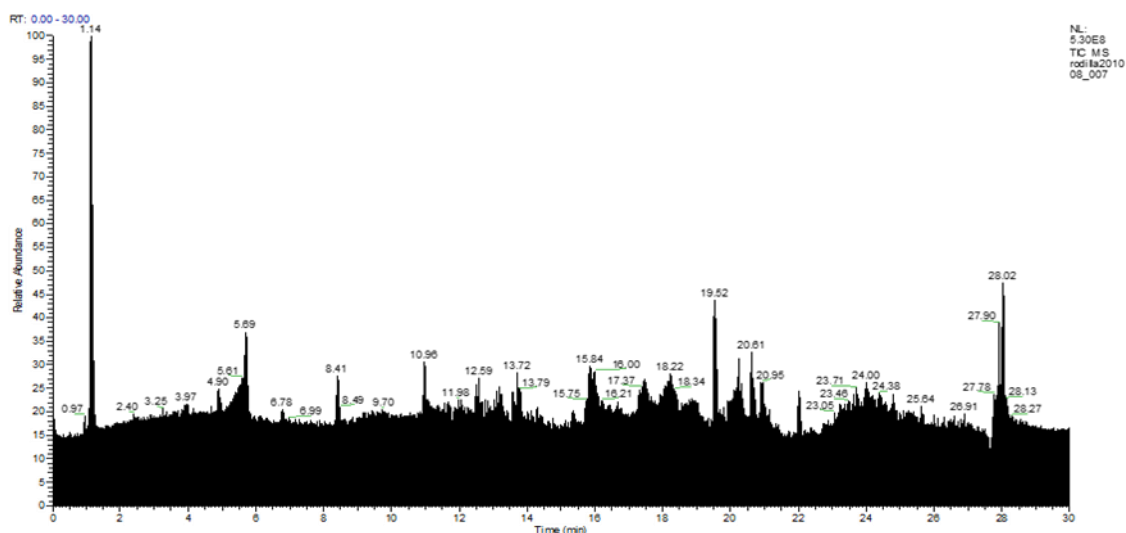
À ce jour, des études phytochimiques limitées concernant *P. hypoleucinum* ont été rapportées. *P. hypoleucinum* a été étudié par Lendemmer et al en 2015, qui ont également détecté la présence l'**acide Stictique** et l'**acide Norstictique** comme **composés majoritaire**.

### 2.2.4 Analyse chimique de l'extrait Ethanolique de *Parmotrema hypoleucinum* collectés sur deux phorophytes différentes par UHPLC-ESI-MS/MS :

L'analyse quantitative et qualitative des composés plus polaires de l'extrait éthanolique de *Parmotrema hypoleucinum* récoltée sur deux phorophytes différents. L'extrait 1-Ethanol (Par hyp 1), l'extrait 2-Ethanol (Par hyp 2). Les composés ont été identifiés pour la première à l'aide de HPLC-ESI-MS/MS en mode négatif, dans l'échantillon **1-Ethanol, 57 métabolites ont été détectés**, dont **54 ont été identifiés et 3 non identifiés (NI)** (figure 45 et tableau 21). Dans l'échantillon **2-Ethanol** analysé, **54 composés ont été détectés**, dont **52 ont été identifiés et 2 non identifiés (NI)** (figure 46 et tableau 21).



**Figure 44:** Chromatogramme de l'extrait de 1-éthanol de *P. hypoleucinum*


**Figure 45:** Chromatogramme de l'extrait de 2-éthanol de *P. hypoleucinum*
**Tableau 21 :** Identification de composés lichénique de l'extrait éthanolique de *Parmotrema hypoleucinum*, (*Olea europea*), 1-éthanol et (*Quercus coccifera*), 2-éthanol.

Pic	RT	[M-H]-	MT	Formule moléculaire	Formule moléculaire	Composés identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)
				<b>1-Ethanol</b>	<b>2-Ethanol</b>		
1	0.98	174.9556	175.9634	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	2-Hydroxy-3,4-dioxopentanedioic acid	118.9653 90.9702 99.9247 116.9276
2	1.05	112.9845	113.9923	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Squaric acid	68.9946
3	1.15	311.1156	312.1234	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	Neoanisatin(Illicium tashiroi) sesquiterpene vs	159.0461 177.0569 101.0233
4	1.19	151.0603	152.0681	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Arabitol	71.0127 59.0128 79.9563
5	1.82	182.9882	183.9960	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Chelidonic acid (v sup)	68.9946 113.9551
6	2.99	401.0517	402.0595	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub>	Constictic acid	240.0425 268.0379 121.0284 283,0609
7	3.95	357.0617	358.0695	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>	Psoromic acid	225.0554 254.0581 239.0348
8	4.17	519.1147	520.1225	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>13</sub>	-----	Eujambolin	297.0769 475.1248 431.1347 269.0822
9	4.91	387.0722	388.0800	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	Cryptostictic acid	284.0692 256.0741 251.0350 239.0352
10	5.06	385.0568	386.0646	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	Stictic acid	254.0583 267.0302 226.0632 282.0535
11	5.19	417.0830	418.0908	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	Juglanin(v sup)	254.0585 267.0300 282.0535 239.0348
12	5.71	373.0566	374.0644	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	Protocetraric acid	270.0535 242.0579 151.0393 299.0200
13	5.88	431.0985	432.1063	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	-----	Genistin	281.0458 253.0506 300.1005 328.0958
14	6.51	328.0597	329.0675	C <sub>20</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> N	-----	Non identifié	
15	6.80	163.0393	164.0471	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	p-Coumaric acid	145.8905 117.9278 100.9253 77.0389
16	7.25	359.0775	360.0853	-----	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	Ramalinaic acid	228.0789 243.1026 255.0661 187.0760
17	7.83	399.0723	400.0801	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	-----	Methylstictic acid	325.0355 253.0505 281.0458
18	8.44	371.0408	372.0486	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>9</sub>	Norstictic	227.0347 243.0297 255.0663 211.0761
19	8.98	209.0453	210.0531	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	-----	5,6-Dihydroxy-7-methoxy-4-methyl-2-benzofuran-1(3H)-one	105.0336 149.0236 164.8950 175.0032
20	9.24	293.1763	294.1841	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	(+)-[6]-Gingerol	136.0885 192.1152 221.1542 177.0915
21	9.33	413.0881	414.0959	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Vesuvianic acid	325.0355 253.0504 281.0458 267.0658
22	9.84	461.3123	462.3201	-----	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>8</sub>	Non identifié	
23	10.28	389.2911	390.2989	-----	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>6</sub>	9,10,12,13-tetrahydroxyheneicosanoic acid	201.1130 371.2804 213.1493 157.1227
24	10.49	243.0065	244.0143	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub> Cl	-----	acetic Acid	138.9948 103.0179 123.0442 182.9849
25	10.97	475.3276	476.3354	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>	tetrahydroxypentacosanedioic acid	429.3217 157.1226 241.1441 411.3126
26	11.38	265.1481	266.1559	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate	96.9590
27	11.42	403.3068	404.3146	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>6</sub>	9,10,12,13-	215.1286 385.2961 185.1179

						Tetrahydroydocosanoic acid	
28	11.62	447.3331	448.3409	-----	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	D-Glucitol monostearate	213.1492 429.3222
29	11.96	489.3434	490.3512	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>8</sub>	Icosanedioic acid bis(2,3-dihydroxypropyl) ester	59.0127 429.3220
30	12.05	345.0982	346.1060	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	4-O-Demethylbarbatic acid	181.0500 137.0600 163.0394 119.0492
31	12.54	417.3224	418.3302	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>6</sub>	Heptadecyl D-glucoside	399.3116 229.1441 241.1811
32	13.20	343.0823	344.0901	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	(+)-usnique acid	200.0476 228.0426 172.0523 212.084
33	13.57	431.3379	432.3457	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	6-Ethyl-6-n-pentyl-pentadecan-4,5,7,8,15-pentol-15-acetate	413.3275 243.1600
34	13.73	503.3593	504.3671	C <sub>27</sub> H <sub>52</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>52</sub> O <sub>8</sub>	Tetraglycerol monooleate	457.3535 443.3376 185.1542 241.1449
35	14.25	309.1746	310.1824	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	Portentol	96.9590 122.9747
36	14.38	293.2126	294.2204	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	17-Hydroxylinolenic acid	96.9590 136.0884 223.1696
37	14.40	517.3750	518.3828	C <sub>28</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>28</sub> H <sub>54</sub> O <sub>8</sub>	13-(beta-D-Glucosyloxy)docosanoic acid	457.3536 241.1443
38	15.34	365.2335	366.2413	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	Muronic acid	277.2540 169.1597
39	16.68	297.2438	298.2516	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	Ricinoleic acid	183.0117 216.0096 279.2325
40	18.00	311.1691	312.1769	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	Heptahydroxytridecanol	183.0117
41	18.20	353.2005	354.2083	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	Tetraoxononadecanoic acid	96.9591 122.9748
42	18.71	397.2267	398.2345	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	Stephanol	96.9590
43	18.93	421.2269	422.2347	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	Sarmentologenin	80.9641
44	19.09	441.2531	442.2609	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	Asebotoxin IV	96.9590
45	19.41	485.2796	486.2874	C <sub>25</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub>	2-(7Z,10Z,13Z)-hexadecatrienoyl-3-(β-D-galactosyl)-sn-glycerol	96.9590
46	19.54	253.2173	254.2251	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	palmitoleic acid	83.0490 149.5289 248.4797 166.7233
47	19.83	241.2172	242.2250	-----	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Pentadecanoic acid	208.9761 184.0016 118.9656 146.9612
48	19.93	279.2332	280.2410	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Linoleic acid	96.9590
49	20.03	293.1795	294.1873	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	Gingerol	96.9590
50	20.50	325.1844	326.1922	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	Linderanolide	183.0116
51	20.63	255.2329	256.2407	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Palmitic acid	239.6331
52	20.89	281.2488	282.2566	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Oleic acid	96.9590
53	21.18	325.1846	326.1924	-----	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	Hexahydroxytetradecan-1-ol	183.0117 216.0095
54	21.38	591.2616	592.2694	C <sub>34</sub> H <sub>40</sub> O <sub>9</sub>	-----	Scortechinone F	500.2221
55	22.01	283.2645	284.2723	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Stearic acid	265.2519 237.2279 190.0445 152.9670
56	22.21	761.5975	762.6053	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> O <sub>8</sub>	NI	
57	22.92	373.0932	374.1010	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	-----	Baeomycesic acid	163.0394 181.0501 119.04
58	22.94	535.3136	536.3214	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>11</sub>	-----	Non identifié	
59	23.31	311.2958	312.3036	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	Arachidic acid	183.0117 216.0093
60	23.54	337.2057	338.2135	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	Idebenone	96.9590 122.9748
61	24.82	339.2000	340.2078	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	Heptahydroxypentadecanol	183.0117 170.0036 197.0272
62	26.80	367.3584	368.3662	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	Tetracosanoic acid	199.9478
63	27.03	381.2319	382.2397	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	19-Acetoxylcheterinic acid	96.9590 122.9748

Les composés identifiés sont principalement des Depsides, Depsidones, Lipides, Composés aromatiques, Diphényléthers et Dibenzofuranes. Sont présentés dans le tableau ci-dessus.

Parmi ces composés, **47 composés** ont été identifiés pour la première fois dans l'extrait **ethanolique de *P.hypleucinum***. Tous ont été élucidés sur la base de leurs schémas de fragmentation ESI-MS-MS, les composés identifiés dans les deux épiphytes (Par hyp 1 et Par hyp 2) sont les suivants :

**7 Depsidones** (Pics 6,7,9,10,12,18 et21), **1 Depside** (Pic 30), **2Aromatiques** (Pics15 et 26), **1Dibenzofurane** (Pic 32), **2 Cycloaliphatique** (Pics 35 et 42), **1Diterpene** (Pic 44), **2**

**omposés Aliphatiques** (Pic 59 et 63) et **10 Acides Gras Pics** (6, 9, 10, 12, 18,26 et 30), ont été identifiés respectivement comme de l'acide Constictique, Cryptostictique, Stictique, Protocetrarique, Norstictique, Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate et 4-O-Demethylbarbatic, ces composés ont été déjà détectés et défini ci-dessus dans l'extrait chloroformique.

Le **pic 7** a été identifié comme étant l'**acide Psoromique**, qui a montré un ion  $[M-H]^-$  à  $m/z$  358.0695. Le **pic 15** avec un ion  $[M - H - ]^-$  à  $m/z$  164.0471 était attribué à l'**acide p-Coumarique**, La fragmentation de ce composé produit deux ions à  $m/z$  145.8905 et 117.9278.il a été déjà detecté ci dessus dansl'extrait hexanique.

**Pic 21** a été attribué à la classe Depsidone, l'**acide Vesuvianique** basé sur son anion moléculaire à  $m/z$  414.0959. Dibenzofurane, l'**acide (+)-usnique** a été identifié comme étant le **pic 32** ( $[M - H - ]^-$  à  $m/z$  344.0901), est l'isomère le plus commun de l'acide usnique, et se retrouve dans certaines espèces des genres *Usnea* et *Parmelia* : *Usnea florida* et *Flavoparmelia caperata* (Limoge, 2015).

L'acide usnique est le métabolite secondaire des lichens le plus étudié (Cardarelli et al., 1997). La molécule possède une forte activité antimicrobienne (Dayan & Romagni., 2001) et ses effets antimitotiques sont bien connus sur des cellules tumorales humaines (Kupchan & Kopperman, 1975, Cardarelli et al., 1997). Selon Mayer, l'acide usnique diminue la prolifération des cellules cancéreuses des seins et des poumons sans aucun dommage à l'ADN. Cela peut s'avérer être une nouvelle source pour un médicament anticancéreux naturel non génotoxique.

Les **pics 35** et **42** ont été identifiés comme étant du **Portentol** et du **Stephanol**, qui a montré respectivement des ions  $[M-H]^-$  à  $m/z$  309.1746, 397.2267. Le **pic 44**, avec un ion  $[M- H]^-$  à  $m/z$  551,1194, a été identifié comme étant de l'Asebotoxin **IV**. Le **pic 59** a été identifié comme étant de l'**acide Arachidique** ( $C_{20}H_{40}O_2$ ), qui a montré un ion  $[M-H]^-$  à  $m/z$  312.3036. La fragmentation de ce pic a produit deux ions à  $m/z$  183.0117 et 216.0093. Enfin, le **pic 63** a été identifié comme étant de l'**acide 19-Acetoxylichesterinic** (anion moléculaire à  $m/z$  382.2397). La fragmentation du pic 63 a également produit des ions à  $m/z$  96.9590 et 122.9748 confirmants ce composé.

Dans cet extrait ethanologique on a trouvés aussi des composés chimiques caractéristiques des végétaux supérieurs tels que (**Neoanisatin, acide Chelidonique et l'acide juglanin**). Neoanisatin est un (sesquiterpène) isolé de l'arbre *Illicium tashiroi* (Fukuyama et al., 1992), acide Chelidonique a été isolé de l'extrait de *Saussurea controversa* pour la première fois chez la famille des Astéracées, ce composé il pourrait s'agir d'une substance prometteuse pour accélérer la régénération et l'ingénierie du tissu osseux (Avdeeva et al., 2019). Juglanin est un produit naturel principalement isolé des cosse de noix vertes de *Juglans mandshurica*, Il a montré un rôle efficace dans diverses maladies en inhibant la réponse inflammatoire (Ze-Wu Dong and Yu-Fang Yu, 2018). Ces trois métabolites n'avaient jamais été isolés auparavant chez les lichens.

L'analyse HPLC-ESI/MS-MS de l'espèce *Parmotrema hypoleucinum* a révélé que l'extrait éthanolique était constitué des composés polaires pareil pour l'extrait chloroformique ; ces composés ont été plus étudiés biologiquement puisqu'ils sont habituellement des composés majoritaires des lichens. Par exemple Un potentiel antibactérien, antifongique, antioxydant et anticancéreux a été trouvé chez l'acide Protocétrarique, peut être utilisé comme antimicrobien contre les bactéries pathogènes humains (**Nishanth et al., 2015**), ces activités ont été aussi trouvées chez l'acide Norstictique, alors que l'acide Stictique serait neuroprotecteur et antioxydant (**De Paz et al., 2010 ; Papadopoulou et al., 2007**). Pendant ce temps, l'acide Psoromique a montré une activité antioxydante dans les dosages DPPH (Activité de piégeage des radicaux libres), NOR (piégeage des radicaux d'oxyde nitrique) et LPO (dosage de peroxydation lipidique), et effets protecteurs cardiovasculaires de manière concentration-dépendante (**Behera et al., 2012**).

À l'heure actuelle, certaines études in vivo et in vitro ont démontré que certains extraits de lichen et leurs substances actives (telles que le depside 4-0-Demethylbarbatic, le depsidone acide Psoromique, acide Vesuvianique et le Dibenzofurane l'acide (+)-usnique) ont une activité anti-inflammatoire et exercent leurs effets anti-inflammatoires en inhibant les activités de la cyclooxygénase, la lipoxycgénase et la prostaglandine synthase, réduisant le niveau de cytokines et la régulation de la voie du facteur nucléaire kappa-B (NF-κB) (**Studzińska-Sroka & Dubino, 2018**)

L'extrait éthanolique de *Parmotrema hababianum* a exercé les effets antihyperglycémiant et antidiabétiques du lichen, par une réduction significative des taux de glucose, de cholestérol total, de triglycérides, de lipoprotéines de basse densité, de transaminase glutamique pyruvique sérique, de transaminase glutamique-oxaloacétique sérique chez le sang, et des niveaux significativement élevés de lipoprotéines de haute densité et d'insuline (**Ganesan, et al., 2016**). En raison des effets cités ci-dessus, *Parmotrema* pourraient offrir de nouvelles options pour la gestion du diabète.

Nous remarquons, que notre extrait éthanolique est riche en acides gras, dans la plupart ont été identifiés dans les deux extraits précédents cad hexanique et chloroformique parmi lesquelles, on distingue : l'acide 2-Hydroxy-3,4-dioxopentanedioic, l'acide tetrahydroxypentacosanedioic, Icosanedioic acid bis (2,3-dihydroxypropyl) ester, l'acide Tetraglyceryl monooleate, 17-Hydroxylinolenic, l'acide Palmitoleic, l'acide Linoleic, l'acide Palmitic, l'acide Oleic, l'acide Stearic et l'acide Tetracosanoic. En effet les AG sont des constituants des différentes classes lipidiques et une seule petite quantité d'AG sous forme libre est présente, selon la bibliographie, les teneurs des différentes classes lipidiques varient en fonction des espèces lichéniques, des genres, des familles, des facteurs environnementaux et aussi du substrat (**Thi Huyen Vu, 2014**), effectivement, deux espèces épiphytes, *Collema flaccidum* et *Collema fuscovirens* et deux espèces lithophiles *Collema cristatum* et *Collema callopsimum* ont ainsi montré une composition en AG totaux différente selon le substrat (**Temina et al., 2010**)

**Conclusion :**

On remarque que le profil phytochimique de l'extrait Chloroformique et de l'extrait Ethanolique sont presque semblable, tandis que L'acide Stictique, Norstictique, Constictic acid et Criptostictic sont les 4 depsidones qui ont été les plus détectés chez les deux epiphytes investigués, de plus le depside 4-O-Demethylbarbatic et l'aromatique acide Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate ont été aussi identifié comme étant des composés majoritaires dans ces extraits.

Cette diversité de métabolites secondaires témoigne en particulier de la pluralité des voies de biogenèse mises en jeu au sein des lichens.

**3. Profil phytochimique de *Physcia mediterranea* Nimis (Taxon nouvellement identifié en Algérie**

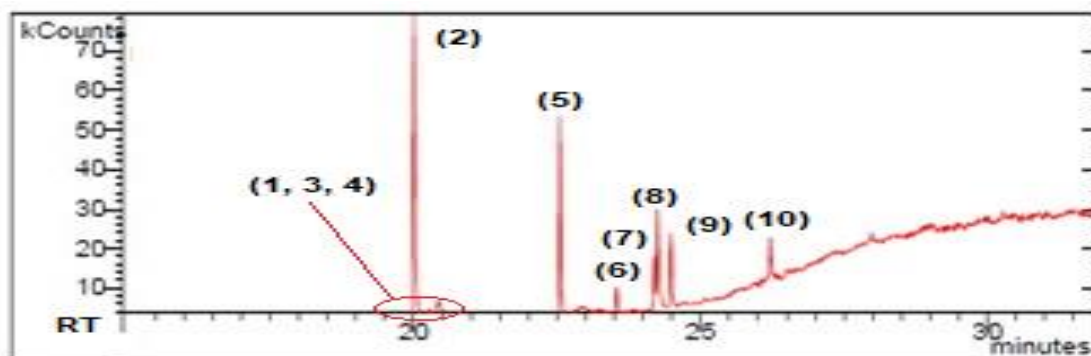
La présente étude apporte de nouvelles données concernant la caractérisation chimique de *Physcia mediterranea* Nimis, une espèce méditerranéenne rare saxicole appartenant à la famille des Physciaceae récolté à Ain Tebib (Secteur Oum toul). Le criblage phytochimique a été effectué à l'aide des techniques GC-MS, UHPLC-ESI-MS-MS et RMN-2D.

**3.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique de *Physcia mediterranea* Nimis par GC/MS**

Analyse de la partie soluble dans le méthanol : 3-hexane, de la partie insoluble dans le méthanol : 3-cire. Les composés identifiés sont présentés avec leur temps de rétention  $t_R$ (min) ou RT ainsi que la formule chimique et le % du composé identifié dans l'extrait.

**3.1.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane (3-hexane) de *Physcia mediterranea* Nimis par GC/MS :**

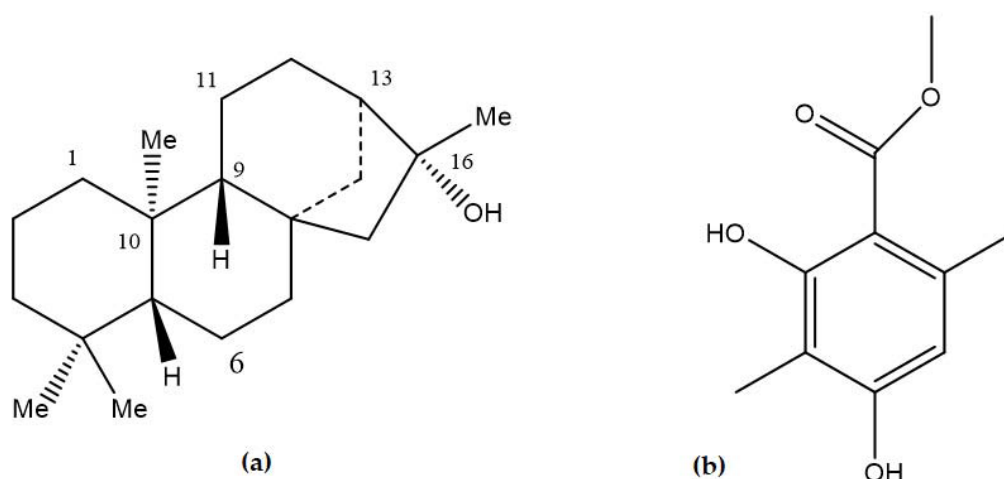
L'analyse GC-MS de l'extrait 3-hexane est illustrée à la **figure 46**. L'analyse nous a permis de détecter **10 composés**. **9 produits** ont été **identifiés** en comparant leurs spectres de masse aux spectres de référence des **bases de données NIST et Wiley (tableau 22)**. Les principaux composés chimiques identifiés dans 3-hexane de *Physcia mediterranea* comprenaient des dérivés d'acides méthylbenzoïques (56 %) et des acides gras libres (36,1 %). Un diterpène à squelette Kauran ((-) -ent-Kauran-16a-ol) (**figure 46**) a également été identifié (3,8 %) (**Huneck et Yoshimura., 1996**). Seuls 2,2% de l'extrait entier n'ont pas été identifiés.



**Figure 46:** Chromatogramme GC-MS de *Physcia mediterranea* (partie 3-Hexane). RT = temps de rétention.

(1), (2), (3), (4) = dérivés d'acides méthylbenzoïques ; (5), (6), (7), (8) = acides gras ; (9) = diterpène ; (10) = inconnu.

Les dérivés des **acides méthylbenzoïques** sont couramment présents dans différents genres de lichens *Stereocaulon halei* (Putra et al., 2020), *Parmotrema mesotropum* (Mallavadhani et al., 2019), *Cassipourea malosana* (Nishiyama et al., 2019), *Cetraria islandica* (Vladimirova et al., 2013), *Usnea longissima* (Akbar et al., 2020), *Stereocaulon paschale* (Carpentier et al., 2017), et *Parmelia sulcata* Taylor (Ari et al., 2015). **Acide atrarique** (Figure 47), largement présent chez certaines espèces telles que *Hypogymnia physodes*, *Evernia prunastri* et *Parmelia sulcata*, poussant sur le même arbre hôte (*Prunus domestica*) (Stojanović et al., 2011), peut être sous forme libre ou complexée et sert de base à la composition des depsides et des depsidones (Hoffmann et al., 2013). Il est considéré comme un antagoniste spécifique des récepteurs aux androgènes et inhibe donc la croissance du cancer de la prostate chez l'homme (Hoffmann et al., 2013 ; Hessenkemper et al., 2014). L'acide atrarique présente des propriétés nématocides, antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires in vitro, et inhibe l'œdème induit par le carraghénane et l'activité de cicatrisation des plaies in vivo (Güvenç et al., 2012 ; Ahad et al., 1991)



**Figure 47:** Structure chimique de (a) (-) -ent-Kauran-16a-ol et (b) de l'acide atrarique.

Les lichens contiennent de nombreux acides gras que l'on trouve couramment dans les plantes supérieures (Yamamoto et al., 1974). En effet, de nombreux genres de lichens communs incluent des espèces avec plusieurs souches d'acides gras (Sonesson et al., 2011; Vu et al., 2016). Ces profils lipidiques, le plus souvent traités comme des chémotypes, ont été utilisés par de nombreux chercheurs pour classer taxonomiquement certains lichens, tels que *Cladonia* (Culberson, 1986), *Lepraria* (Fehrer et al., 2008), *Parmelia* (Hale., 1987), *Tephromela* s.lat (Haugan et al., 1994) et *Mycoblastus sanguinari*. (Spribille et al., 2011). Bien qu'ils soient largement présents dans certains genres, les acides gras n'avaient aucune importance taxonomique et ont été omis lors des premières études chimiques sur les lichens (Spribille et al., 2011; Hawksworth., 1976).

Par comparaisons chimiques et biochimiques, une relation mécaniste entre la biosynthèse des polykétides et des acides gras a été reconnue. Les squelettes carbonés des molécules sont assemblés par condensation successive d'unités acyles (Stocker-Wörgötter, 2008). Un autre

rôle important des acides gras était la transduction du signal cellulaire (**Sumida et al., 1993**) ainsi que la protection chimique. Par conséquent, ils permettent aux lichens de survivre lorsque les conditions environnementales changent (**Meeßen et al., 2013 ; Reyes et al., 1996**)

Dans notre étude, l'acide palmitique est présent en concentration élevée (24 %) par rapport aux acides oléique (4,2 %), stéarique (3,8 %) et linoléique (3,2 %) (**tableau 22**). Divers travaux utilisant différentes conditions de culture expliquent les variations d'acides gras chez les lichens (**Bychek-Gushchina, 1997 ; Torres et al., 2003**).

**Molina et al., 2003** ont étudié le lichen *Physconia distorsiona* et ont suggéré une relation étroite entre la synthèse de métabolites secondaires et le métabolisme des acides gras. Les mycobiotés cultivés dans un milieu enrichi en glucose ont favorisé la production d'acides gras. Un autre facteur important qui pourrait influencer la production d'acides gras dans les lichens est la température. Selon plusieurs études, le degré d'insaturation varie avec la saison et diminue avec l'augmentation de la température (**Dembitsky et al., 1994**).

Dans le thalle de *Teloschistes flavicans*, les acides gras saturés, palmitique et stéarique, étaient plus abondants en février. En revanche, en août, lorsque la température moyenne était de 23°C, il y a eu une augmentation des acides gras oléiques et linoléiques (**Reis et al., 2005**)

Outre le stress dû à la baisse de température, la privation d'azote et l'intensité lumineuse sont également connues pour favoriser l'accumulation d'acides gras (**Reis et al., 2005 ; Goss et al., 2009**). Cependant, ces facteurs ne sont pas nécessairement les paramètres uniques qui déterminent la teneur en acides gras, mais plutôt la génétique, combinée aux conditions environnementales (par exemple, l'altitude, la pollution de l'air, les effets saisonniers), doivent également être pris en compte (**Vu et al., 2016 ; Temina et al., 2010**).

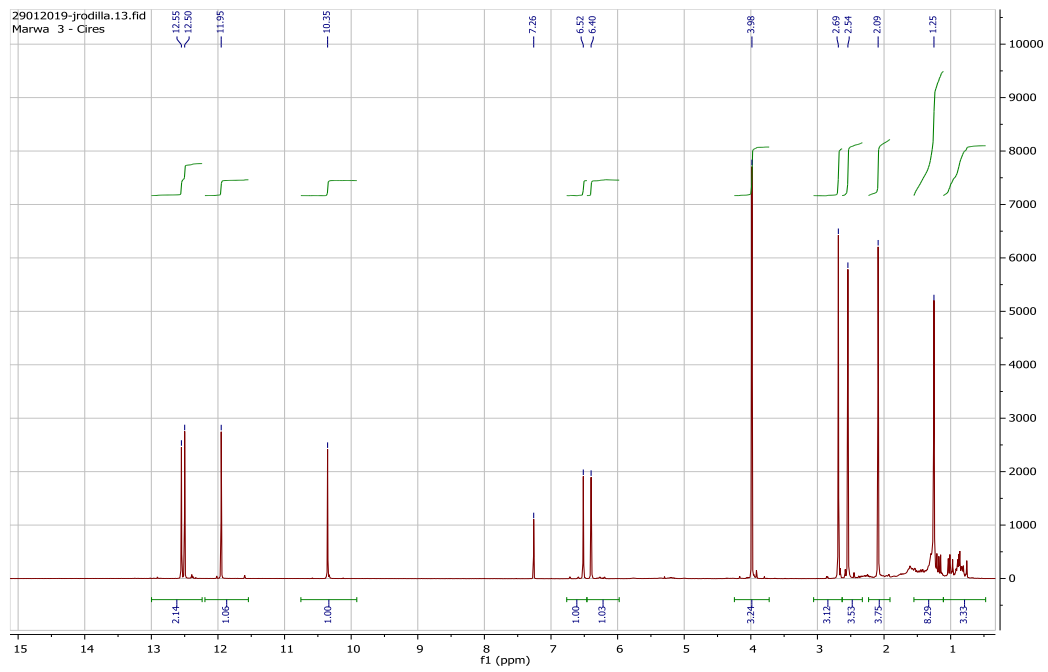
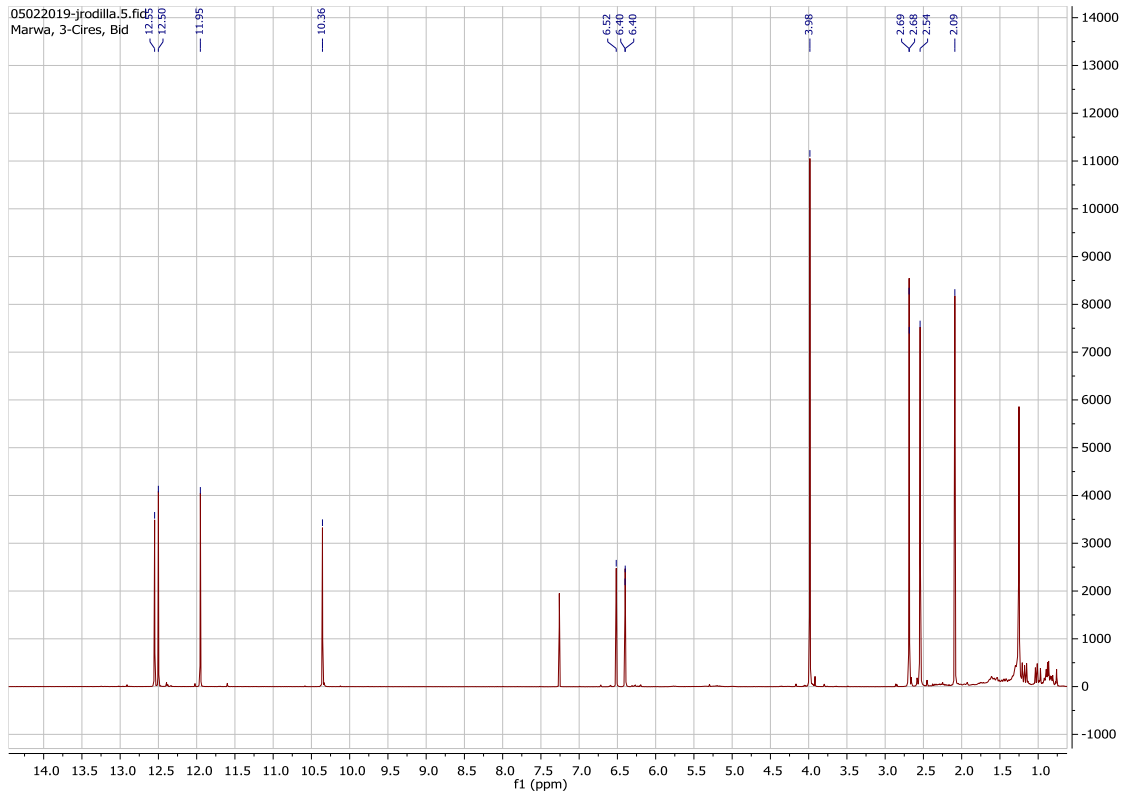
**Tableau 22** : Identification des métabolites dans l'extrait hexanique (3-hexane) de *Physcia mediterranea* par GC-MS.

N°	RT (min)	Nom du composé	Masse	(%)	Synonymes	Formule moléculaire
1	19:56	Methyl 2-hydroxy-4-methoxy-6-methylbenzoate	196	0.3	Acide Orsellinique Methyl Ester 4-Methyl Ether (Sparassol)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
2	20 :01	Methyl 2,4-dihydroxy-3, 5,6-trimethylbenzoate	210	52.3	Derivé d'Acide methylbenzoïque	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
3	20 :43	Methyl 4-hydroxy-2-methoxy-3,6-dimethylbenzoate	210	1.1	acide 2-metoxy-Atrarique	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
4	20 :64	Methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate	196	2.3	Acide atrarique	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
5	22 :55	Methyl hexadecanoate	270	24.2	Acide palmitique	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
6	23 :53	13-Methyl-17-norkaur-15-ene	272	2.4	–	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>
7	24 :19	Methyl cis, cis-9,12-octadecadienoate	294	3.2	Acide linoléique	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
8	24 :25	Methyl (Z) -9-octadecenoate	296	4.9	Acide oleique	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
9	24 :48	Methyloctadecanoate	298	3.8	Acide stearique	C <sub>2</sub> OH <sub>34</sub> O
10	26 :21	Non identifié	376	2.2	–	–

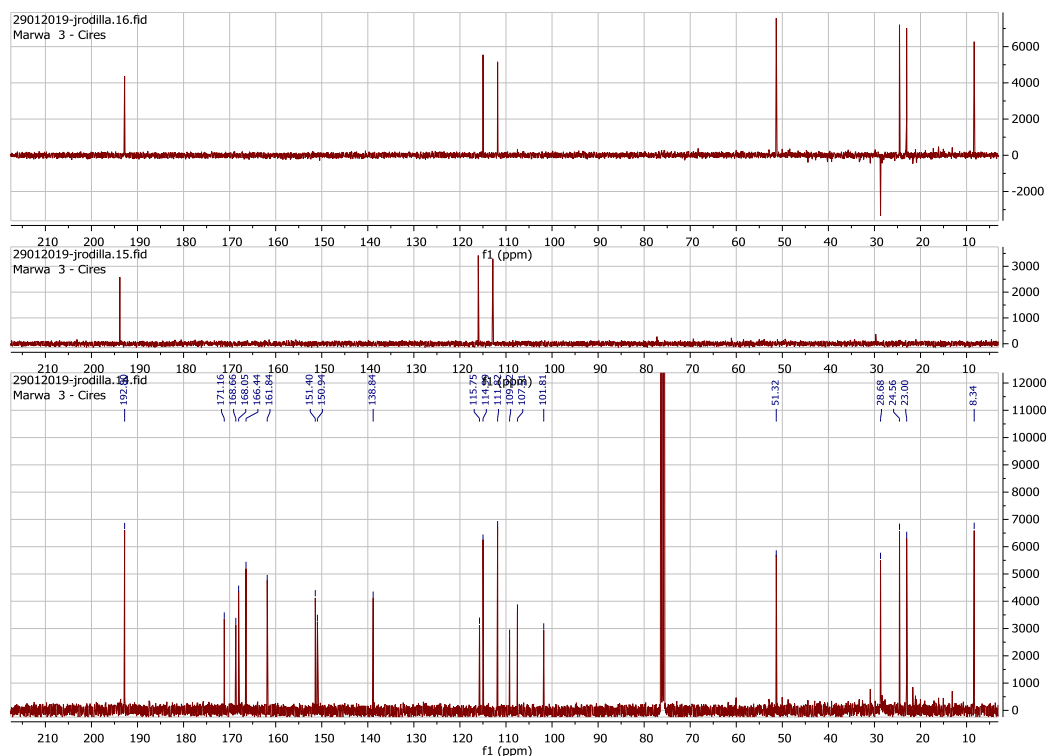
### 3.2 Elucidation structurale de l'Atranorine isolé de l'extrait 3-cire insoluble dans le MeOH de *Physcia mediterranea* Nimis par Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire bidimensionnelle (RMN- 2D)

La spectroscopie RMN en deux dimensions ou spectroscopie RMN bidimensionnelle ou encore RMN-2D est un ensemble de dispositifs de reconnaissance de relations de proximité, dans l'espace ou à travers les liaisons, entre plusieurs noyaux actifs en RMN. Il s'agit de RMN de corrélation.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 12.55 (s, 1H), 12.50 (s, 1H), 11.95 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 6.45 – 6.08 (m, 1H), 3.98 (s, 3H), 2.69 (d, *J* = 0.9 Hz, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.09 (s, 3H).



### RMN de C – 13:

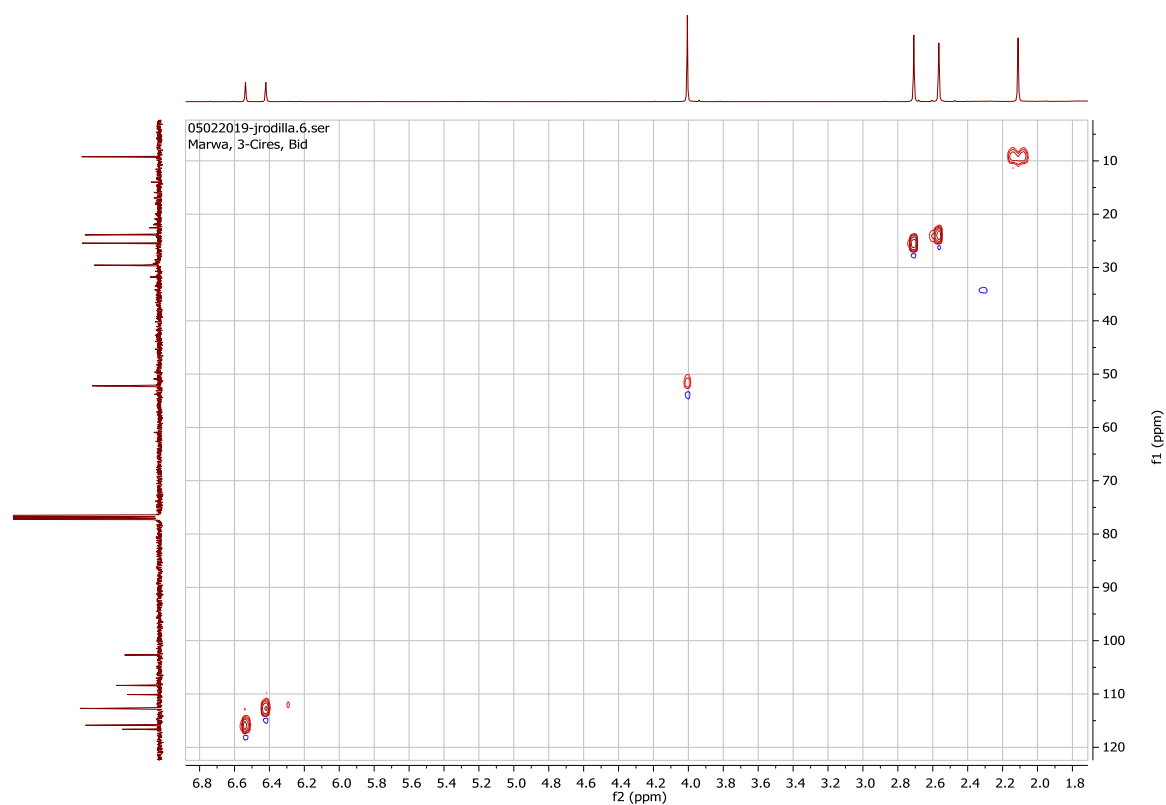
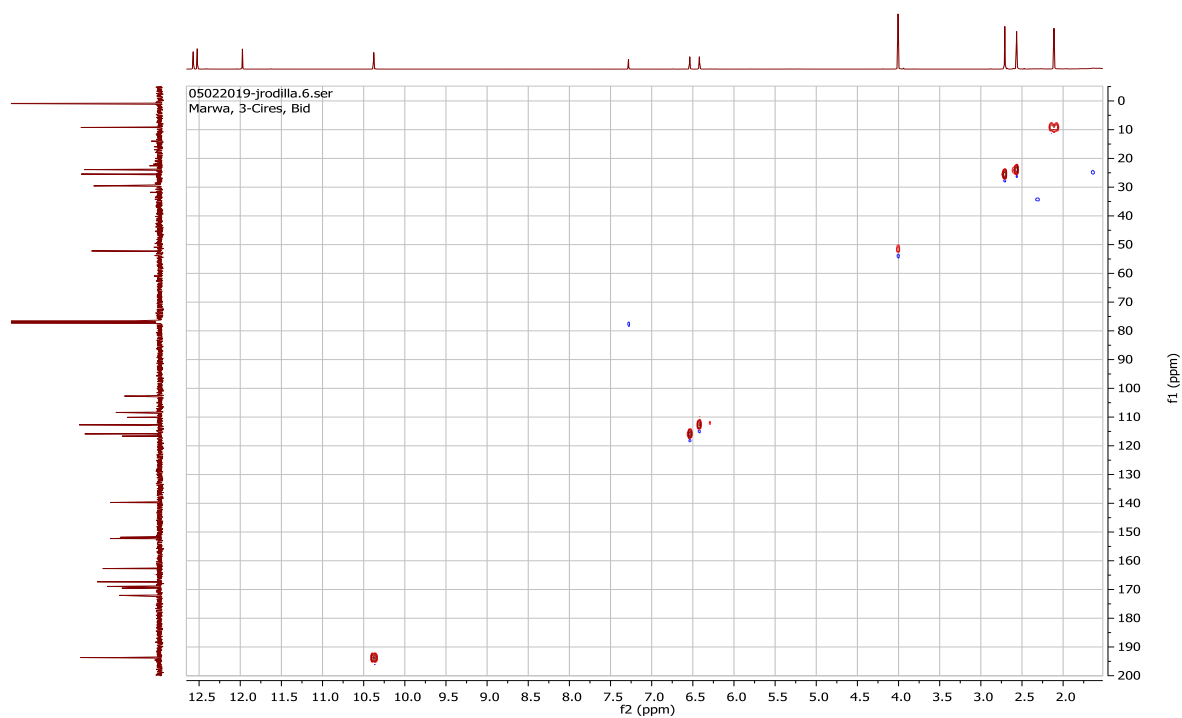


La RMN du proton montre les signaux des atomes d'hydrogène que nous avons dans la molécule d'atranorine.

Le spectre RMN du C-13, montre les atomes de carbone que présente la structure de l'atranorine, le spectre inférieur montre tous les carbones de la structure.

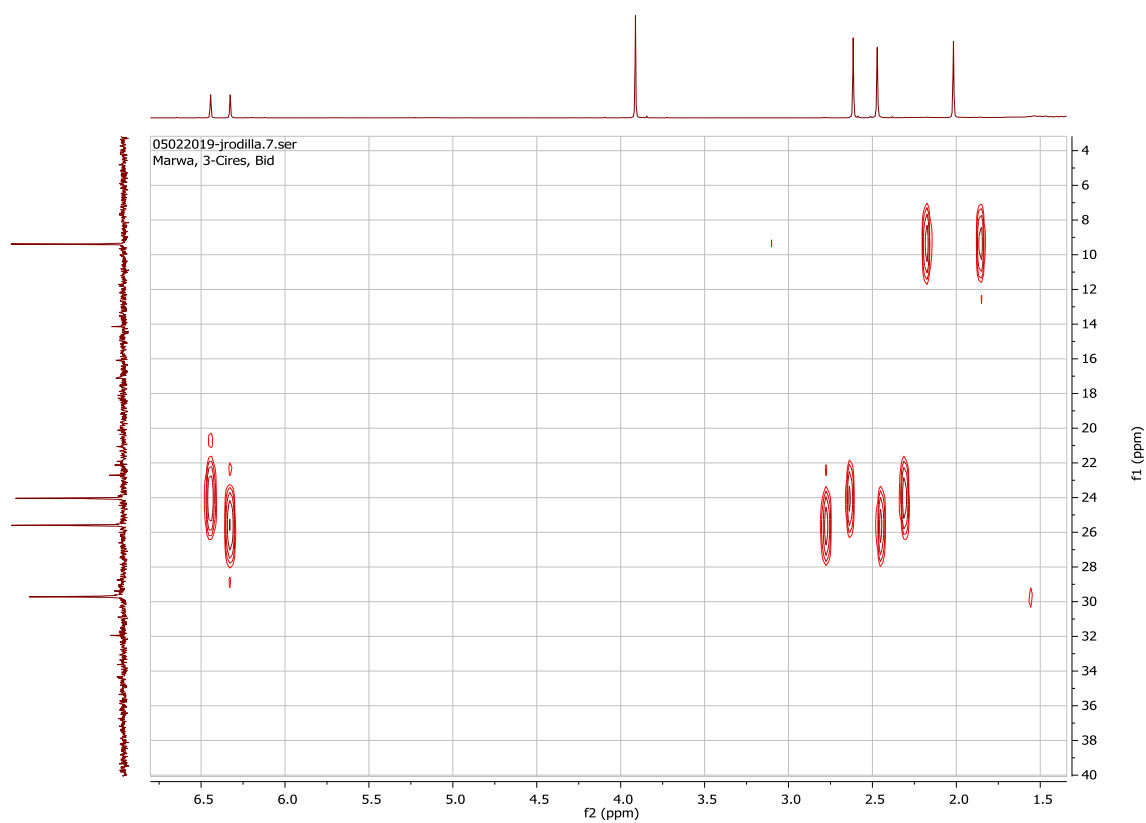
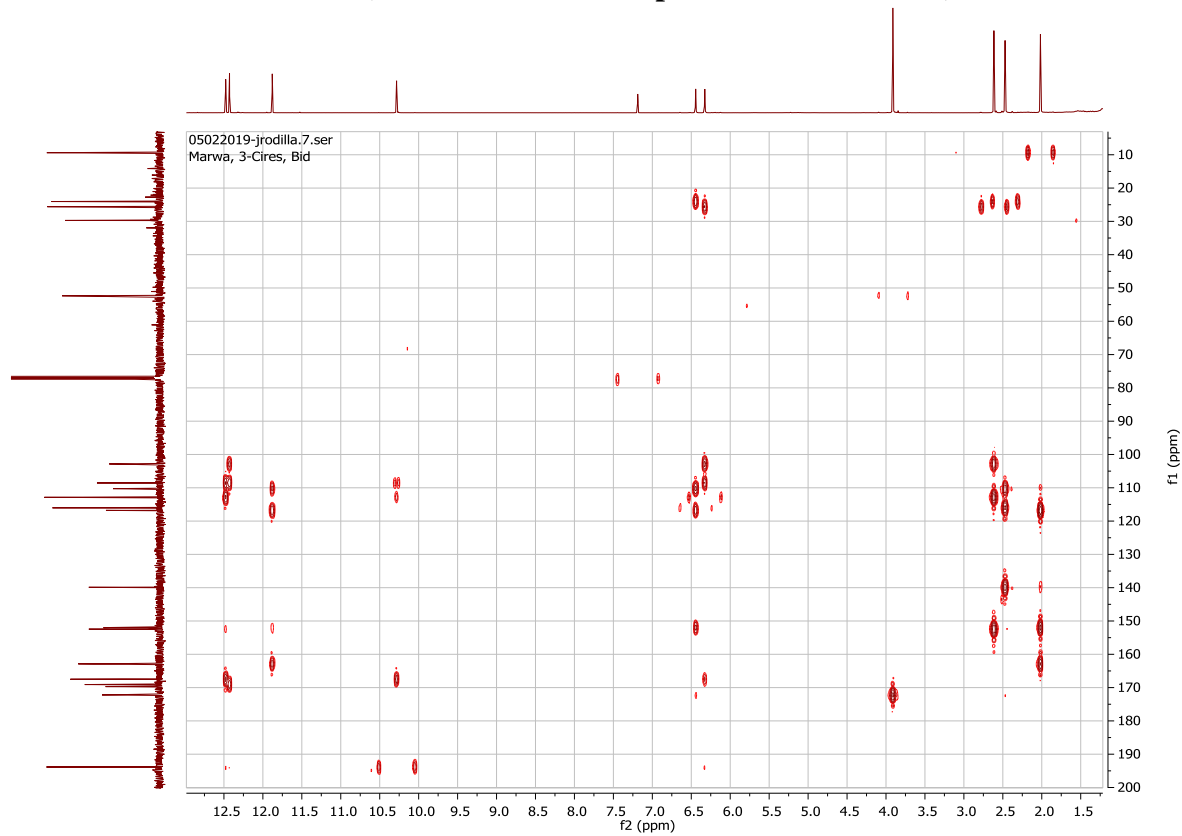
Le spectre moyen ne montre que les carbones qui sont attachés à un atome d'hydrogène (CH). Dans le spectre supérieur, nous avons les carbones avec un hydrogène (CH) et les carbones qui sont liés à 3 hydrogènes (CH<sub>3</sub>). Les carbones qui ont deux hydrogènes attachés seraient dans ce spectre supérieur et seraient des pics négatifs, dans ce cas la molécule d'atranorine n'en a pas.

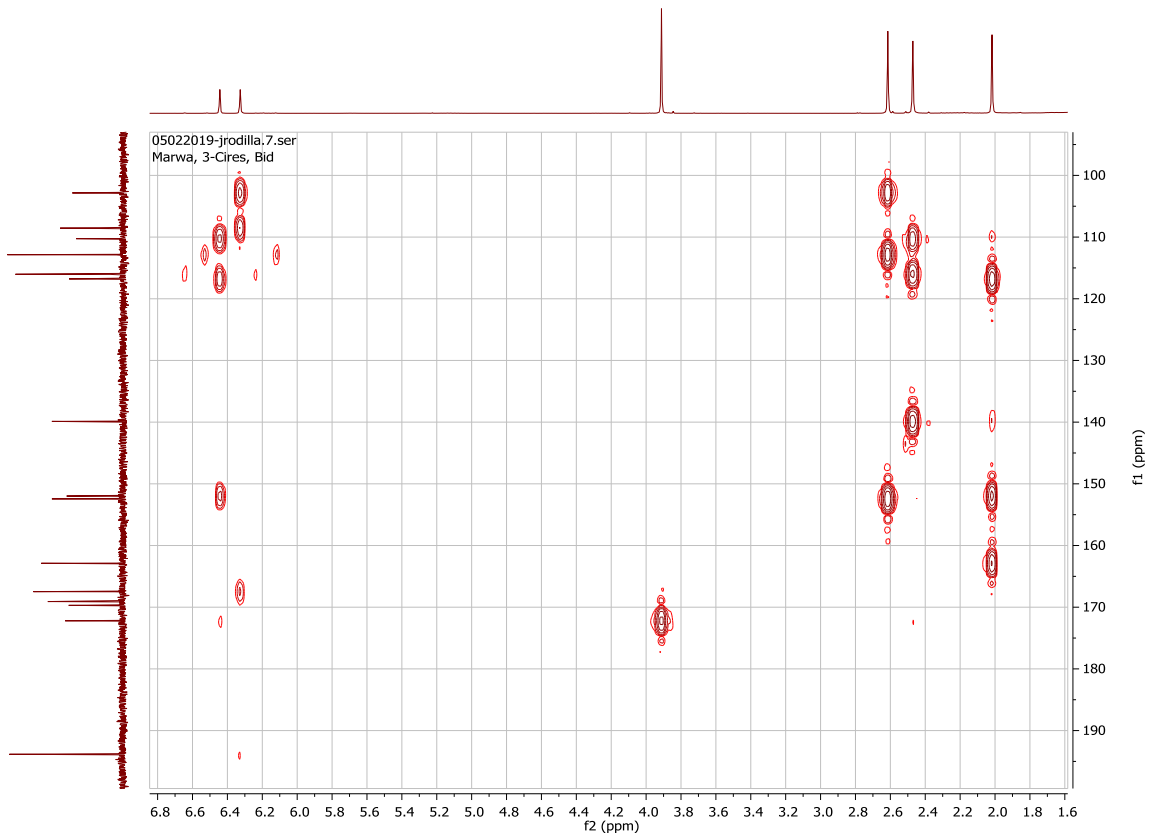
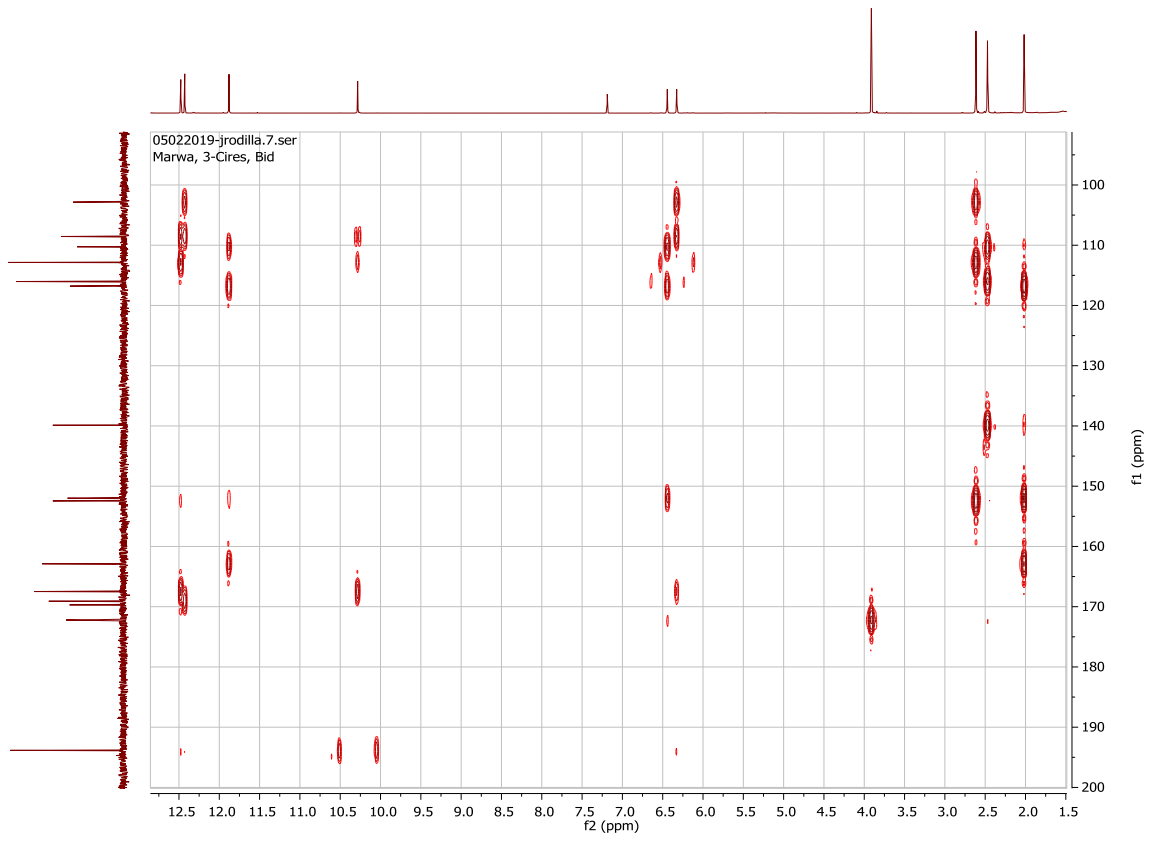
### 3.2.1. Corrélations HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)



Les corrélations **HSQC** sont un spectre bidimensionnel qui corrèle les atomes de carbone avec les atomes d'hydrogène qui sont directement attachés à ces carbones (carbones et hydrogènes liés).

### 3.2.2. Correlation HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)





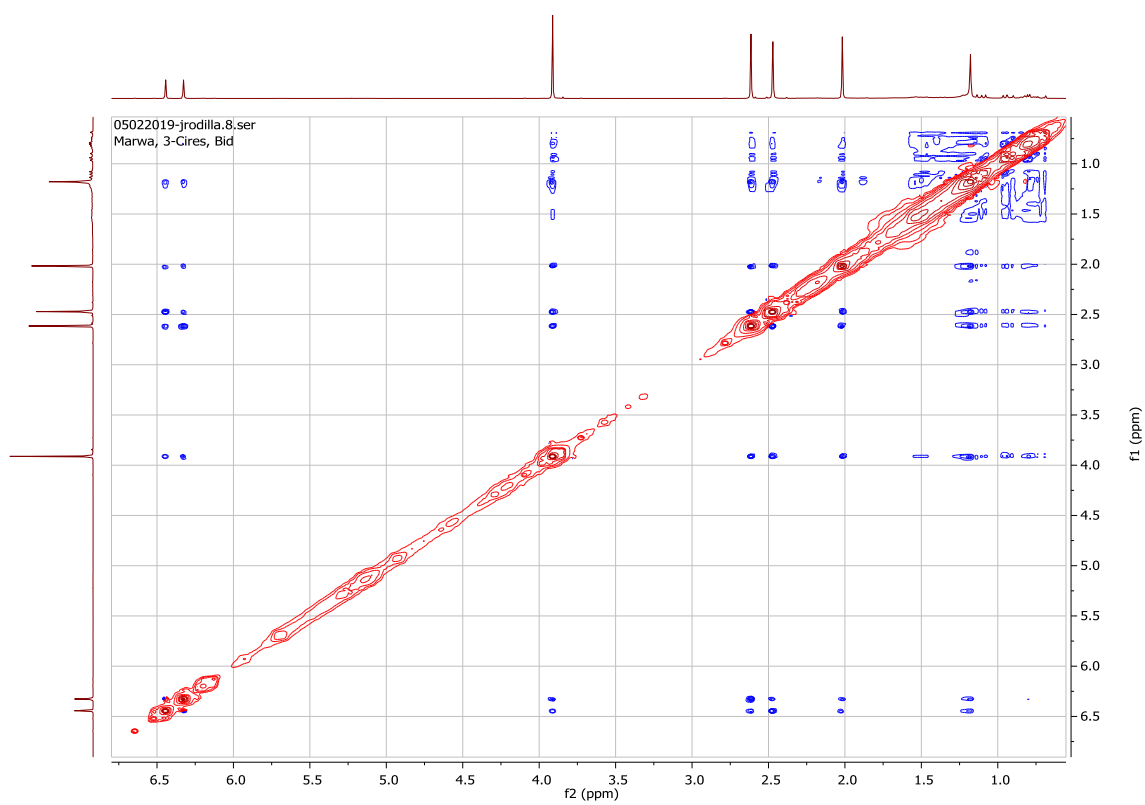
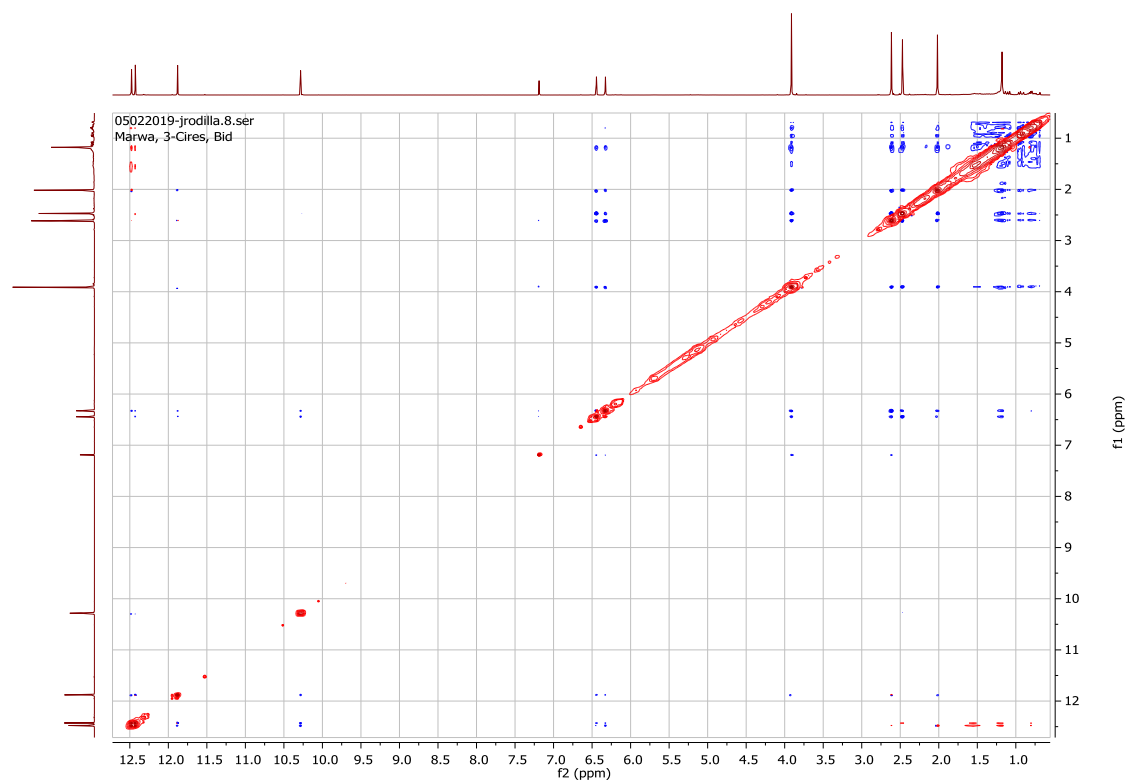


Les **corrélations HMBC** sont un spectre bidimensionnel entre les atomes de carbone et les atomes d'hydrogène que l'on peut trouver à une plus grande distance. Dans ce spectre on observe pour chaque carbone les atomes d'hydrogène qui sont distants de deux et trois liaisons. On peut aussi faire l'inverse pour chaque atome d'hydrogène que les atomes de carbone soient à son voisinage, distants de deux ou trois liaisons.

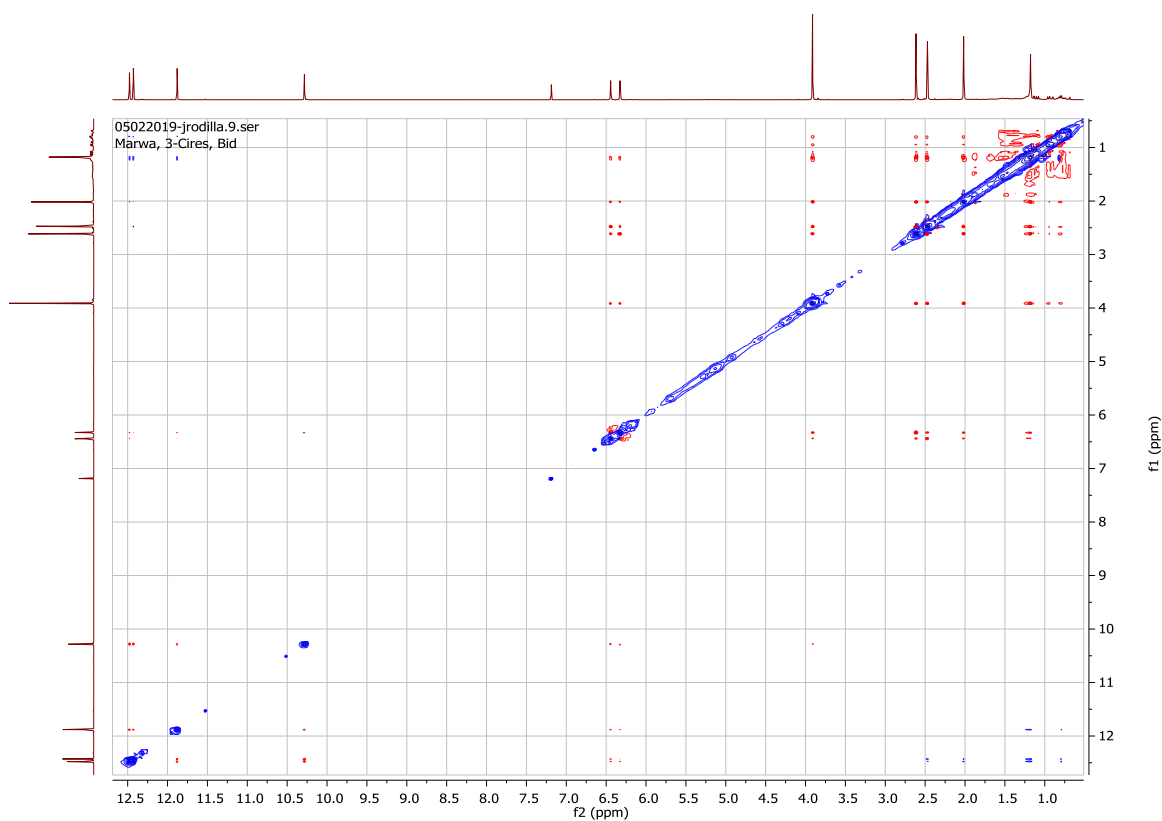
### 3.2.3. Corrélation NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

Le spectre bidimensionnel de **NOESY** montre toutes les corrélations spatiales H-H de la structure de la molécule. Tous les atomes d'hydrogène de la molécule sont des singulets, ils ne sont pas séparés par des atomes d'hydrogène voisins, c'est pourquoi nous ne pouvons observer que des corrélations spatiales de proximité.

La même chose se produit avec le spectre bidimensionnel de **ROESY**



### 3.2.4. Correlation ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy)

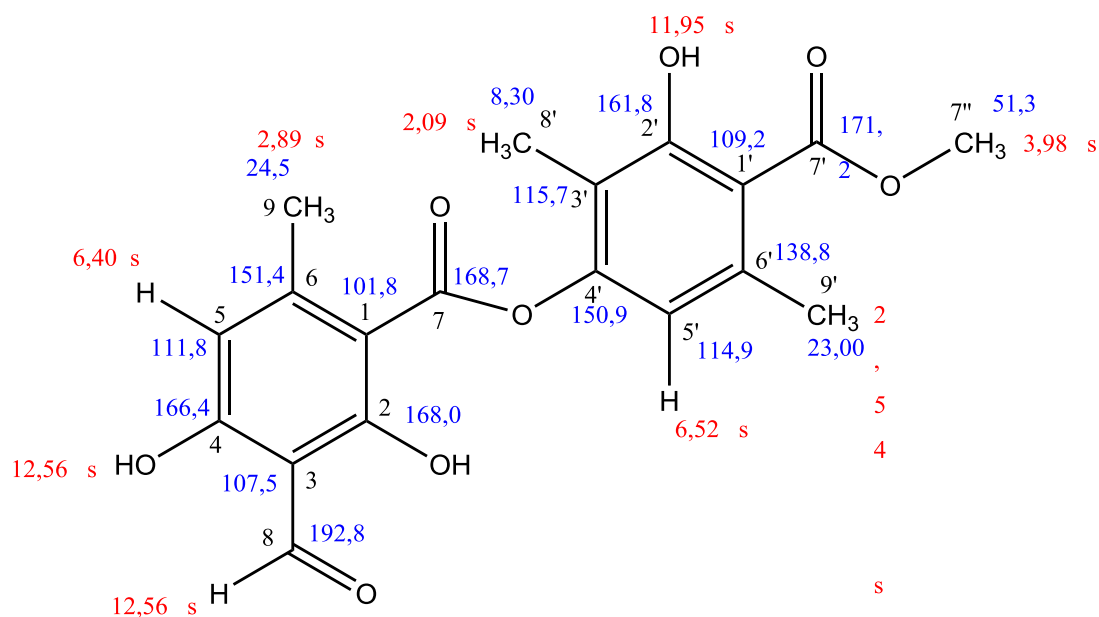


Les corrélations NOESY et ROESY sont des corrélations homonucléaires, des corrélations d'atomes d'hydrogène spatialement proches. Cette technique est utilisée pour visualiser des structures tridimensionnelles.

**Tableau 23:** Informations spectroscopiques RMN du proton et C-13 et corrélations H-C

Position du squelette de carbone	$\delta$ (ppm) du carbone	$\delta$ (ppm) du proton	Corrélations HMBC
1	101.8	--	----
2	168.0	---	----
3	107.5	---	----
4	166.4	---	----
5	111.8	6.40, 1H, s	9, 1, 3, 4
6	151.4	---	----
7	168.7	----	----
8	192.8	10.35, 1H, s	3, 4, 5
9	24.5	2.89, 3H, s	1, 5, 6
1'	109.2	----	----
2'	161.8	----	----
3'	115.7	----	----
4'	150.9	----	----
5'	114.9	6.52, 1H, s	1', 4', 5', 9',
6'	138.8	----	----
7'	171.2	----	----
8'	8.3	2.09, 3H, s	2', 3', 4',
9'	23.0	2.54, 3H, s	1', 5', 6'
7''	51.3	3.98, 3H, s	7'
HO-2	-----	12.50, 1H, s	1, 2, 3
HO-4	-----	12.56, 1H, s	3, 4, 5
HO-2'	-----	11.95, 1H, s	1', 2', 3',

Toutes ces observations déterminent dans la structure de **l'atranorine** quelle est la position correcte de chaque carbone et peuvent être attribuées à chaque atome d'hydrogène.



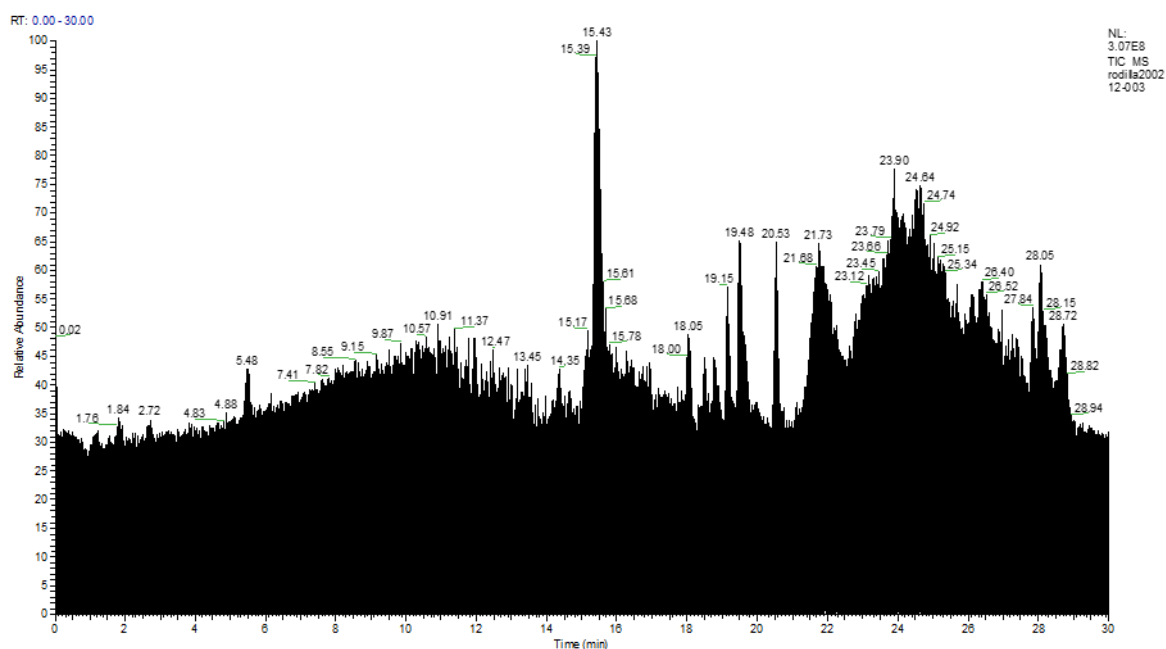
Selon le tableau de corrélation et la figure de structure, les valeurs de RMN du proton sont indiquées en **rouge** pour chacun des **hydrogènes**.

En **bleu**, l'attribution des valeurs de **carbone 13** du spectre à la structure.

### 3.3. Analyse chimique de l'extrait hexanique (3-hexane) de *Physcia mediterranea* Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS :

Dans la présente étude, l'analyse du profil phytochimique de (3-hexane) à l'aide de HPLC-ESI-MS/MS, en mode ions négatifs, a abouti à la détection de **54 composés** significatifs indiqués sur la **figure 48**. Seuls quatre composés n'ont pu être identifiés. Les composés identifiés sont des acides paraconiques et aliphatiques, des polycétides aromatiques (depsides, depsones et éthers phénoliques), des acides phénoliques, des lactones sesquiterpènes, des triterpènes, des types carboxybenzaldéhyde et carboxyphtalide (**tableau 24**).

Les données LC/MS des composés caractérisés, à savoir le temps de rétention (RT), masse précises [M - H] des ions pseudo-moléculaire, les fragments d'ionisation obtenus MS et l'attribution de chaque pic sont présentés dans le **tableau 24**



**Figure 48:** Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 3-Hexane

**Tableau 24:** Identification des substances lichéniques de l'extrait (3-Hexane) de *Physcia mediterranea* par UHPLC/ESI/MS/MS.

Pic	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MT (m/z)	Formule moléculaire	Composés Identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)
1	2.72	187.0970	188.1043	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	<b>Acide 3,5-Diméthoxycyclohexanecarboxylique</b>	143,8651 141,867 123,0807
2	2.75	293.0669	294.0741	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	<b>Acide 6-(Hydroxyméthyl) -3,5-bis (méthoxycarbonyl) -2,4 diméthylcyclohex-1-ène-1-carboxylique</b>	249,0771 234,0530 207,0659
3	3.08	243.1239	244.1311	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>	Acide 3, 5,6-Hydroxyméthyl-2,4-diméthylcyclohex-1-ène-1-carboxylique	236,7610 183,1025 176,6474
4	3.15	151.0393	152.0465	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	<b>Atranol</b>	123,0444 105,0335 81,0335
5	3.20	225.1129	226.1201	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	<b>Acide 5-Formyl-3-hydroxyméthyl-2, 4,6 triméthylcyclohex-1-ène-1-carboxylique</b>	110,0362 97,0284 207,1023
6	3.47	199.0973	200.1046	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	<b>Acide 3,5-Dihydroxy-2, 4,6-triméthylcyclohexanecarboxylique</b>	183,4492 162,8385 114,9508
7	3.58	149.0237	150.0310	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Acide 4-Formylbenzoïque	90,9224 106,9892 91,9303
8	3.82	241.1081	242.1153	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	<b>Acide 5-Formyl-3,6-dihydroxyméthyl-2,4-diméthyl cyclohex-1-énecarboxylique</b>	218,8167 172,6485 69,0333
9	4.10	201.1129	202.1202	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	Acide 2,4-Dihydroxy-3, 5,6-triméthylcyclohexane-1-carboxylique	164,8350 197,6263 139,1124
10	4.95	199.1337	200.1409	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	Acide 2-Hydroxy-10-undécénoïque	162,8384 164,8355
11	5.00	185.0006	186.0079	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> ClO <sub>3</sub>	<b>Chloroatranol</b>	141,8674 159,8779
12	5.21	169.0863	170.0936	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	<b>Acide 4-Hydroxy-2,5-diméthylcyclohex-1-ène-1-carboxylique</b>	140,9478 124,9796 104,4180
13	5.49	163.0392	164.0470	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Acide p-Coumarique	65,0022 77,0386 119,0494 166,2639
14	5.60	209.1181	210.1253	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	Acide 6- (1-Oxopentyl) -1-cyclohexène-1-carboxylique	146,9850 164,8947 105,0336
15	5.87	215.1286	216.1359	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Acide Undécanedioïque	153,1279 197,1179
16	6.57	227.1288	228.1360	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	Acide trans-Dodéc-2-énoïque	122,9842 103,9192 147,9846
17	7.44	282.2078	283.2150	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	Acide N-Dodécanoyl-L-Homoserine lactone	139,1121 183,1027 238,2175
18	9.53	243.1601	244.1675	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	Acide Tridécanedioïque	183,1025 146,9606 118,9653
19	10.59	311.2230	312.2302	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	Acide 9Z-Octadécénoïque	155,1069 181,1228 183,1021
20	10.87	233.1547	234.1619	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	<b>Acide Fukinanolide</b>	101,0039
21	10.89	323.2230	324.2303	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	Acide allo-Protolichésterinique	305,2125 261,2225
22	12.28	313,2388	314.2266	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	Acide Octadécénoïque	183,1386 99,0805 129,0912
23	13.04	389.1245	390.1315	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	<b>Acide 8-Hydroxydiffractaïque</b>	163,0393 149,0236 325,0719
24	13.34	293.2124	294.2202	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	Acide 2-Hydroxylinoléique	277,1021 235,171 195,1383
25	13.58	291.1968	292.2041	C <sub>18</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	Acide α-Licanique	125,0961 97,0647 231,1753
26	14.38	295.2279	296.2351	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	Acide 2-Hydroxylinoléique	183,1022 155,1069 139
27	14.40	295,2278	296,2352	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	Acide 18-hydroxylinoléique	277,218 254,0209 171,1021
28	15.19	297.2436	298.2508	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	Acide 9-Oxoctadécénoïque	171,102 155,1069 279,2333

29	15.25	295.2280	296.2351	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	Acide Coriolique	155,144	125,097 251,2403
30	15.36	297.2435	298.2508	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	Acide Ricinoleique	171,102	279,2333 155,1069
31	15.43	177.0187	178.0259	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Acide 6,7-Dihydroxycoumarin	68,9971	
32	15.46	365.2330	366.2403	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	<b>Acide Muronique</b>	277,2536	57,0334 251,8486
33	16.37	471.3481	472.3553	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	Non identifié	–	
34	16.47	210.9834	211.9873	C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> ClO <sub>4</sub>	Acide 7-chloro-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carboxylique	–	
35	16.51	407.0540	408.0611	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> ClO <sub>8</sub>	<b>Chloroatranorin</b>	–	
36	17.59	387.2544	388.2616	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	Non identifié	–	
37	17.68	389.1242	390.1314	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	<b>Acide Leprolomin</b>	163,0393	149,0236 325,0717
38	18.04	253.2173	254.2244	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Acide Palmitoleique	83,0494	110,9479 145,869
39	18.33	241.2172	242.2245	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Acide Pentadecanoique	134,894	99,9254 182,5761
40	18.35	455.3531	456.3605	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	<b>Acide Ursolique</b>	352,1682	
41	18.50	279.2330	280.2403	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Acide Linoléique	96,9591	208,467
42	18.66	299.2595	300.2667	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	Acide 2-Hydroxyoctadecanoique	59,0127	
43	18.78	279.2332	280.2403	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Acide Linoléique	96,959	175,9179 161,5806
44	19.16	255.2329	256.2401	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Acide Palmitique	158,1438	174,6323
45	19.49	281.2485	282.2559	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Acide Oléique	96,959	235,1344 213,5261
46	19.62	269.2488	270.2561	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Acide 15-Methylhexadecanoique	230,4065	182,5247 143,8039
47	19.89	269.2488	270.2561	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Acide Heptadecanoique	98,9549	235,744 187,0438
48	20.07	327.2543	328.2616	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>	Acide 2-Hydroxyeicosanoique		
49	20.54	283.2643	284.2716	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Acide Stéarique	227,2842	194,5713 261,6109
50	20.74	309.2801	310.2875	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	Acide Eicosenoique	96,959	122,9747
51	21.14	297.2801	298.2873	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	Acide Nonadecanoique	183,0117	
52	21.70	311.2957	312.3029	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	Acide Arachidique	–	
53	22.68	637.4841	638.4908	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>	Non identifié	–	
54	24.51	605.3483	606.3561	C <sub>37</sub> H <sub>50</sub> O <sub>7</sub>	Non identifié	–	

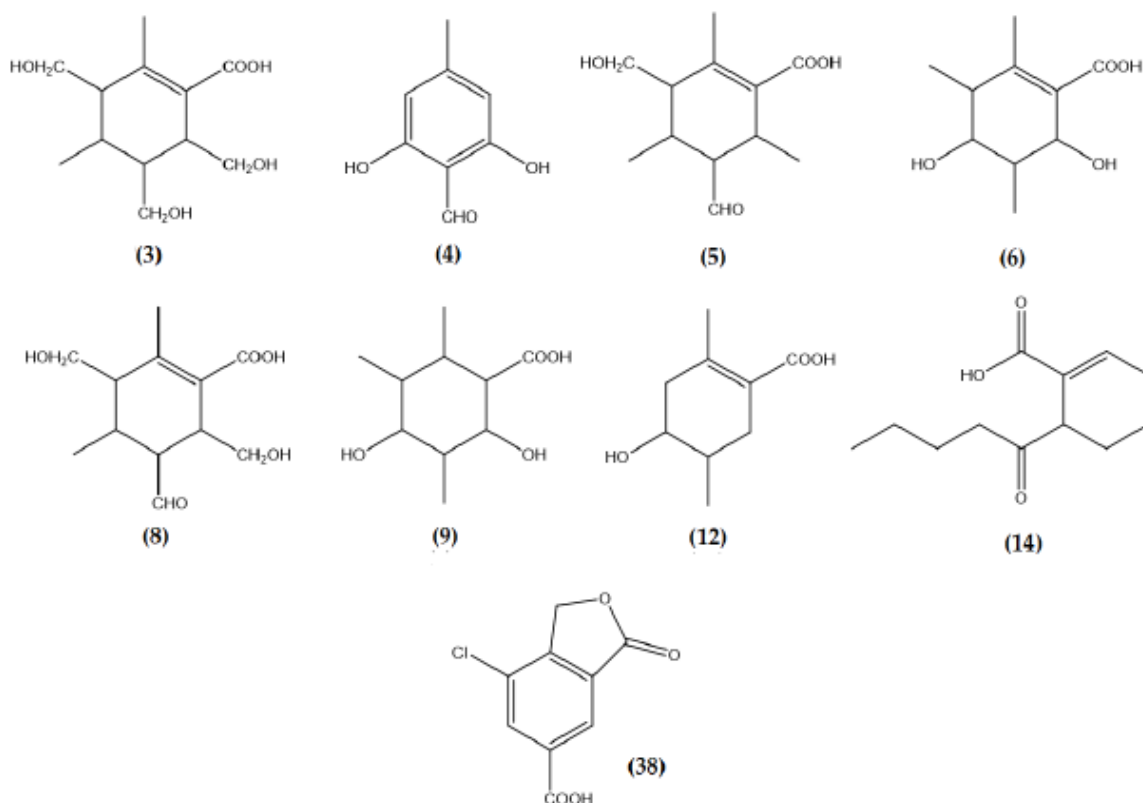
**37 acides paraconiques et aliphatiques (figure 48)** correspondant aux pics 1–3, 5, 6, 8–10, 12,14–19, 22, 24–30, 38, 39 et 41–52 ont été identifiés par UHPLC/ESI/MS /MS. L'acide 3,5 diméthoxycyclohexanecarboxylique a été identifié comme étant le pic 1 (anion moléculaire à m/z 188,1043). La fragmentation du **pic 1** a produit des ions à m/z 143,8651 et 141,8670 [M - H] -. Le **pic 2**, avec un ion [M - H] - à m/z 294,0741, était identifié comme acide 6-(hydroxyméthyl)-3,5-bis (méthoxycarbonyl)-2,4-diméthylcyclohex-1-ène-1-carboxylique . Le **pic 3** a été identifié comme étant l'acide 3,5, 6-hydroxyméthyl-2,4-diméthylcyclohex-1-ène-1-carboxylique, qui a montré un [M - H] - à m/z 244,1311). **A partir des ions à m/z 226, 1201 [M - H] -, détecté à 3.20 min, le pic 5 a pu être corrélé à l'acide 5-formyl-3-hydroxyméthyl-2, 4,6-triméthylcyclohex-1-ène-1-carboxylique.** La fragmentation de ce pic produit des ions à m/z 207,1023 et 97,0284 confirmants cette structure. Le **pic 6** a été identifié comme 3,5-dihydroxy-2, 4,6-triméthylcyclohexènegarboxylique acide (anion moléculaire à m/z 200,1046). Le pic 8 avec un ion [M - H -] - à m/z 242,1153 a été identifié comme étant l'acide 4-O-déméthylbaeomycesique. L'acide 2,4-dihydroxy-3, 5,6-triméthylcyclohexane-1-carboxylique correspond au **pic 8** ([M - H] - à m/z 202,1202). La fragmentation de ce

composé a produit trois ions à  $m/z$  197,6263, 164,8350 et 139,1124 confirmants sa structure. L'ion qui a été obtenu en mode négatif à  $m/z$  170,0936 est associé au composé l'acide 4-hydroxy-2,5-diméthylcyclohex-1-ène-1-carboxylique correspondant au **pic 12**.

Selon les résultats (**tableau 24**), **4 composés depsides** ont été **identifiés** correspondant aux **pics 4, 11, 23 et 35** dans l'extrait 3-Hexane. Le **pic 4** a été identifié comme étant l'**Atranol** (**figure 49**) (anion moléculaire à  $m/z$  152,0465). Le **Chloroatranol** et l'acide 8-hydroxydiffractaïque identifiés aux pics **11 et 23** ont respectivement des ions à  $m/z$  186,0079 et à  $m/z$  390,1315.

La **Chloratranorine** (**pic 35**), est détecté à  $m/z$  408,0611. Une **depsone** appelée **acide allo-protolichesterinique** (C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>4</sub>), a également été détectée dans l'extrait 3-Hexane. Il correspondrait au **pic 21**. En outre, deux acides phénoliques ont été identifiés, correspondant aux pics 13 et 31 : l'acide p-coumarique et la dihydroxycoumarine. Ils ont montré respectivement des ions [M - H] - à  $m/z$  164,0470 et à  $m/z$  178,0259

Le **pic 34** a été identifié comme étant d'acide 7-chloro-3-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-5-carboxylique (carboxyphtalide).

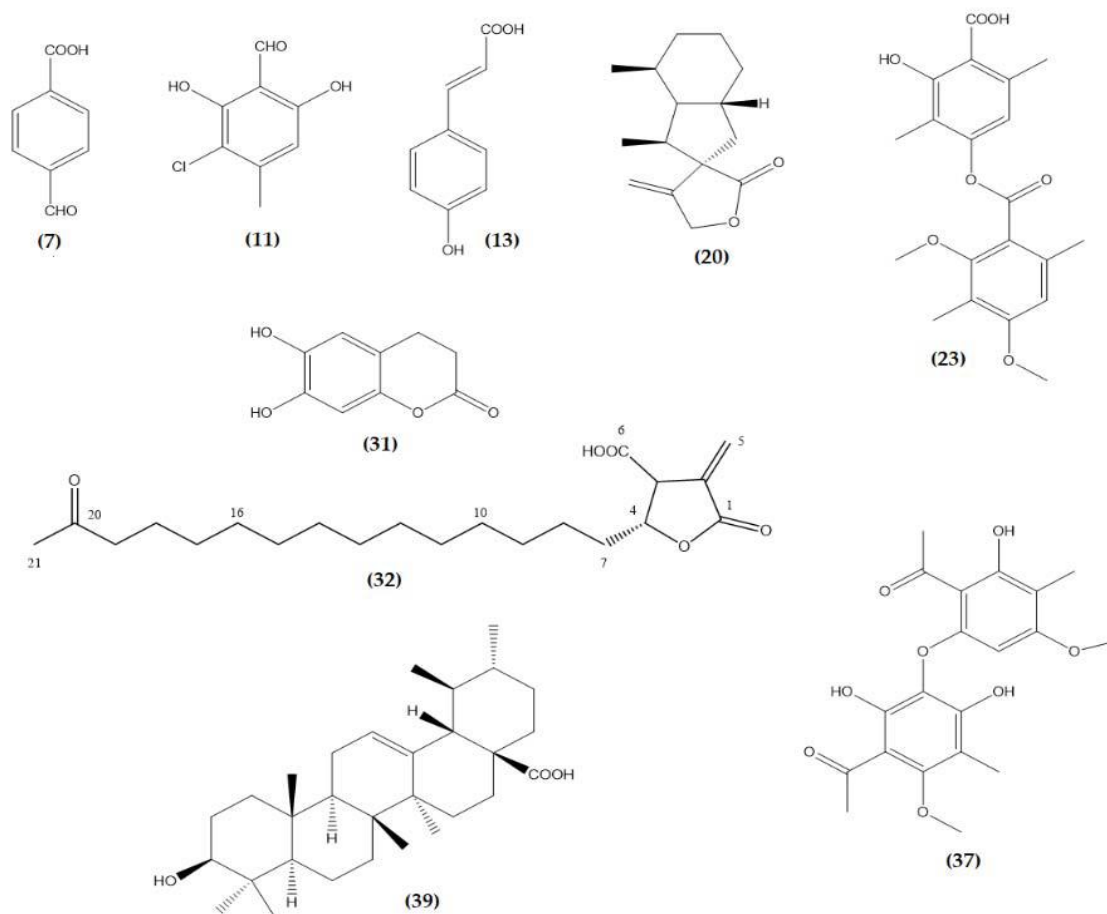


**Figure 49:** Structure chimique des composés 3, 4, 5, 6, 8, 9, 12, 14 et 38 identifiés dans le 3-Hexane de *Phyiscia mediterranea* Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS

Il en est de même pour les composés fukinanolide (lactones sesquiterpéniques) au **pic 20** et léprolomine (diphényléther) au **pic 37**. Ils ont montré respectivement un ion [M - H] - à  $m/z$

312,2302 et 366,2403. Selon l'étude de **Zhang et al., 2016**, le **fukinanolide**, également appelé bakkénolide A, extrait de la plante *Petasites tricholobus*, a montré des propriétés anti-inflammatoires dans le traitement des leucémies (**Zhang et al., 2016**). Dans le groupe des lichens, le sesquiterpène n'a été identifié que chez *Cetraria islandica* (**Solberg, 1986**).

Enfin, **deux triterpènes, l'acide muronique** présenté par le **pic 32** et **l'acide ursolique** au **pic 40**, ont également été identifiés (**Figure 50**) et ont produit des ions majeurs à  $m/z$  390,1314, 456,3605. L'acide muronique a déjà été identifié chez *Usnea rubicunda*, *Usnea subfloridana* (**Simirgiotiset al., 2016**), et *Punctelia microsticta* (**Huneck, 2001**). En revanche, l'acide ursolique (acide  $3\beta$ -hydroxy-urs-12-ène-28-oïque) est répandu dans le règne végétal (Seo et al., 2018). Les espèces lichéniques *Ramalina hierrensis* (**Moreira et al., 2015**), *Ramalina hierrensis* (**Gonzalez et al., 2006**), *Stereocaulon evolutum* (**Vu et al., 2015**) et *Pannaria tavaresii* (**Rubio et al., 2005**) contiennent également ce composé.



**Figure 50:** Structure chimique des composés 7, 11, 13, 20, 23, 31, 32, 37 et 39 identifiés dans 3-Hexane de *Physcia mediterranea* par UHPLC/ESI/MS/MS.

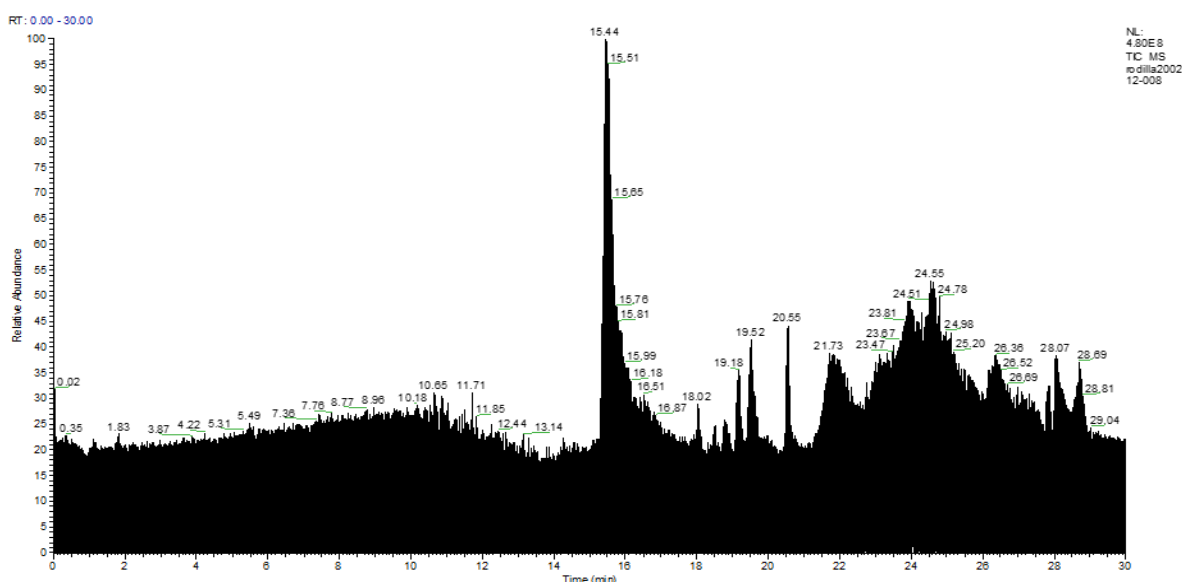
### 3.4 Analyse chimique de l'extrait hexanique (3-cire) de *Physcia mediterranea* Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS :

**45 Composés (Figure 51) ont été détectés** pour la première fois dans 3-Cire (**Tableau 25**) en utilisant LC/ESI/MS/MS en mode négatif. Les **45 composés identifiés** étaient principalement des acides paraconiques et aliphatiques, des depsides (polycétides aromatiques), des composés phénoliques et des diterpènes. Seuls **8 composés n'ont pu être identifiés**.

**L'acide traumatique (pic 5)**, une phytohormone appartenant à la classe des cytokinines, une étude a démontré son influence positive sur les paramètres de stress oxydatif dans des fibroblastes humains normaux (**Jabłońska-Trypuć et al., 2016**). Il est également efficace contre les cellules cancéreuses du sein et possède des propriétés anticancéreuses potentielles et une activité de prévention des tumeurs.

**Trois composés phénoliques** ont été identifiés et attribués aux **pics 4, 8 et 10** à l'aide d'UHPLC-ESI-MS-MS. Le **pic 4** et le **pic 10** ont été identifiés comme étant l'acide p-coumarique et l'acide 6,7-dihydroxycoumarine (**Esculétine**) dont les anions moléculaires étaient respectivement à  $m/z$  163,0395 et 177,0186.

À notre connaissance, c'est la première fois que de tels composés sont trouvés dans des lichens. Ils possèdent diverses propriétés biologiques et pharmacologiques, notamment des activités anti-asthmatiques, anti-inflammatoires, anti-nociceptives, antioxydantes, antitumorales et antivirales (**Lee et al., 2020; Wang et al., 2012; Hongyan, 2016; Han et al., 2017; Srikrishna et al., 2016; Stefanachi et al., 2018**) Le gingerol, un composé phénolique, a été identifié dans l'extrait 3-cire. Son **pic 8** correspondrait à l'ion  $[M - H]^-$  à 293,1762.



**Figure 51:** Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 3-Cire de *physcia mediterranea*.

**Tableau 25:** Identification des substances lichéniques de l'extrait (3-cire) de *Physcia mediterranea* par UHPLC/ESI/MS/MS

Pic	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MT (m/z)	Formule moléculaire	Composés identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)
1	0.03	146.9397	147.9475	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Acide Dihydroxyfumarique	121.7335 103.9193 87.9242
2	1.80	116.9276	117.9354	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Acide Butendioic	109.2366 99.9248 94.7628
3	2.72	187.0971	188.1049	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	Acide 3,5-diméthoxycyclo Hexanecarboxylique	143.8646 123.0809 97.0652
4	5.51	163.0395	164.0473	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	<b>Acide p-Coumarique</b>	150.6340 145.8898 137.8545 117.9279
5	6.57	227.1286	228.1364	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	<b>Acide traumatique</b>	152.9172 149.9434 87.0768
6	7.46	282.2077	283.2155	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>3</sub>	N-dodecanoyl-L-Homoserine lactone	238.2177 183.1021 139.1121
7	8.09	174.9556	175.9634	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Acide 2-Hydroxy-3,4-dioxopentanedioique	132.9812 118.9653 116.9277 99.9246
8	8.15	293.1762	294.1840	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	<b>Gingerol</b>	236.1055 221.1542 192.1152 136.0885
9	14.37	295.2280	296.2358	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	18-Hydroxylinoléique	277.2177 183.1386 238.0103 171.1024
10	15.36	177.0186	178.0264	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	<b>6,7-Dihydroxycoumarin (Esculetin)</b>	107.0129 91.0177 68.9970 65.0022
11	15.44	373.0929	374.1007	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	<b>Atranorine</b>	347.4986 287.3080 177.0187 163.0393
12	16.47	407.0539	408.0617	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	<b>Chloroatranorine</b>	374.2436 210.9801 163.0393 119.0493
13	17.57	277.2175	278.2203	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Acide linolenelaidique	–
14	17.77	265.1480	266.1558	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	Acide (4E, 6E, 9E) -Pentadeca-4, 6, 9-trienedioique	225.9377 195.2177 158.7972 96.9590
15	18.03	253.2331	254.2249	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Acide Palmitoleique	83.0490 149.0573 189.6922 123.8772
16	18.34	241.2173	242.2251	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Acide Pentadecanoique	–
17	18.50	279.0936	280.2409	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Acide Linoléique	96.9594 202.4945 150.7684 132.0134
18	18.91	267.2331	268.2409	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Acide margaroleique	–
19	19.15	255.2329	256.2407	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Acide Palmitique	236.5331 139.4856 230.9335 191.8156
20	19.35	459.3271	460.3349	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	Non identifié	–
21	19.51	281.2487	282.2565	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Acide oleique	103.8178 117.3111 94.59 85.5130
22	19.75	459.3272	460.3350	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	Methyl glucose isostearate	386.3174 332.2710
23	19.89	269.2488	270.2566	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Acide margarique	194.7263 255.1896 185.4663 172.1672
24	19.99	307.2645	308.2723	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Acide 11,14-Eicosadienoique	289.2538 251.7862 96.9588
25	20.07	457.3722	458.3800	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub> O <sub>5</sub>	Non identifié	–
26	20.18	295.2645	296.2723	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Acide 10E-nonadecenoique	–
27	20.54	283.2643	284.2721	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Acide stearique	183.0114 221.2569 168.0114 129.1859
28	20.82	309.2800	310.2878	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	Acide eicosenoique	96.9590 277.9540 241.2167
29	21.71	311.2957	312.3035	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	Acide arachidique	–

30	22.62	297.1532	298.1610	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	NI	–
31	22.77	339.3268	340.3346	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	Acide docosanoïque	–
32	23.08	309.1743	310.1821	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	<b>Portentol</b>	122.9747 96.9590 79.9563
33	23.58	353.2003	354.2081	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	Non identifié	–
34	23.81	311.1689	312.1767	C <sub>13</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	Non identifié	–
35	23.89	367.3579	368.3657	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	Acide lignocérique	349.3456 249.0620 96.9590
36	24.01	397.2266	398.2344	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	<b>Stephanol</b>	351.3650 228.9638 122.9748 96.9590
37	24.60	293.1793	294.1871	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	Acide heptadecatrienedioïque	231.1619 116.6804 96.9590 79.9563
38	24.94	325.1844	326.1922	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	Non identifié	–
39	25.33	395.3895	396.3973	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	Hexacosanoic acid	–
40	25.89	337.2055	338.2133	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	Acide 6-Oxonadeca-8,11-dienedioïque	183.0121 159.6046 122.9749 96.9590
41	26.10	339.2000	340.2078	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	Non identifié	–
42	26.24	381.2317	382.2395	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	Acide 19-Acetoxylichesterinique	122.9748 96.9590
43	26.75	425.2581	426.2659	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	Asebotoxin I	–
44	27.53	321.2106	322.2184	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	Acide nonadecatrienedioïque	287.4028 253.2169 199.1701 96.9590
45	27.85	304.9143	305.9221		Non identifié	–

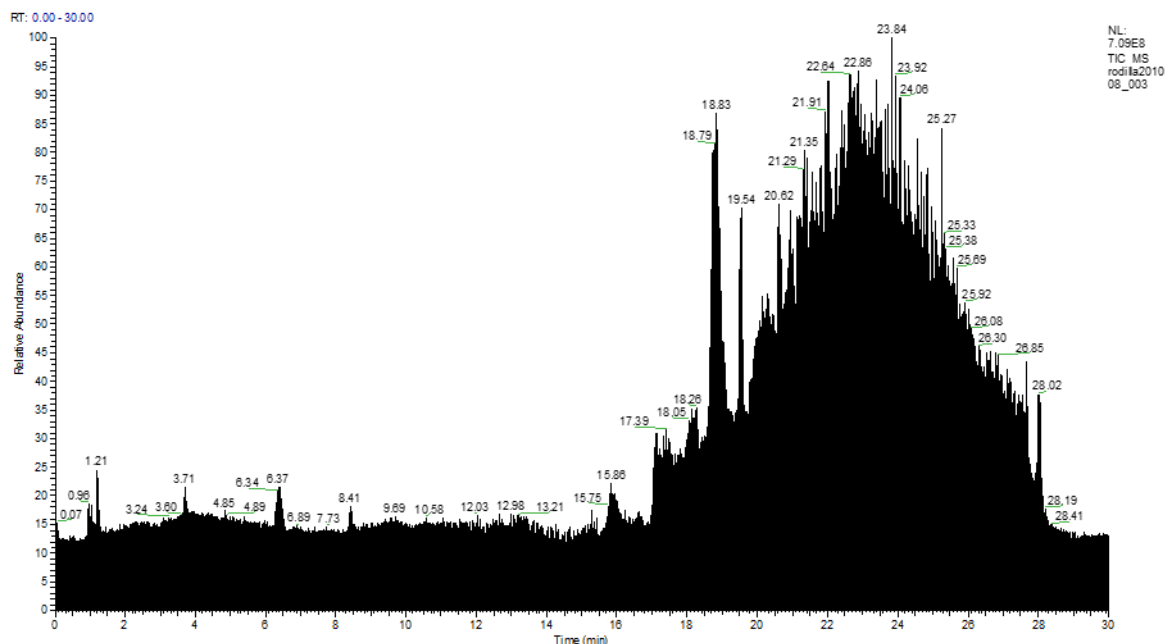
Les pics 11 et 12 ont été identifiés comme **depsides** : **atranorine** ([M - H]<sup>-</sup> ion à m/z 373,0929) et **chloroatranorine** ([M - H]<sup>-</sup> ion à m/z 407,0539).

L'atranorine, un dérivé du β-orcinol, est l'un des métabolites secondaires les plus courants du lichen (Studzińska-Sroka et al., 2017). Il est particulièrement présent dans les familles de lichens Cladoniaceae, Lecanoraceae, Parmeliaceae et Streocaulaceae (Huneck et al., 2004 ; Nybakken et al., 2010 ; Culberson, 1979). Dans les genres *Physcia*, il y a *Physcia caesia* (Elix, 2014), *Physcia aipolia* (Ranković et al., 2008 ; Solhaug et al., 2010), *Physcia alnophila* (Brodo et al., 2013) et *Physcia soresiosa* (Maldonado Montaña et al., 2016). Ces dernières années, l'atranorine a été le composé le plus étudié, considéré comme antioxydant (Kosanić et al., 2014), antimicrobien (Pompilio et al., 2013), anti-inflammatoire (Melo et al., 2011), antinociceptif (Melo et al., 2013), cicatrisant (Barreto et al., 2013) et photoprotecteur (Harikrishnan et al., 2020). De plus, il a exercé de puissants effets inhibiteurs sur la prolifération, la migration et l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules cancéreuses (Galanty et al., 2017).

Le **portentol**, pic 32 (ion [M - H]<sup>-</sup> à m/z 309,1743) et le **stéphanol** pic 36 (ion [M - H]<sup>-</sup> à m/z 397,2266), qui sont des **composés cycloaliphatiques**, ont également été identifiés dans 3-cire). De même pour l'**asébotoxine I**, un **diterpène toxique** a été identifié au pic 43 (ion [M - H]<sup>-</sup> à m/z 425,2581). Il a été initialement et uniquement découvert dans la plante *Pieris japonica* (Hikino et al., 1969), mais nos résultats montrent le contraire, c'est-à-dire que le composé a pu être détecté dans les espèces de lichens.

### 3.5 Analyse chimique de l'extrait chloroformique de *Physcia mediterranea* Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS :

Le profil chromatographique d'extrait chloroformique de lichen *Physcia mediterranea* Nimis est représenté au niveau de la **figure 52** tandis que le résultat des analyses d'identifications en mode négative est présenté dans le **tableau 26**.



**Figure 52:** Chromatogramme de l'extrait chloroformique de *Physcia mediterranea* Nimis.

**Tableau 26:** Identification des substances lichéniques de l'extrait chloroformique de *Physcia mediterranea* Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS

Pic	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MT (m/z)	Formule moléculaire	Composés identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)
1	0.98	174.9557	175.9635	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Acide 2-Hydroxy-3,4 dioxopentanedioïque	118.9654, 90.9703, 146.9608, 105.9574
2	1.05	112.9845	113.9923	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Acide Squarique	68.9946, 85.3754
3	1.12	182.9882	183.9960	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Acide Chelidonique	68.9946, 79.9563, 155.022, 136.5849
5	3.71	313.0357	314.0435	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	Endocrocin	197.0605, 225.0555, 241.0504, 269.0460
6	6.32	209.0849	210.0927	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	Sinapyl alcohol	96.9590, 79.9563
7	7.63	309.1017	310.1095	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	1-O-cis-cinnamoyl-β-D-glucopyranose	80.9641
8	8.41	317.0670	318.0748	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	Acide isolecanorique	123.0442, 167.0343, 149.0237, 105.0335
9	9.54	293.1763	294.1841	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	Nordihydrocapsiate	221.1543, 136.0886
10	10.60	243.1603	244.1681	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	Acide tridecanedioïque	181.1596, 118.9650, 225.1496, 146.9605
11	13.12	265.1482	266.1560	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate	96.9591
12	13.34	467.0985	468.1063	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	Acide Gyrophorique	167.0343, 149.0237, 123.0442, 255.0667
13	14.53	353.2006	354.2084	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	Gracilioether G	96.9590, 122.9748, 183.0117
14	14.58	479.3019	480.3098	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>7</sub>	20-hydroxyecdysone	417.3014, 345.2802, 359.2596
15	15.01	315.2544	316.2622	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	Acide 9,10-Dihydroxystearique	141.1277, 297.2438, 171.1021, 127.1119
16	16.28	297.1532	298.1610	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	Non identifié	183.0116, 216.0097
17	17.14	177.0187	178.0265	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	6,7-dihydroxycoumarine	68.9971, 105.0336
18	17.16	373.0930	374.1008	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	Atranorine	163.0394, 19.0493, 177.0189, 133.0288
19	18.01	311.1690	312.1768	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	heptahydroxytridecanol	183.0116, 170.0039, 239.0745
20	18.32	353.2004	354.2082	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	Acide tetraoxonadecanoïque	96.9590, 122.9748
21	18.36	421.2265	422.2343	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	Sarmentogenine	80.9641
22	19.55	253.2172	254.2250	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Acide palmitoleïque	216.2756, 83.0491, 128.2464, 104.0607
23	19.74	293.1796	294.1874	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	Gingerol	96.9590
24	20.62	255.2329	256.2407	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Acide palmitique	
25	20.88	281.2488	282.2566	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Acide oleïque	206.4382, 138.8067, 119.1887, 100.3896
26	22.86	373.0929	374.1007	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	Acide baemycesique	163.0394, 119.0492, 177.0187

L'analyse de ces résultats montre que l'extrait chloroformique de *Physcia mediterranea* Nimis a permis de caractériser **26 composés** appartenant aux classes chimiques suivantes :

#### Les Acides paraconique et aliphatique :

**Pics 1,2 ,3 et 20** ont été identifiés respectivement comme étant l'acide 2-Hydroxy-3,4-dioxopentanedioïque, acide squarique, l'acide chélidonique et acide tetraoxonadecanoïque, à m/z 174.9557, 112.9845, 182.9882 et 353.2004, leurs identifications est confirmé par les fragmentations à m/z 118.9654, 90.9703, 146.9608 ,105.9574 (**pic 1**), 68.9946, 85.3754 (**pic 2**), 68.9946, 79.9563, 155.022,136.5849 (**pic 3**) et 96.9590, 122.9748 (**pic 20**).

L'acide chélidonique, a été trouvé dans *Chelidonium majus* (Chélidoine) et plusieurs espèces de Papaver (Singhet al., 2016).

#### Les Anthraquinones :

**Pic 5** a été identifié comme l'**acide endocrine** (anion moléculaire à m/z 313.0357), Sa fragmentation a produit des ions à m/z 197.0605, 225.0555, 241.0504 et 269.0460, ce composé a été produit par plusieurs espèces de Penicillium et d'Aspergillus (Dewick, 2009) et trouvé aussi dans diverses espèces de peupliers (Szadkowska et al., 2021).

#### Les Depsides :

Les **Pics 8, 12 et 18** ont été identifiés comme étant l'**acide Isolecanorique** et l'**acide Gyrophorique** et l'**Atranorine** détectés respectivement à m/z 317.0670, 467.0985 et 373.0930.

L'acide isolecanorique est un dérivé de l'acide lecanorique isolé pour la première fois à partir de *Parmelia tinctorum* (Nakashima et al., 2016). De plus L'acide gyrophorique est un composé typique du genre *Umbilicaria*. Il est reconnu chez les espèces de lichens comme un puissant filtre ultraviolet. Le comportement cytotoxique et apoptotique des UVB dans les cellules HaCaT irradiées a été empêché avec succès par l'acide gyrophorique (Rancovic et al., 2008). En plus des opérations photoprotectrices, cet acide a des effets antimicrobiens et antifongiques (Buçukoglu et al., 2013). En outre, le comportement de piégeage des radicaux du DPPH (2,2, diphényl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) a confirmé les propriétés **antioxydantes** de l'**acide gyrophorique** (Piovano et al., 1997).

#### Composés Aromatiques :

Deux composés aromatiques (**pics 11 et 17**) ont été détectés dans l'extrait chloroformique. Le pic 11 présente un ion pseudomoléculaire [M - H]<sup>-</sup> à m/z 265.1482 dont la fragmentation à m/z 96.9591 est caractéristique de l'acide ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate. Le composé 17 présente un ion pseudomoléculaire [M - H]<sup>-</sup> à m/z 177.0187. La fragmentation a donné des fragments à m/z 68.9971, 105.0336 confirmants la présence d'acide 6,7-dihydroxycoumarine.

#### Acides gras :

Pics **15, 22, 24, 25 et 26** ont été identifiés respectivement comme L'acide 9,10-dihydroxyoctadécanoïque, acide palmitoleique, acide palmitique, acide oleique et acide baeomycesique. L'acide 9,10-dihydroxyoctadécanoïque est un acide gras hydroxylé formellement dérivé de l'acide octacécanoïque (stéarique) avec un ion [M - H]<sup>-</sup> à m/z 315.2544. La fragmentation de ce composé produit des ions à m/z 141.1277, 297.2438, 171.1021, 127.1119. Les composés restant ont été identifiés en détail précédemment dans l'extrait hexanique.

#### Autres composés :

Dans cet extrait, on a également détecté des composés chimiques caractéristiques des végétaux supérieurs tels que : l'acide 1-O-cis-cinnamoyl-β-D-glucopyranose (**pic 7**) est un

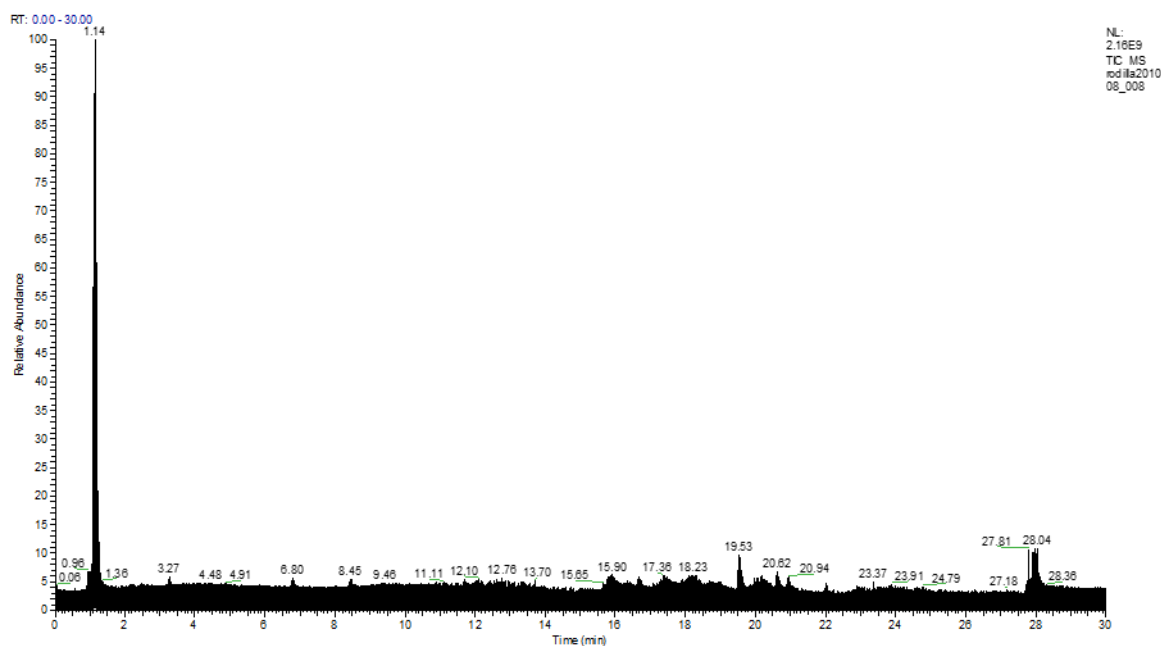
glucoside d'origine végétale dérivé de l'acide cinnamique. L'acide nordihydrocapsiate (**pic 9**) ; composé phénolique a été isolée dans (*Capsicum annuum*) (**Kobata et al., 1999**). L'acide gracilioéther G (**pic 13**) a été obtenu à partir du genre *Plakinastrella*, qui présente des activités biologiques importantes (**Festa et al., 2013**). L'acide 20-hydroxyecdysone (**pic 14**), un ecdystéroïde de type cholestane isolée pour la première fois dans l'écorce de *Dacrycarpus imbricatus*. Les expériences décrites par (**Thuy et al., 2017**) démontrent que ce composé a un effet faible mais significatif sur les cellules AML humaines (leucémie myéloïde aiguë), bloquant leur prolifération.

L'acide **sarmentologénine** (**pic 21**) est une lactone stéroïde appartient au groupe des stéroïdes cardiotoniques (**Khatri et al., 2019**) ; un groupe de produits naturels ont été isolés à ce jour à partir de plantes et d'animaux. Les stéroïdes cardiotoniques ont également été étudiés en tant qu'agents thérapeutiques potentiels avec des propriétés anticancéreuses (Babula et al., 2013 ; **Schneider et al., 2017**), antivirales (**Cai et al., 2014**), propriétés antibactériennes (**Akhtar et al., 1992**), immunorégulatrices (Jacob et al., 2013), propriétés anti-inflammatoires (**Orellana et al., 2016**) et anti-hypertensives (**Ferrari et al., 2006**).

On remarque la présence des composés suivants chez *Parmotrema hypoleucinum* : acide Squarique, l'acide chélidonique, acide tetraoxonadecanoïque, acide Gyrophorique, atranorine, Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate, 6,7-dihydroxycoumarine et Sarmentologénine.

### 3.6 Analyse chimique de l'extrait Ethanolique de *Physcia mediterranea* Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS :

Le profil chromatographique mené sur l'extrait éthanolique de *Physcia mediterranea* Nimis est représenté au niveau de la **figure 53** tandis que les résultats des analyses d'identifications en mode négative sont enregistrés dans le **tableau 27**.



**Figure 53:** Chromatogramme de l'extrait éthanolique de *Physcia mediterranea* Nimis

**Tableau 27:** Identification des substances lichéniques de l'extrait éthanolique de *Physcia mediterranea* Nimis par UHPLC/ESI/MS/MS

Pic	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MT (m/z)	Formule moléculaire	Composés identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)
1	0.98	174.9556	175.9634	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	Acide 2-Hydroxy-3,4-dioxopentanedioïque	118.9653, 90.9702, 99.9247, 116.9276
2	1.06	524.2351	525.2429	—	NI	186.1130, 113.0233, 161.0447, 348.1665
3	1.14	181.0712	182.0790	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Mannitol	71.0127, 101.0232
4	1.18	317.0550	318.0628	—	NI	80.9641, 225.0073, 164.9857, 94.9798
5	1.31	465.1039	466.1117	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	Helicioside B	269.0457, 313.0356, 225.0554, 287.0565
6	1.32	306.1714	307.1792	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> N	(-)-Stemonine	288.1608, 175.0757, 122.0364
7	1.44	218.0821	219.0899	—	NI	162.0554, 82.0288, 135.0444, 188.0714
8	3.26	187.0972	188.1050	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	Acide nonadioïque	99.9248, 143.9321, 106.9175
9	6.80	163.0393	164.0471	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Acide Coumarique	145.8905, 117.9278, 100.9253, 77.0389
10	8.45	317.0670	318.0748	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	Acide isolecanorique	123.0443, 167.0344, 149.0237
11	8.63	329.2338	330.2416	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	Acide Pinellique	211.1337, 171.1020, 139.1120, 229.1443
12	9.24	293.1763	294.1841	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	(+)-[6]-Gingerol	136.0885, 192.1152, 221.1542, 177.0915
13	11.38	265.1481	266.1559	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate	96.9590
14	11.72	311.2231	312.2309	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	Acide 9-octadecenedioïque	183.0116, 155.1070, 181.1230, 223.2062
15	11.93	389.0884	390.0962	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	Acide Squamatique	163.0394, 105.0336, 149.0237, 193.0140
16	14.25	309.1746	310.1824	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	Portentol	96.9590, 122.9747
17	15.01	315.2545	316.2623	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	Acide dihydroxyoctadecanoïque	141.1277, 297.2435, 127.1119, 171.1020
18	16.28	431.3169	432.3247	C <sub>27</sub> H <sub>44</sub> O <sub>4</sub>	Acide heptacosanetetraenedioïque	359.2957, 391.2856, 341.2849
19	16.68	297.2438	298.2516	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	Acide Ricinoleïque	183.0117, 216.0096, 279.2325
20	18.00	311.1691	312.1769	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	Acide heptahydroxytridecanol	183.0117
21	18.20	353.2005	354.2083	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	Acide tetraoxonadecanoïque	96.9591, 122.9748
22	18.71	397.2267	398.2345	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	Stephanol	96.9590
23	18.93	421.2269	422.2347	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	Sarmentologénine	80.9641
24	19.09	441.2531	442.2609	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub>	Asebotoxine IV	96.9590
25	19.54	253.2173	254.2251	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Acide palmitoleïque	83.0490
26	19.83	241.2172	242.2250	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Acide Pentadecanoïque	208.9761
27	19.93	279.2332	280.2410	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Acide Linoléïque	96.9590
28	20.03	293.1795	294.1873	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	Gingerol	96.9590
29	20.50	325.1844	326.1922	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	Linderanolide	183.0116
30	20.63	255.2329	256.2407	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Acide palmitique	239.6331
31	20.89	281.2488	282.2566	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Acide oleïque	96.9590
32	21.18	325.1846	326.1924	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	Hexahydroxytetradecan-1-ol	183.0117
33	21.38	591.2616	592.2694	C <sub>34</sub> H <sub>46</sub> O <sub>9</sub>	Scortechinone F	500.2221
34	22.01	283.2645	284.2723	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Acide Stearique	265.2519
35	22.21	761.5975	762.6053	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> O <sub>8</sub>	Non identifié	715.5919
36	22.92	373.0932	374.1010	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	Acide baecomycésique	163.0394
37	22.94	535.3136	536.3214	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>11</sub>	Non identifié	519.2835
38	23.31	311.2958	312.3036	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	Acide Arachidique	183.0117
39	23.54	337.2057	338.2135	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	Idebenone	96.9590
40	26.80	367.3584	368.3662	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	Acide Tétracosanoïque	183.0117
41	27.03	381.2319	382.2397	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	Acide 19-Acetoxylichestérique	199.9478

L'analyse par UHPLC/ESI/MS/MS de l'extrait éthanolique de *Physcia mediterranea* Nimis a permis de caractériser **41 composés**, dont **36 ont été identifiés** et 5 composés non identifiés (NI), Sur la base des informations examinées (**Tableau 27**) nous avons identifié :

Acide 2-Hydroxy-3,4-dioxopentanedioïque (**pic 1**), acide coumarique (**pic 9**), Isolecanoric (pic 10), Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate (**pic 13**), acide 9-octadecenedioïque (**pic 14**), Portentol (**pic 16**), acide ricinoleïque (**pic 19**), acide heptahydroxytridecanol (**pic 20**), acide tetraoxonadecanoïque (**pic 21**), Stephanol (**pic 22**), Sarmentologénine (**pic 23**), acide palmitoleïque (**pic 25**), acide Pentadecanoïque (**pic 26**), acide Linoléïque (**pic 27**), Gingerol (**pic 28**), acide stearique (**pic 34**), acide baecomycésique (**pic 36**), acide arachidique (**pic 38**), idebenone (**pic 39**), acide 19-Acetoxylichestérique (**pic 41**). Ces composés ont été identifiés précédemment chez la même espèce dans l'extrait hexanique et l'extrait de chloroformique.

Les autres composés qui n'apparaissent que dans l'éthanol correspondent aux (**pics 3, 5, 24, 29 et 33**). Ces composés ne se trouvent que dans les végétaux supérieurs.

**Pic 3** a été attribué au **Mannitol** qui a montré un ion  $[M - H]^-$  à  $m/z$  181.0712. Sa fragmentation a produit des ions à  $m/z$  71.0127 et 101.0232. C'est un polyol, la teneur en polyols des lichens est très variable selon les espèces et les saisons, mais peut représenter de 2 % à 36 % du poids sec du thalle (**Farrar et Smith, 1967 ; Aubert et al., 2007**). Le mannitol peuvent agir comme stabilisant macromoléculaire car il contient plusieurs groupes hydroxyles qui peuvent remplacer les liaisons hydrogène de l'eau lors de la dessiccation. Donc le mannitol pourrait fournir une protection permanente contre les blessures causées par le stress de dessiccation chez les lichens. (**Gasulla et al., 2021**). **Pic 5** a été identifié comme étant **Helicioside B**, qui a montré un ion  $[M-H]^-$  à  $m/z$  465.1039. Ses principaux ions filles étaient à  $m/z$  269.0457, 313.0356, 225.0554, 287.0565, a été isolé à partir des feuilles d'*Helicia cochinchinensis*. (**Morimura et al., 2006**). L'acide **Asebotoxine IV** a été identifié comme étant le **pic 24** (anion moléculaire à  $m/z$  441.2531). La fragmentation de pic 24 produit un ion à  $m/z$  96.9590, a été signalé dans *Pieris japonica* (**Mamoru et al., 1994**).

Les pics **29** et **33** ont été identifiés comme étant de l'**acide Linderanolide** et d'**acide Scortechinone F**, qui présentent respectivement des ions  $[M-H]^-$  à  $m/z$  325.1844 et 591.2616. Les principaux ions filles sont respectivement à  $m/z$  183.0116 et à  $m/z$  500.2221.

#### 4. Profil phytochimique de *Parmotrema reticulatum*

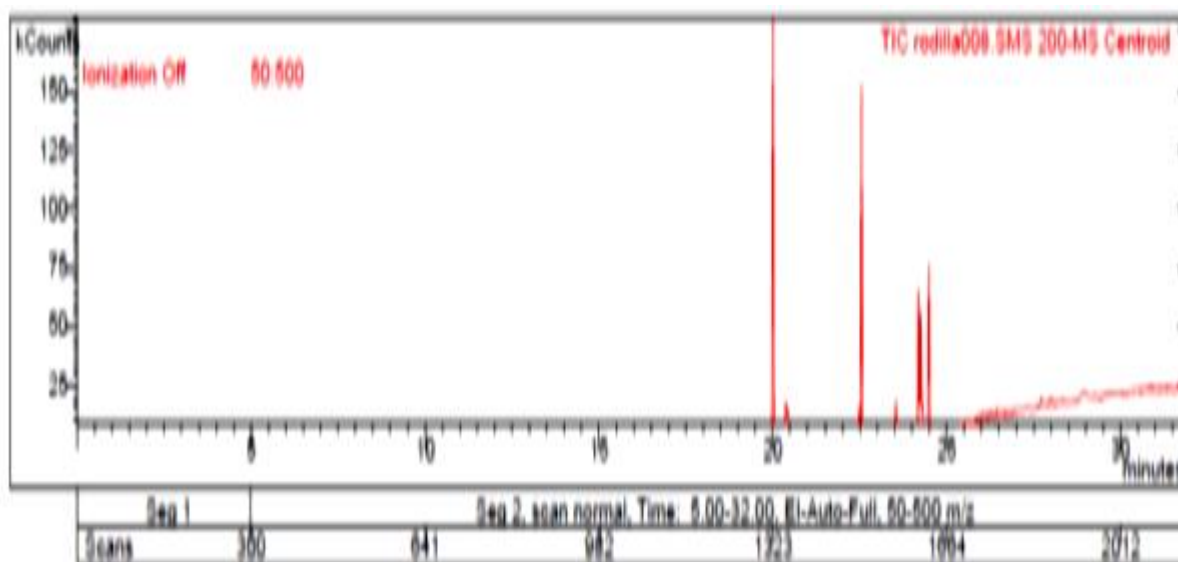
*Parmotrema reticulatum*, un lichen de la famille de Parmeliaceae récolté dans Parc Nationale D'El kala à Fad M'rad (secteur Brabtia) en Algérie, a été étudié afin de déterminer sa composition métabolique. Le criblage phytochimique a été effectué à l'aide de deux techniques d'analyses GC-MS et HPLC-ESI-MS-MS.

##### 4.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique de *Parmotrema reticulatum* par GC/MS

Analyse de la partie soluble dans le méthanol : 4-hexane, de la partie insoluble dans le méthanol : 4-cire. Les composés identifiés sont présentés avec leur temps de rétention (RT), la formule moléculaire (MF), la masse moléculaire (MW) et le % spectre de masse.

##### 4.1.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique soluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane (4-hexane) de *Parmotrema reticulatum* par GC/MS

A partir des données recueillies des chromatographes et des spectres de la spectrométrie de masse et après traitement des résultats, nous avons pu mettre en évidence **10 composés** chimiques dans l'extrait 4-Hexane (**figure 54 et tableau 28**).



**Figure 54:** Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Hexane de *Parmotrema reticulatum*

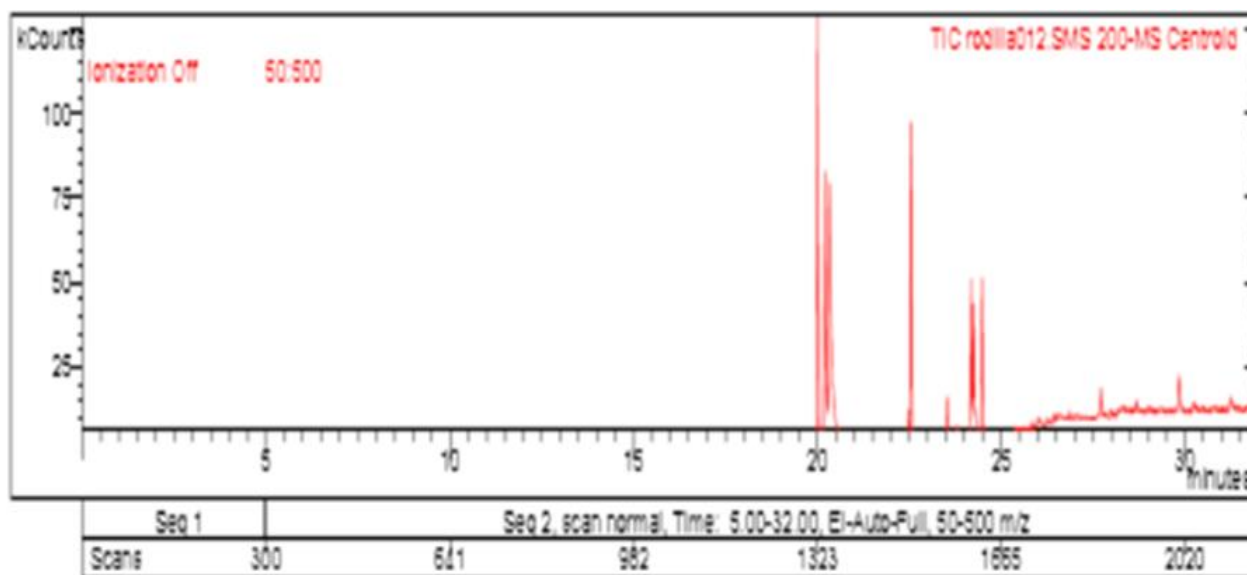
**Tableau 28:** Identification des métabolites dans l'extrait d'Hexane en partie soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Hexane de *Parmotrema reticulatum*

No	RT (min)	Nom du composé	Masse moléculaire	%	Formule moléculaire
1	19 :51	Methyl 4-hydroxy-2-methoxy-3, 5,6-trimethylbenzoate 1	224	0.1	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>
2	20 :00	Methyl 2,4-dihydroxy-3, 5,6-trimethylbenzoate	210	34.6	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
3	20 :38	Methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate (acide Atrarique)	196	4.3	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
4	20 :43	NI	196	4.0	—
5	21 :52	Methyl 13-methyltetradecanoate	256	0.1	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
6	22 :50	Methyl 9-hexadecenoate (acide palmitoléique)	268	2.2	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
7	22 :55	Methyl hexadecanoate (acide palmitique)	270	20.3	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
8	24 :19	Methyl trans,trans-9,12-octadecadienoate (acide linoléique )	294	8.9	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
9	24 :25	Methyl cis-9-octadecenoate (acide oleique)	296	9.5	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
10	24 :48	Methyl octadecanoate (acide stéarique)	298	11.7	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>

L'échantillon 4-Hexane a été analysé par GC-MS, **10 produits** ont été identifiés, parmi lesquels les acides atrarique, palmitoléique, palmitique, linoléique, oléique, stéarique, un composé phénolique acide 2,4-dihydroxy-3, 5,6-triméthylbenzoïque et un composé non identifié

#### 4.1.2. Analyse chimique de l'extrait hexanique insoluble dans le MeOH estérifié avec du diazométhane (4-cire) de *Parmotrema reticulatum* par GC/MS

Pour les fractions obtenues par cristallisation à partir de l'extrait hexanique brut par solubilisation dans du méthanol chaud, 4-Cire sont également estérifiés avec du diazométhane pour analyse GC-MS.



**Figure 55:** Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie insoluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Cire de *Parmotrema reticulatum*

**Tableau 29:** Identification des métabolites dans l'extrait d'Hexane en partie insoluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Cire de *Parmotrema reticulatum*

No	RT (min)	Nom du composé	Masse moléculaire	%	Formule moléculaire
1	19 :17	3-Methoxy-2-methyl-5-(1-methylethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-diene	194	0.5	—
2	20 :00	Methyl 2,4-dihydroxy-3, 5,6-trimethylbenzoate	210	18.8	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>
3	20 :33	Methyl 2,4-dihydroxy-3,6-dimethylbenzoate (acide atrarique)	196	26.7	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>
4	22 :49	NI	266	1.2	
5	22 :55	Methyl hexadecanoate (acide palmitique)	270	12.8	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
6	24 :19	Methyl trans, trans-9,12-octadecadienoate (acide linoléique)	294	5.9	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
7	24 :25	Methyl (Z)-9-octadecenoate (acide oleique)	296	6.2	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>
8	24 :48	Methyl octadecanoate (acide stearique)	298	7.5	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>

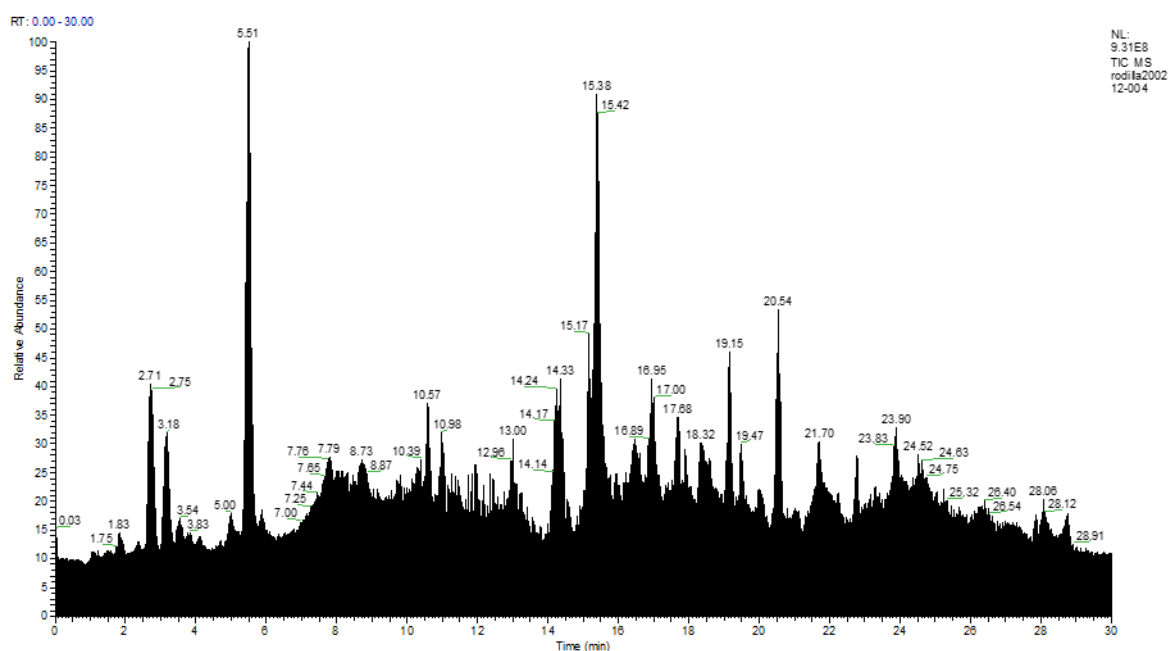
Dans l'analyse 4-Cire, **8 produits** sont identifiés dont **1 non identifié (NI)**. (**Figure 55 et Tableau 29**). Et tous ont été identifiés dans l'échantillon 1-Hexane à l'exception de l'acide 3-Methoxy-2-methyl-5-(1-methylethyl)-2,5-cyclohexadiene-1,4-diene avec un taux très faible (0.5%).

#### 4.2. Analyse chimique de l'extrait hexanique de *Parmotrema reticulatum* par UHPLC/ESI/MS/MS

##### 4.2.1. Analyse chimique de l'extrait hexanique (4-hexane) de *Parmotrema reticulatum* par HPLC/ESI/MS/MS

Dans l'analyse HPLC-MS/MS de l'extrait 4-Hexane de *P. reticulatum*, **67 produits** ont été détectés parmi lesquelles nous avons proposé **56 structures** et **11 composés non identifiés**

La **figure 56** présente le chromatogramme HPLC enregistrant les composés identifiés, les résultats détaillés sont affichés dans **tableau 30**.



**Figure 56:** Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie soluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Hexane de *Parmotrema reticulatum*.

**Tableau 30:** Identification des substances lichéniques de l'extrait (4-Hexane) de *Parmotrama reticulatum* par UHPLC/ESI/MS/MS

Pic	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MT (m/z)	Formule moléculaire	Composés identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)
1	2.67	181.0502	182,0573769	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	3-Methylorsellinic acid	167.9040, 152.9167, 137.0598
2	2.72	187.0970	188,104296	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	3,5-dimethoxycyclohexanecarboxylic acid	143,8651 141,867 123,0807
3	2.75	293.0669	294,0741061	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	6-(hydroxymethyl)-3,5-bis(methoxycarbonyl)-2,4	249.0771 234.0530 207.0659
4	3.15	151.0393	152,0465003	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Atranol	123.0444 105.0335 81.0335
5	3.47	199.0973	200,104583	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	3,5-dihydroxy-2,4,6-trimethylcyclohexanecarboxylic acid	183.4492 162.8385 114.9508
6	3.55	195.0660	196,073035	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	3,5-diMethylorsellinic acid	160.8414 151.0759 109.0649
7	3.58	149.0237	150,0309809	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	4-formylbenzoic acid	90,9224 106,9892 91,9303
8	4.10	201.1129	202,1202266	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	2,4-dihydroxy-3,5,6-trimethylcyclohexane-1-carboxylic acid	164.8350 197.6263 139.1124
9	4.95	199.1337	200,1409082	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	2-hydroxy-10-undecenoic acid	162,8384 164,8355
10	5.00	185.0006	186,0078808	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> C <sub>1</sub> O <sub>3</sub>	Chloroatranol	141.8674 159.8779
11	5.21	169.0863	170,0936538	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	4-hydroxy-2,5-dimethylcyclohex-1-ene-1-carboxylic acid	140.9478 124.9796 104.4180
12	5.49	163.0392	164,047	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	p-coumaric acid	65.0022 77.0386 119.0494 166,2639
13	5.60	209.1181	210,125322	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	6-(1-Oxopentyl)-1-cyclohexene-1-carboxylic acid	146,9850 164,8947 105,0336
14	5.87	215.1286	216,1358739	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	undecanedioic acid	153.1279 197.1179
15	7.44	325,1659	283,2149604	C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> N O <sub>3</sub>	N-dodecanoyl-L-Homoserine lactone	139,1121 183,1027 238,2175
16	7.67	282,2078	330,2251721	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	9,10-dihydroxy-8-oxo-12-octadecenoic acid	171,1021 211,1337 139,112
17	7.77	329,2336	210,0888784	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	3,4-dimethoxyhydrocinnamic acid	122,0363 150,0678
18	8.70	309,2073	374,1366533	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	4-O-demethyldivaricatic acid	177,0188 195,0295 151,0393
19	9.01	373,1294	254,188241	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	9-hydroxy-10,12-pentadecadienoic acid	69,0335, 57,0334
20	9.53	253,1809	244,1674676	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	Tridecanedioic acid	183,1025 146,9606, 118,9653
21	10.13	243,1601	360,121146	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	Barbatic acid	151,0393 163,0394
22	10.30	375,1086	376,1159259	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	8-hydroxybarbatic acid	163,0392 167,0342 149,0236 325,0715
23	10.35	373,0931	374,1000643	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	Baeomycesic acid	177,0188 195,0295 151,0393 123,0442
24	10.59	311,2230	312,2302001	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	9Z-octadecenedioic acid	-
25	10.87	233,1547	234,161938	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	Fukinanolide	101,0039
26	10.89	323,2230	324,2302601	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> C <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	Leoidin	293,9857 308,0008 351,9911 375,0272
27	10.91	411,0045	412,0118519	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	4'-O-demethylsekikaic acid	227,144 177,1279
28	12.28	313,2388	314,2466	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	octadecanedioic acid	183,1386 99,0805 129,0912
29	12.80	313,2387	314,2459373	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	Non identifié	-
30	13.00	269,2124	270,2195588	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	2-oxopalmitic acid	251,2017 155,1071 171,1022

<b>31</b>	13.04	389,1245	390,1314913	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	8-hydroxydiffractaïc acid	163,0393	149,0236	325,0719
<b>32</b>	13.34	293,2124	294,2198	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	2-hydroxylinolenic acid	277,1021	235,171	195,1383 96,959
<b>33</b>	14.40	295,2278	296,2352	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	18-hydroxylinoleic acid	-		
<b>34</b>	15.19	297,2436	298,2507734	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	9-oxooctadecanoic acid	171,102	155,1069	279,2333
<b>35</b>	15.42	373,0925	374,0999922	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	<b>Atranorin</b>	163,0393	119,0493	177,0187
<b>36</b>	15.43	177,0187	178,0259039	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	6,7-dihydroxycoumarin	68,9971		
<b>37</b>	15.46	365,2330	366,2403472	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	<b>Muronic acid</b>	277,2536	57,0334	251,8486
<b>38</b>	15.70	277,2538	278,2612	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	<b>Linolenic acid</b>	131,0124	57,0335	69,0335 218,0552
<b>39</b>	15.98	367,2488	368,2561759	C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>	<b>Murolic acid</b>	263,2379	277,2545	295,2652 155,1439
<b>40</b>	16.29	461,2550	462,2619883	C <sub>26</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	<b>Non identifié</b>	-		
<b>41</b>	16.47	381,2285	382,2355375	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	19-acetoxy-protolichesterinic acid	293,2499	59,0126	71,049
<b>42</b>	16.51	407,0540	408,0611398	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> C <sub>1</sub> O <sub>8</sub>	<b>Chloroatranorin</b>	-		
<b>43</b>	16.97	201,1493	202,156376	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>3</sub>	11-hydroxyundecanoic acid	73,0284	99,9248	164,8356
<b>44</b>	17.59	387,2544	388,2615888	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	<b>Non identifié</b>	-		
<b>45</b>	17.68	389,1242	390,1314574	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	<b>Leprolomin</b>	163,0393	149,0236	325,0717
<b>46</b>	18.04	253,2173	254,2244533	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	<b>palmitoleic acid</b>	83,0494	110,9479	145,869
<b>47</b>	18.33	241,2172	242,224528	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	pentadecanoic acid	-		
<b>48</b>	18.35	455,3531	456,3604764	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	<b>Ursolic acid</b>	352,1682		
<b>49</b>	18.50	279,2330	280,2402876	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	<b>Linoleic acid</b>	96,9591	208,467	
<b>50</b>	18.66	299,2595	300,2666982	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	2-hydroxyoctadecanoic acid	59,0127		
<b>51</b>	19.03	497,2548	498,2626	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	superpicrolichenic acid	-		
<b>52</b>	19.16	255,2329	256,24011	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	<b>Palmitic acid</b>	158,1438	174,6323	
<b>53</b>	19.49	281,2485	282,2558775	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	<b>Oleic acid</b>	96,959	235,1344	213,5261
<b>54</b>	19.62	269,2488	270,2560686	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	15-methylhexadecanoic acid	230,4065	182,5247	143,8039
<b>55</b>	19.89	269,2488	270,2560671	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	heptadecanoic acid	98,9549	235,744	187,0438
<b>56</b>	19.99	483,3481	484,3553195	C <sub>31</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	<b>Non identifié</b>	-		
<b>57</b>	20.07	327,2543	328,2616419	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>3</sub>	2-hydroxyeicosanoic acid	255,233	89,0233	
<b>58</b>	20.17	473,2548	474,2626	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	<b>Non identifié</b>	-		
<b>59</b>	20.54	283,2643	284,2715646	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	<b>stearic acid</b>	227,2842	194,5713	261,6109
<b>60</b>	20.74	309,2801	310,2874803	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	<b>eicosenoic acid</b>	96,959	122,9747	
<b>61</b>	21.02	441,3377	442,3448	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> O <sub>3</sub>	<b>Non identifié</b>	-		
<b>62</b>	21.70	311,2957	312,3029366	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	arachidic acid	-		
<b>63</b>	22.02	597,4164	598,4242	C <sub>37</sub> H <sub>58</sub> O <sub>6</sub>	<b>Non identifié</b>	-		
<b>64</b>	22.68	637,4841	638,490788	C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> O <sub>5</sub>	<b>Non identifié</b>	-		
<b>65</b>	23.78	603,3334	604,3412	C <sub>37</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	<b>Non identifié</b>	-		
<b>66</b>	23.81	633,3798	634,3876	C <sub>39</sub> H <sub>54</sub> O <sub>7</sub>	<b>Non identifié</b>	-		
<b>67</b>	24.51	605,3483	606,3561	C <sub>37</sub> H <sub>50</sub> O <sub>7</sub>	<b>Non identifié</b>	-		

Les produits les plus caractéristiques de l'extrait 4-Hexane de lichen *P. reticulatum* sont l'acide 3-méthylorsellinique, l'atranol, l'acide 4-formylbenzoïque, le chloroatranol, l'acide p-coumarique, barbatique, l'atranorine et la chloroatranorine.

Dans le profil des **acides gras**, on retrouve les acides suivants 2-hydroxy-10-undecenoic acid, undecanedioic acid, 9,10-dihydroxy-8-oxo-12-octadecenoic acid, 9-hydroxy-10,12-

pentadecadienoic acid, Tridecanedioic acid, 9Z-octadecenedioic acid, octadecanedioic acid, 2-hydroxylinolenic acid, ricinoleic acid, Linolenic acid, 11-hydroxyundecanoic acid, palmitoleic acid, pentadecanoic acid, Linoleic acid, 2-hydroxyoctadecanoic acid, Palmitic acid Oleic acid, 15-methylhexadecanoic acid, heptadecanoic acid, 2-hydroxyeicosanoic acid, stearic acid, eicosenoic acid et (eicosanoic acid) arachidic acid.

Parmi **les acides à base cyclohexanecarboxylique**, on a également trouvé les dérivés suivants, qui ont été déjà décrits chez l'espèce que nous venons d'étudier : *Physcia mediterranea* Nimis (kerboua et al., 2021) et chez *Parmotrema hypoleucinum* étudiée ci dessus :

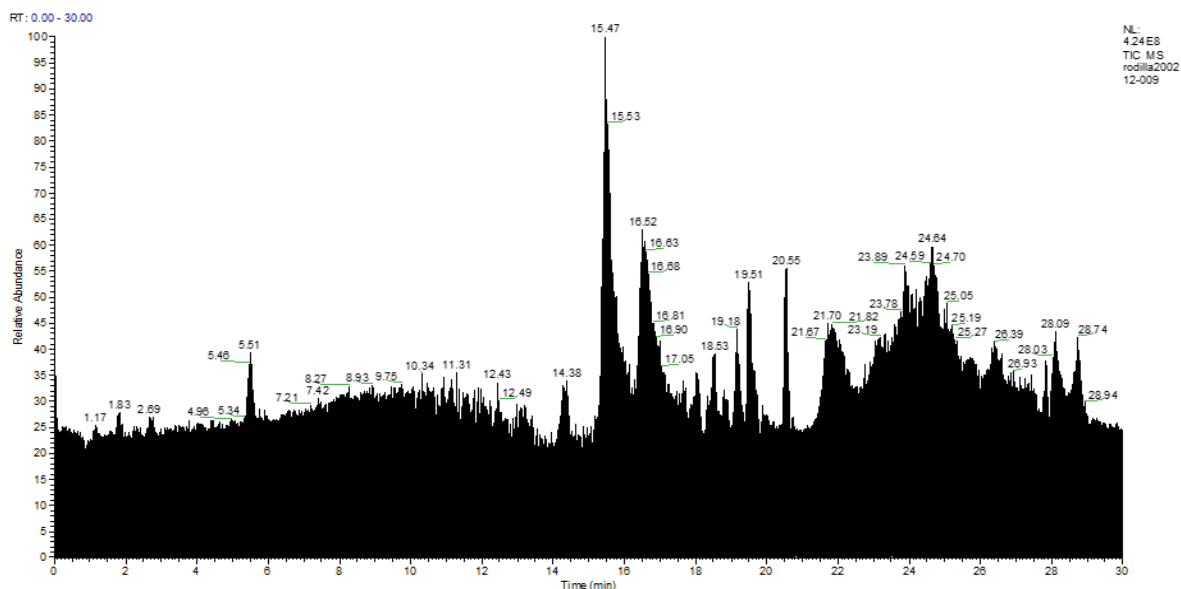
3,5-dimethoxycyclohexanecarboxylic acid, 3,5-dihydroxy-2,4,6-trimethylcyclohexanecarboxylic acid, 2,4-dihydroxy-3, 5,6-trimethylcyclohexane-1-carboxylic acid, 4-hydroxy-2,5-dimethylcyclohex-1-ene-1-carboxylic acid, 6-(1-Oxopentyl)-1-cyclohexene-1-carboxylic acid

Des **lactones** ont également été identifiées : la N -dodécanoyl- L -homosérine lactone et le fukinanolide, d'autres dérivés comme la léoïdine, et un acide triterpénique identifié comme l'acide ursolique.

les **composés polyphénoliques** caractéristiques de *parmotrema reticulatum* dans l'extrait 4-Hexane, **20 composés** ont été identifiés : acides 4-O-déméthyldivaricatiques, 3,4-dimethoxyhydrocinnamic, acide barbatiques, 8-hydroxybarbatiques, baeomycesiques, 4'-O-déméthylsekikaiques, acides 8-hydroxydiffractaïques , muronic, murolic, 19-acetoxyprotolichesterinic, diploicin, leprolomin, superpicrolichenique tous ces composés ont été détectés chez notre espèce.

#### 4.2.2. Analyse chimique de l'extrait hexanique (4-cire) de *Parmotrema reticulatum* par HPLC-ESI-MS/MS

Dans l'analyse de l'extrait 4-Cire, obtenues par précipitation de l'extrait hexanique initial par HPLC-MS/MS, il a été possible de détecter **27 Composés**, dont **5** non identifiés (**NI**) Le chromatogramme et l'analyse des composés 4-Cires est présenté dans la **figure 57 et tableau 31**.



**Figure 57:** Chromatogramme de l'extrait d'Hexane en partie insoluble dans MeOH estérifié avec du diazométhane, 4-Cire de *Parmotrema reticulatum*.

**Tableau 31:** Identification des substances lichéniques de l'extrait (4-Cire) de *Parmotrema reticulatum* par UHPLC/ESI/MS/MS

Pic	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MT (m/z)	Formule moléculaire	Composés identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)
1	0.03	146.9397	147.9475	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Tartaric acid	121.7335 103.9193 87.9242
2	0.04	190.9281	191.9359	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>8</sub>	Methanetetracarboxylic acid	129.9942 102.9476 98.6743
3	5.51	163.0395	164.0473	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	p-coumaric acid	150.6340 145.8898 137.8545
4	8.75	218.0310	219.0388	C <sub>15</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	Non identifié	
5	13.16	293.2126	294.2204	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	2-hydroxylinolenic acid	256.8876 221.1548 192.1154
6	13.76	315.2543	316.2621	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	9,10-Dihydroxystearic acid	297.2437 279.2327 171.1018
7	14.37	295.2280	296.2358	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	18-hydroxylinoleic acid	277.2177 183.1386 238.0103
8	15.44	373.0929	374.1007	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	Atranorin	347.4986 287.3080 177.0187
9	16.47	407.0539	408.0617	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	Chloroatranorin	374.2436 210.9801 163.0393
10	17.65	389.1246	390.1324	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	8-Hydroxydiffractaic	325.0721 281.0822 163.0394
11	17.71	357.0981	358.1059	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	Schizopeltic acid	207.0656 181.0500 163.0392
12	17.77	265.1480	266.1558	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	(4E, 6E, 9E)-pentadeca-4, 6,9-trienedioic acid	225.9377 195.2177 158.7972
13	17.92	325.2387	326.2465	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	Nephromopsinic acid	216.0091 197.0273 183.0115
14	18.03	253.2171	254.2249	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	palmitoleic acid	83.0490 149.0573 189.6922
15	18.35	455.3534	456.3612	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Oleanolic acid	407.3320
16	18.50	279.2331	280.2409	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Linoleic acid	96.9594 202.4945 150.7684 132.0134
17	19.15	255.2329	256.2407	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Palmitic acid	236.5331 139.4856 230.9335 191.8156
18	19.51	281.2487	282.2565	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	Oleic acid	103.8178 117.3111 94.59 85.5130
19	20.07	457.3722	458.3800	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub> O <sub>5</sub>	NI	-

<b>20</b>	20.54	283.2643	284.2721	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Stearic acid	183.0114 221.2569 168.0114 129.1859
<b>21</b>	20.82	309.2800	310.2878	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	Eicosenoic acid	96.9590 277.9540 241.2167
<b>22</b>	21.71	311.2957	312.3035	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	Arachidic acid	216.0097 197.0280 183.0117
<b>23</b>	22.62	297.1532	298.1610	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	NI	–
<b>24</b>	23.58	353.2003	354.2081	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	NI	–
<b>25</b>	23.81	311.1689	312.1767	C <sub>13</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	NI	–
<b>26</b>	23.89	367.3579	368.3657	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	Lignoceric acid	349.3456 249.0620 96.9590
<b>27</b>	26.24	381.2317	382.2395	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	19-Acetoxylichesterinic acid	122.9748 96.9590

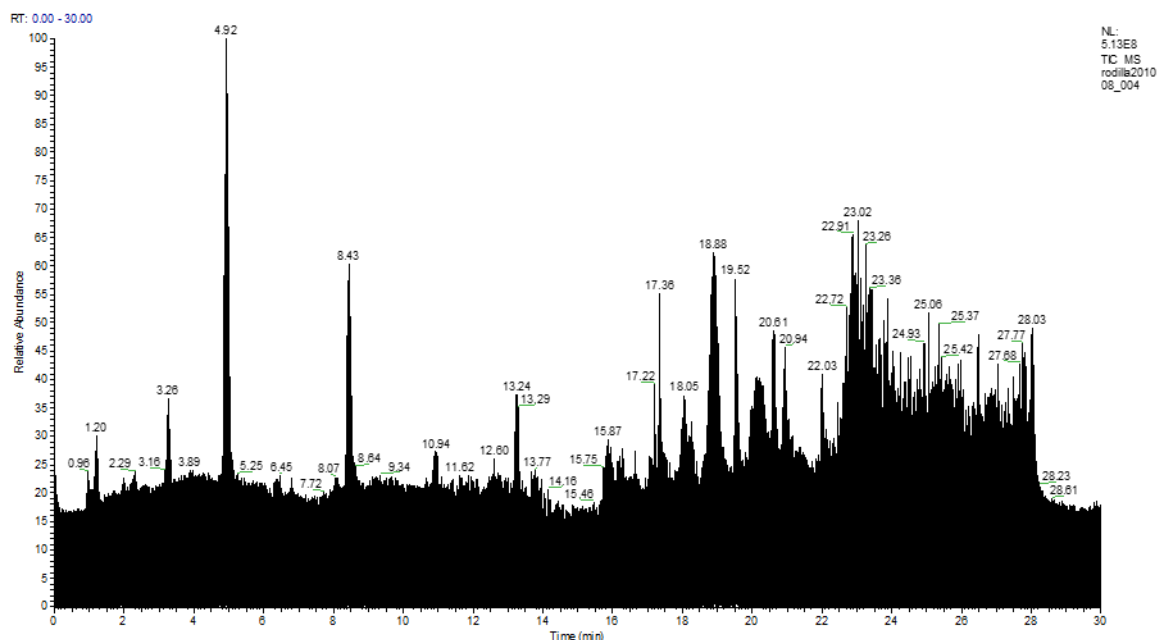
Parmi les 22 composés identifiés dans l'extrait 4-Cire étaient principalement l'acide p-coumarique, Atranorin, Chloroatranorin, 8-Hydroxydiffractaïc et 19-Acetoxylichesterinic

Dans le profil des **acides gras** et leurs dérivés, nous avons 2-hydroxylinolenic acid, 9,10-Dihydroxystearic acid, 18-hydroxylinoleic acid, palmitoleic acid, Oleanolic acid, Linoleic acid, Palmitic acid, Oleic acid, palmitoleic acid, Oleanolic acid, Linoleic acid, stearic acid, eicosenoic acid et arachidic acid. toutes ces composés précédents ont été détectés dans l'extrait 4-Hexane de *P. reticulatum*.

**4 composés** n'ont pas pu être identifiés dans l'extrait 4-Hexane autrement dit contenus que dans l'extrait 4-Cire de *P. reticulatum*, correspondant aux pics 1, 11, 13 et 26. Le **pic 1** a été identifié comme étant l'**acide tartaric** (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>) qui a montré un ion [M- H]<sup>-</sup> à m/z 146.9397. Le **pic 11** avec un ion [M- H]<sup>-</sup> à m/z 357.0981 a été identifié comme étant l'**acide Schizopeltic** (C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>). Les pics **13** et **26** ont été identifiés comme l'**acide Nephromopsinic** (C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>O<sub>4</sub>) et l'**acide Lignoceric** (C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub>), qui ont montré un ion [M- H]<sup>-</sup> à m/z 325.2387 et 367.3579.

#### 4.2.3 Analyse chimique de l'extrait chloroformique de *Parmotrema reticulatum* par UHPLC/ESI/MS/MS :

Le profil chromatographique d'extrait chloroformique *P. reticulatum* est représenté au niveau de la **figure 58**, tandis que les résultats des analyses d'identification en mode négatif sont présentés dans le **tableau 33**.



**Figure 58:** Chromatogramme de l'extrait chloroformique de *Parmotrema reticulatum*

**Tableau 32:** Identification des substances lichéniques de l'extrait chloroformique de *Parmotrema reticulatum* par UHPLC/ESI/MS/MS

Pic	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MT (m/z)	Formule moléculaire	Composés identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)
1	0.98	174.9557	175.9635	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	2-Hydroxy-3,4-dioxopentanedioic acid	118.9654 90.9703 146.9608 105.9574
2	1.05	112.9845	113.9923	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Squaric acid	68.9946 85.3754
3	1.12	182.9882	183.9960	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Chelidonic acid	68.9946 79.9563 155.022 136.5849
4	1.14	151.0605	152.0683	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Arabitol	71.0127 59.0127 96.9876
5	1.96	389.0517	390.0595	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub>	<b>Barbatolic acid</b>	227.0348 253.0507 327.0513 309.0407
6	3.48	187.0972	188.1050	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	Azelaic acid	
7	4.92	387.0358	388.0436	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>10</sub>	<b>Salazinic acid</b>	227.0349 269.0457 243.0299 121.0286
8	5.38	251.0927	252.1005	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>	Eugenone	164.0835 108.0207 122.0364 192.0789
9	5.99	195.0296	196.0374	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	Haematommic acid	81.0335 160.8414 123.0441 105.0334
10	6.80	163.0395	164.0473	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	p-Coumaric acid	145.8899 117.9276 100.9248 91.0182
11	6.81	215.1287	216.1365	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	<b>NI</b>	–
12	6.98	401.0517	402.0595	C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>10</sub>	Constictic acid	225.0555 253.0507 243.0298 281.0457
13	7.81	116.9276	117.9354	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	<b>Succinic acid</b>	99.9248
14	8.11	373.0568	374.0646	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub>	<b>Menegazziaic acid isomer</b>	267.0666 255.0665 229.0504 311.0567
15	8.41	317.0670	318.0748	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	isolecanoric acid	123.0442 167.0343 149.0237 105.0335
16	8.64	329.2337	330.2415	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>5</sub>	Pinellic	211.1338 171.1021 229.1442 139.1121
17	10.60	243.1603	244.1681	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>4</sub>	tridecanedioic acid	181.1596 118.9650 225.1496 146.9605

18	10.74	227.1653	228.1731	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	10-Oxotridecanoic acid	102.9878	122.9842	147.9845
							152.9168	
19	10.91	473.1819	474.1897	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	NI	—		
20	11.11	475.3278	476.3356	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>	tetrahydroxypentacosanedioic acid	429.3224	157.1226	241.1422
							197.1550	
21	11.59	447.3331	448.3409	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>7</sub>	D-Glucitol monostearate	399.3116	213.1495	
22	13.12	265.1482	266.1560	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate	96.9591		
23	13.34	467.0985	468.1063	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	Gyrophoric acid	167.0343	149.0237	123.0442
							255.0667	
24	13.36	317.0670	318.0748	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	Lecanoric acid	123.0442	167.0343	149.0237
							105.0335	
25	13.68	313.2388	314.2466	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	Octadecanedioic acid	201.1129	127.1119	171.1019
							125.0962	
26	14.83	359.0776	360.0854	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	Ramalinaic acid	181.0502	137.0601	163.0394
27	15.01	315.2544	316.2622	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	9,10-Dihydroxystearic acid	141.1277	297.2438	171.1021
							127.1119	
28	16.19	455.1714	456.1792	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	Lobaric acid	281.0822	352.1682	367.1914
							296.1054	
29	16.29	387.1452	388.1530	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>	Divaricatic acid	177.0551	195.0659	151.0757
30	16.61	343.0826	344.0904	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	(+)-Usnic acid	231.0660	328.0589	313.0357
							259.0612	
31	16.68	297.2437	298.2515	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	Ricinoleic acid	183.0117	216.0097	279.2333
32	17.14	177.0187	178.0265	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	6,7-dihydroxycoumarin	68.9971	105.0336	
33	17.16	373.0930	374.1008	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	Atranorin	163.0394	119.0493	177.0189
							133.0288	
34	18.03	407.0541	408.0619	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub> C <sub>1</sub>	Chloroatranorin	163.0393	210.9801	181.0501
							119.0493	
35	18.32	353.2004	354.2082	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	tetraoxonadecanoic acid	96.9590	122.9748	
36	18.36	421.2265	422.2343	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	Sarmentologenin	80.9641		
37	18.70	401.2547	402.2625	C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> O <sub>7</sub>	Caperatic acid	307.2282	253.2538	283.2283
							263.2381	
38	19.46	455.3535	456.3613	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	Ursolic acid	268.0309		
39	19.55	253.2172	254.2250	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	palmitoleic acid	216.2756	83.0491	128.2464
							104.0607	
40	19.74	293.1796	294.1874	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	Gingerol	96.9590		
41	19.81	241.4174	242.4252	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Pentadecanoic acid	—		
42	19.92	279.2332	280.2410	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Linoleic acid	96.9590	129.0358	101.0231
43	20.62	255.2329	256.2407	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	palmitic acid			
44	20.88	281.2488	282.2566	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	oleic acid	206.4382	138.8067	119.1887
							100.3896	
45	22.00	283.2645	284.2723	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Stearic acid	222.6401	189.2092	162.6474
46	23.11	—	—	—	NI	—		

Dans l'analyse des composés de polarités moyenne, **46 produits** ont été détectés, dont **43** ont été **identifiés** et **3 non identifiés** (NI), Les composés identifiés étaient principalement des depsides, depsidones, composés aromatiques, dibenzofurane, acide aliphatique et acides gras.

#### Depsides :

**8** depsides ont été identifiés (**pics 5, 15, 23, 24, 26, 29, 33 et 34**) en utilisant UHPLC avec analyse ESI / MS-MS en mode négatif. Les pics 15, 23,24, 26, 33 et 34 ont été identifiés respectivement comme étant l'acide Gyrophoric, isolecanoric, lecanoric, Ramalinaic, atranorine et chloroatranorine. Ces composés ont été déjà signalés dans *P.hypoleucinum* et *Physcia mediterranea* par contre **l'acide Barbatolic** (pic 5) et **l'acide Divaricatic** (pic 29)

ont été identifiés seulement dans *P.reticulatum*, ces **2 depsides** montrant des ions [M - H]<sup>-</sup> à m/z 389.0517 et 387.1452.

#### **Depsidones :**

**4** depsidones correspondant aux **pics 7, 12, 14 et 28**, ont été identifiés comme étant l'acide Salazinic, Constictic, isomer de l'acide Menegazziaic et acide lobaric

L'acide salazinic et l'acide lobaric ont été détectés seulement chez *P.reticulatum* qui enregistraient respectivement des ions [M - H]<sup>-</sup> à m / z 387.0358 et 455.1714.

#### **Composés aromatiques :**

**5** composés aromatiques simples correspondant aux pics **9,10, 22 et 32**. Le pic 9 a été identifié comme étant l'acide Haematommic, qui montrait un ion [M - H]<sup>-</sup> à m / z 167,0345.

Les pics 10, 22 et 32 ont été identifiés respectivement comme étant l'acide p-Coumaric, l'acide Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate et l'acide 6,7-dihydroxycoumarin.

#### **Dibenzofurane :**

Le **pic 30** a été identifié comme étant l'acide **l'acide (+)-usnique** déjà détecté dans l'extrait chloroformique de *Physcia mediterranea*

#### **Acide aliphatique :**

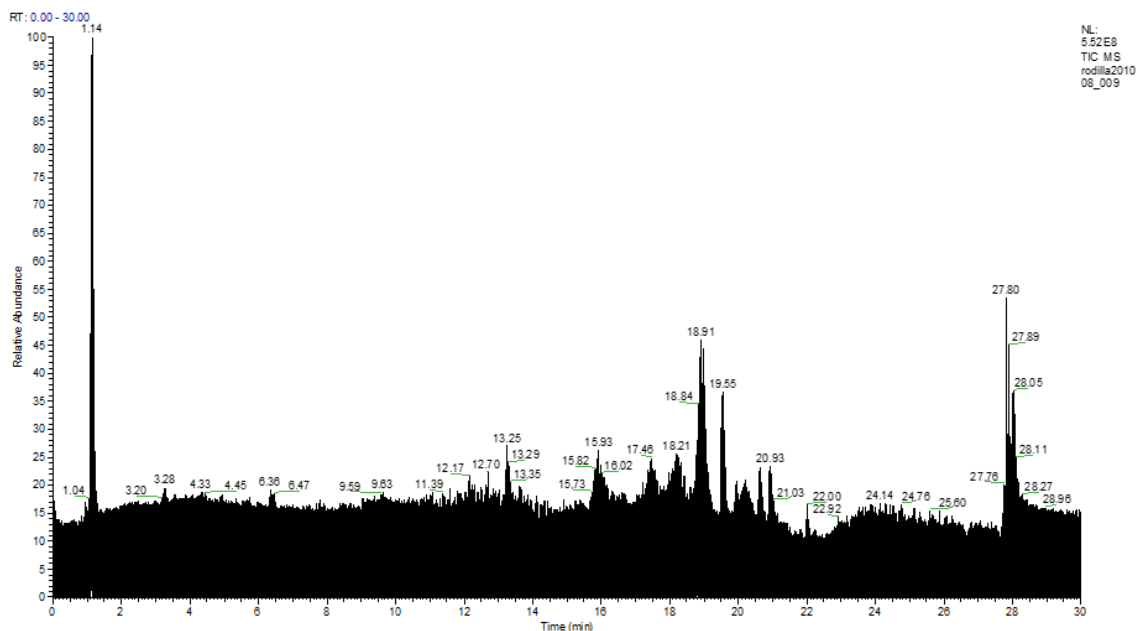
**4 acides aliphatiques (pic 2, 3, 6 et 13)** ont été détectés dans l'extrait chloroformique de *P.reticulatum*, ont été identifiés comme étant les acides : Squarique, chélidonique, azelaic et Succinic. **L'acide Succinic** a été signalé seulement dans cette espèce qui montrait un ion [M - H]<sup>-</sup> à m / z 116.9276 et sa fragmentation produisait des ions à m/ z 357.0610, 313.0722, 295.0618.

#### **Acides gras :**

**15** acides gras correspondants aux pics **1,16,17, 18, 20,25,27,31,37,39,41,42,43,44 et 45** ont été identifiées chez cette espèce. Présentés successivement par les acides : 2-Hydroxy-3,4-dioxopentanedioic, Pinellic, tridecanedioic, 10-Oxotridecanoic, tetrahydroxypentacosanedioic, Octadecanedioic, 9,10-Dihydroxystearic, Ricinoleic, Caperatic, Palmitoleic, Pentadecanoic, Linoleic , Palmitic, oleic et Stearic. Ces composés ont été également identifiés chez *P.hypoleucinum* et *Physcia mediterranea*.

#### **4.2.4. Analyse chimique de l'extrait ethanolique de *Parmotrema reticulatum* par UHPLC/ESI/MS/MS :**

Le profil chromatographique d'extrait ethanolique de lichen *P.reticulatum* est représenté au niveau de la **figure 59** tandis que les résultats des analyses d'identifications en mode négatif sont présentés dans le **tableau 34**.


**Figure 59:** Chromatogramme de l'extrait éthanolique de *Parmotrema reticulatum*
**Tableau 33:** Identification des substances lichéniques de l'extrait éthanolique de *Parmotrema reticulatum* par UHPLC/ESI/MS/MS.

Pic	RT (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	MT m/z	Formule moléculaire	Composés identifiés	Fragments d'ionisation (m/z)
1	0.98	174.9556	175.9634	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	2-Hydroxy-3,4-dioxopentanedioic acid	118.9653 90.9702 99.9247 116.9276
2	1.05	112.9846	113.9924	C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Squaric acid	68.9946
3	1.14	181.0712	182.0790	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	Mannitol	71.0127 101.0232
4	1.15	311.1156	312.1234	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>	Neoisatin	159.0461 177.0569 101.0233
5	1.19	151.0603	152.0681	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	Arabitol	71.0127 59.0128 79.9563
6	1.82	182.9882	183.996	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	Chelidonic acid	68.9946 113.9551
7	4.32	567.1359	568.1437	C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>15</sub>	<b>Polygalaxanthone III</b>	371.0773 237.0400 353.0668 190.9982
8	4.91	387.0722	388.0800	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	Cryptostictic acid	284.0692 256.0741 251.0350 239.0352
9	5.68	283.0614	284.0692	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	<b>Parietin</b>	211.0760 199.0760 237.0556 227.0708
10	6.42	209.0850	210.0928	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	<b>Ethyl everninate</b>	96.9590 79.9562
11	8.45	317.0670	318.0748	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	Lecanoric acid	123.0443 167.0344 149.0237
12	8.60	415.0674	416.0752	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	<b>Physodalic acid</b>	225.0554 253.0506 243.0299 281.0458
13	9.24	293.1763	294.1841	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	(+)-[6]-Gingerol	136.0885 192.1152 221.1542 177.0915
14	10.97	475.3276	476.3354	C <sub>25</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub>	tetrahydroxypentacosanedioic acid	429.3217 157.1226 241.1441 411.3126
15	10.98	359.0776	360.0854	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	Conhypoprotocetraric acid	211.0762 227.0711 237.0555 255.0662
16	11.38	265.1481	266.1559	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	Ethyl 4-O-methylolivetolcarboxylate	96.9590
17	11.96	489.3434	490.3512	C <sub>26</sub> H <sub>50</sub> O <sub>8</sub>	Icosanedioic acid bis (2,3-dihydroxypropyl) ester	59.0127 429.3220
18	13.18	467.0986	468.1064	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub>	Gyrophoric acid	167.0343 149.0237
19	14.38	293.2126	294.2204	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	17-Hydroxylinolenic acid	294.2204 96.9590 136.0884 223.1696
20	18.00	311.1691	312.1769	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>	heptahydroxytridecanol	-

21	18.20	353.2005	354.2083	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	tetraoxonadecanoic acid	96.9591	122.9748
22	18.71	397.2267	398.2345	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	Stephanol	96.9590	
23	18.93	421.2269	422.2347	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>7</sub>	Sarmentologenin	80.9641	
24	19.54	253.2173	254.2251	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	palmitoleic acid	83.0490	149.5289 248.4797 166.7233
25	19.83	241.2172	242.2250	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	Pentadecanoic acid	208.9761	184.0016 118.9656 146.9612
26	19.93	279.2332	280.2410	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	Linoleic acid	96.9590	
27	20.03	293.1795	294.1873	C <sub>17</sub> H <sub>26</sub> O <sub>4</sub>	Gingerol	96.9590	
28	20.50	325.1844	326.1922	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	Linderanolide	183.0116	170.0036
29	20.63	255.2329	256.2407	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	palmitic acid	239.6331	250.4507
30	20.89	281.2488	282.2566	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	oleic acid	96.9590	163.0759 191.0716 149.0595
31	21.18	325.1846	326.1924	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	hexahydroxytetradecan-1-ol	183.0117	216.0095
32	22.01	283.2645	284.2723	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	Stearic acid	265.2519	237.2279 190.0445 152.9670
33	22.21	761.5975	762.6053	C <sub>46</sub> H <sub>82</sub> O <sub>8</sub>	Non identifié	-	
34	22.94	535.3136	536.3214	C <sub>26</sub> H <sub>48</sub> O <sub>11</sub>	Non identifié	-	
35	23.31	311.2958	312.3036	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	Arachidic acid	183.0117	216.0093
36	26.80	367.3584	368.3662	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	Tetracosanoic acid	199.9478	
37	27.03	381.2319	382.2397	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	19-Acetoxylichesteric acid	96.9590	122.9748

Dans l'analyse des composés de plus forte polarités, **37 produits** ont été détectés, dont **35 identifiés** et **2 non identifiés (NI)**, Les composés identifiés étaient principalement des depsides, depsidones, composés aromatiques, acide aliphatique et acides gras qui ont été déjà identifiés dans les autres extraits cités ci dessus et dans également dans les différents extraits de *Parmotrema hypoleucinum* et *Physcie mediterranea*.

Il existe quatre composés chimiques (**Pics 7, 9, 10 et 12**) qui ont été signalés seulement dans l'extrait ethanolic de *Parmelia reticulatum*.

Le **pic 7** a été identifié comme étant l'**acide Polygalaxanthone III**, qui montrait un ion [M - H] - à m / z 567.1359. Ses principaux ions filles étaient à m / z 371,0479, 309,0406, 253,0506 et 209,0605. La polygalaxanthone III est un glucoside de xanthone isolé de la racine de polygala qui a montré un effet de piégeage potentiel sur le DPPH et les radicaux hydroxy et une activité réductrice sur Fe 3+ avec des valeurs IC 50 de 76,1, 83,5 et 54,9 mM.

Les **pics 9 et 10** ont été identifiés comme étant la **Parietine** et l'**acide Ethyl everninate**, qui ont montré respectivement des ions [M - H] - à m / z 283.0614 et 209.0850. La Parietin a produit des ions à m / z 375,0722 et 167,0345 tandis que l'acide Ethyl everninate a produit des ions à m / z 209,0002 et 193,0503

Le **parietine** a été trouvé chez l'espèce *Xanthoria parietina* (Huneck et Yoshimura, 1996), c'est une antraquinone de couleur orange-jaunâtre qui absorbe la lumière bleue et protège le photobionte **contre l'oxydation** par un rayonnement solaire excessif.

Le **pic 12**, a été identifié comme étant l'**acide Physodalic**, qui montrait un ion [M - H] - à m / z 415.0674. sa fragmentation a donné lieu à d'autres ions à m / z 371,0479, 309,0406, 253,0506 et 209,0605,

Selon les travaux de **Bialonska et al., 2005**, l'implication de l'acide physodique est très spécifique dans la gestion du stress environnemental comme la tolérance aux métaux de l'environnement.

### Chapitre III : Evaluation de l'activité antioxydante des 3 espèces étudiées

L'activité anti-radicalaire de nos extraits a été évaluée par la méthode spectrométrique au DPPH.

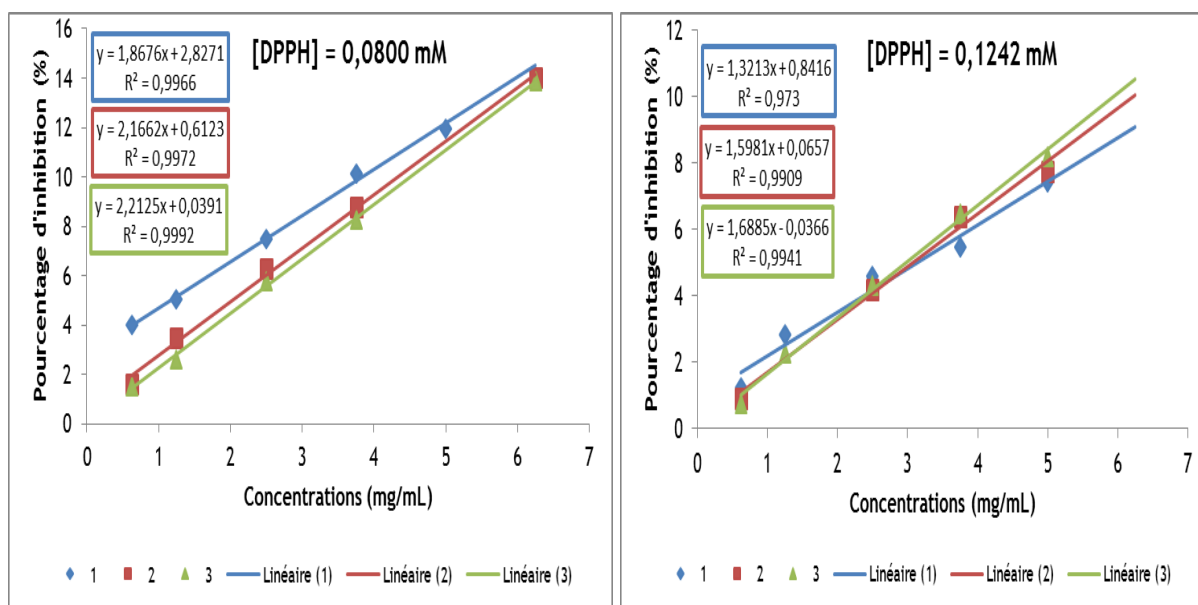
La molécule de DPPH est un radical libre de couleur violet foncé, caractérisée par une bande d'absorption comprise entre 515-520 nm. Le dosage piégeage du radical libre DPPH est basé sur la réduction de ce dernier lorsqu'il est mélangé avec un antioxydant tel que les polyphénols, ce qui conduit à une perte de sa couleur violette qui vire au jaune pâle et à une réduction de son absorption à 520 nm (Molyneux, 2004 et Watson, 2014).

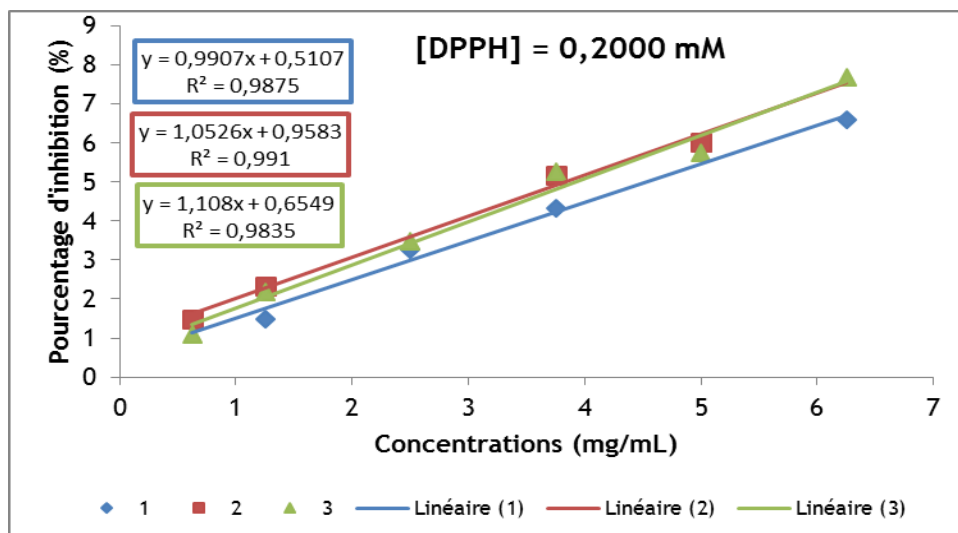
Dans la détermination de l'activité antioxydante par la méthode DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl), après avoir mesuré les absorbances, il est nécessaire de calculer le % I, afin de calculer ultérieurement l'IC50. Pour obtenir ce paramètre, il est nécessaire de tracer le % I en fonction de la concentration de l'échantillon dans la cellule du spectrophotomètre, pour chacune des concentrations de DPPH utilisées (figure 60 -figure 67). Les tableaux 35 – 37 montrent les résultats pour les paramètres IC50 et AAI, des extraits étudiés, les standards antioxydants utilisés sont : (rutine, trolox et acide gallique).

Les résultats de l'activité antioxydante sont conformes à l'indice d'activité antioxydante (AAI). Nous avons la classification suivante : pauvre ( $AAI < 0,5$ ) ; moyenne  $0,5 < AAI < 1,0$  ; forte ( $1,0 < AAI < 2,0$ ) et très forte ( $AAI > 2,0$ ) (Scherer et al., 2009).

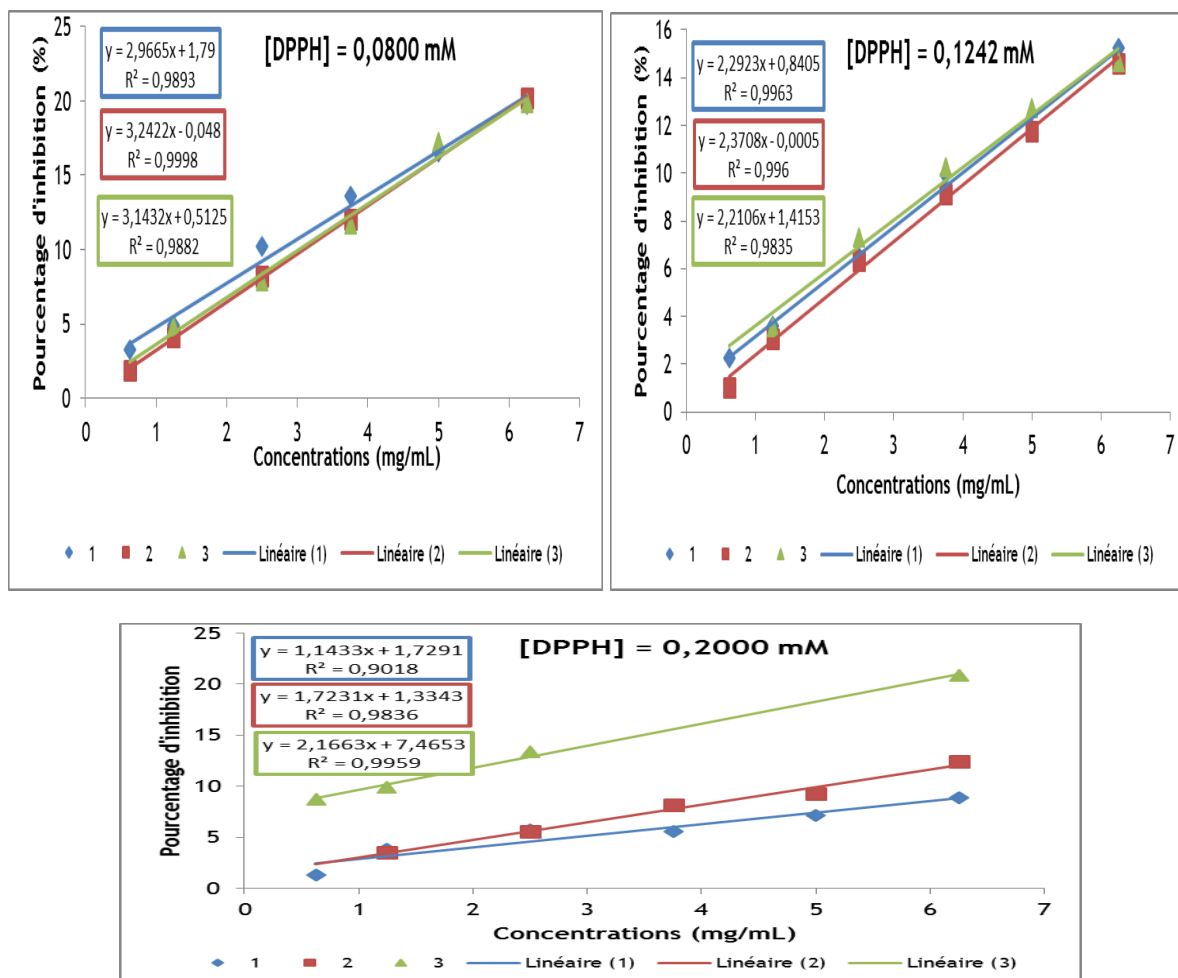
Les calculs des paramètres d'activité antioxydante présentés pour l'extrait éthanolique et chloroformique servent d'exemple pour ce qui a été calculé pour les normes antioxydantes. Les déterminations de ceux-ci se trouvent dans la section Annexes.

#### 1. Activité anti-oxydante de l'extrait éthanolique et chloroformique de *Parmotrema hypoleucinum* (Par hyp 1 et Par hyp 2)

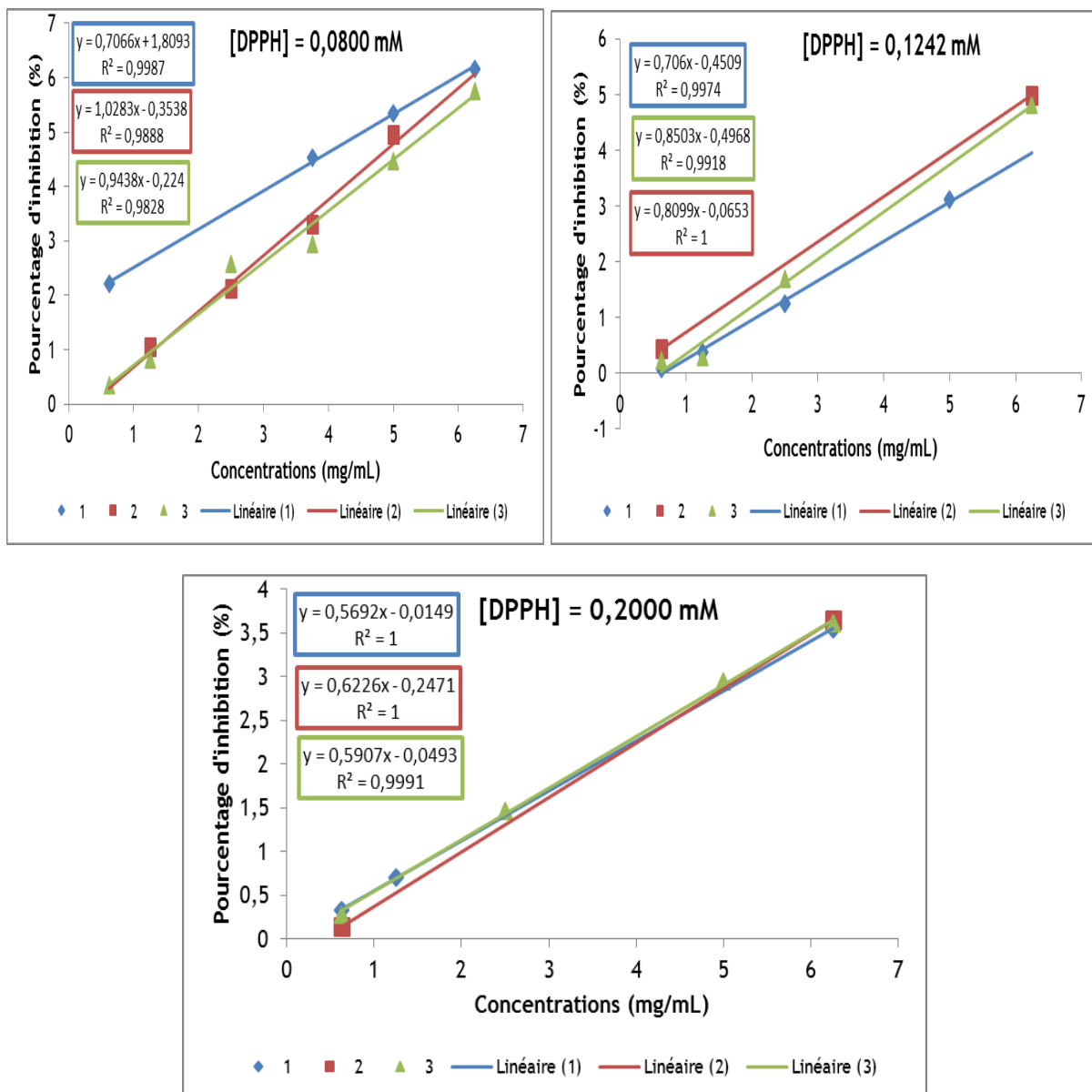




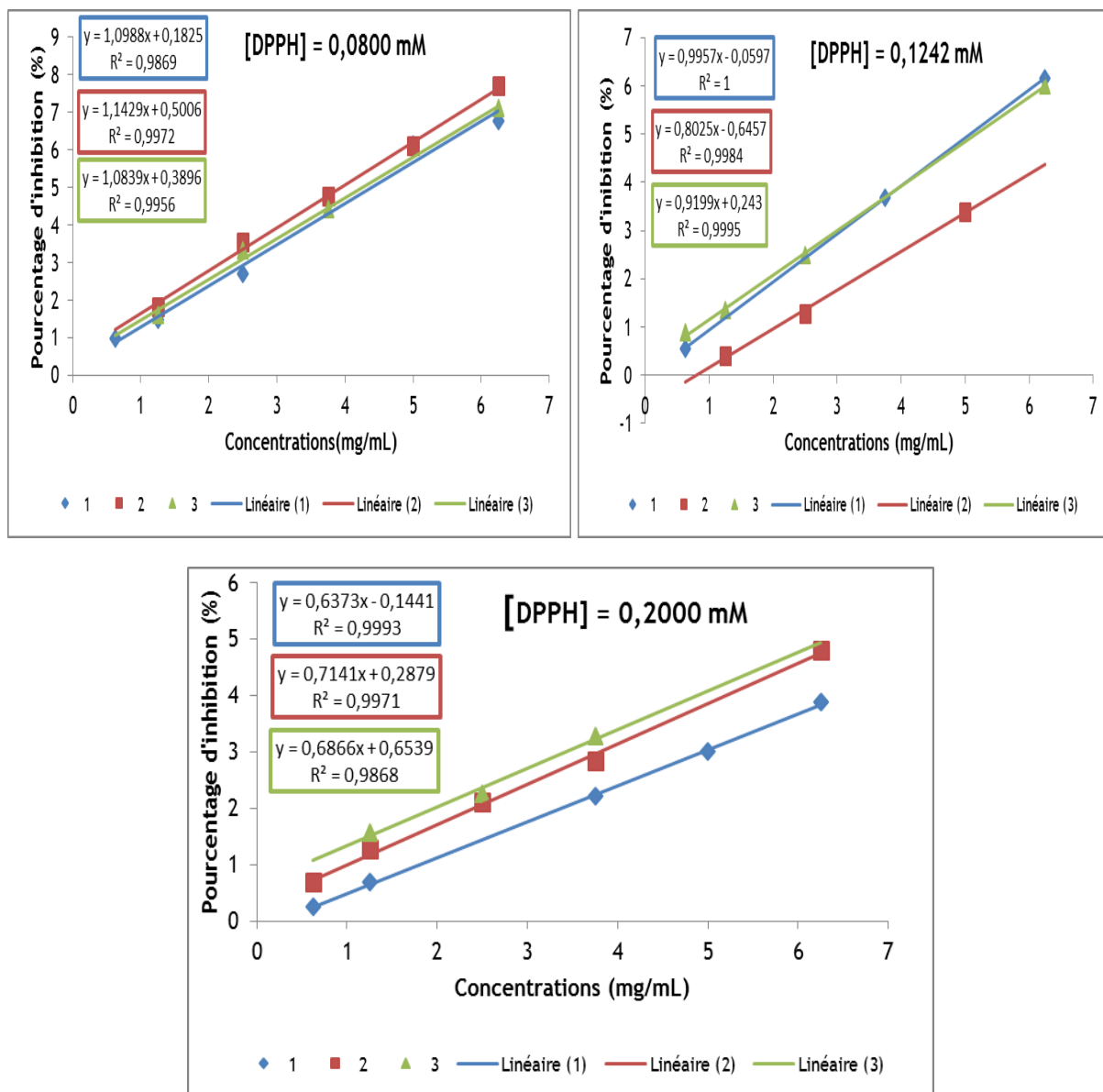
**Figure 60:** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique de *Par hyp* 1 dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0,0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM.



**Figure 61:** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique de *Par hyp* 2 dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0,0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM.



**Figure 62:** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait chloroformique de *Par hyp* 1 dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0,0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM.



**Figure 63:** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait chloroformique de *Par hyp* 2 dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0,0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM.

**Tableau 34:** Valeurs des IC 50, AAI et classification de l'activité antioxydante pour l'extrait éthanol, chloroforme et pour les étalons de rutine, de trolox et d'acide gallique de *P. hypoleucinum*.

Extraits	IC50 (µg/ml)	AAI	Activité antioxydante
Ethanolique ( <i>Par hyp 1</i> )	31.55	1.53	<b>Forte</b>
Ethanolique ( <i>Par hyp 2</i> )	22.56	2.08	<b>Plus Forte</b>
Chloroformique ( <i>Par hyp 1</i> )	68.43	0.72	<b>Moyenne</b>
Chloroformique ( <i>Par hyp 2</i> )	59.83	0.78	<b>Moyenne</b>
Rutine	8.10	6.00	<b>Plus Forte</b>
Troloxe	7.80	6.30	<b>Plus Forte</b>
Acide galique	2.00	23.9	<b>Plus Forte</b>

Les résultats indiqués dans le **tableau 35** présentent les concentrations des extraits qui piègent 50% du radical DPPH (IC50). Cette dernière est inversement liée à la capacité anti-oxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre de 50% ; plus la valeur d'IC50 est faible, plus l'activité anti-oxydante d'un composé est élevé (**Pokorny et al., 2001 in Djahra, 2014**).

Nous constatons à partir des résultats obtenus dans le **tableau 35**, que tous les extraits de *Parmotrema hypoleucinum* ont un pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH, et selon la classification de l'indice d'activité antioxydante (AAI), l'extrait éthanolique de *Par hyp 1* présente une activité antioxydante plus forte (AAI = 2.08) par rapport à l'extrait éthanolique de *Par hyp 2* qui a une activité seulement forte (AAI = 1.53), ceci est probablement due à la forte présence de composés phénolique dans l'extrait éthanolique de *Par hyp 1* que celui de *Par hyp 2*.

On remarque que l'extrait éthanolique de *P. hypoleucinum* sur les deux phorophytes présente une activité antioxydante plus forte par rapport à l'extrait chloroformique. Ceci s'explique par le fait que l'activité antioxydante dépend du type de solvant d'extraction et de sa polarité (le chloroforme est moins polaire que l'éthanol), Selon **Moure et al., 2001; Behera et al., 2005**, les différences d'activités antioxydantes de divers solvants pourraient être dues à leurs différentes capacités d'extraction de substances bioactives.

D'après les travaux précédemment effectués sur d'autres espèces lichéniques de la famille des Parmeliaceae et précisément le genre *Parmotrema*, on cite les espèces *Parmotrema pseudotinctorum* et *P. stuppeum* dont les composés phénoliques présentent une forte activité (**Prashith et al, 2009**), (**Anar et al, 2016**).

2. Activité anti-oxydante de l'extrait éthanolique et chloroformique de *Physcia mediterranea* Nimis

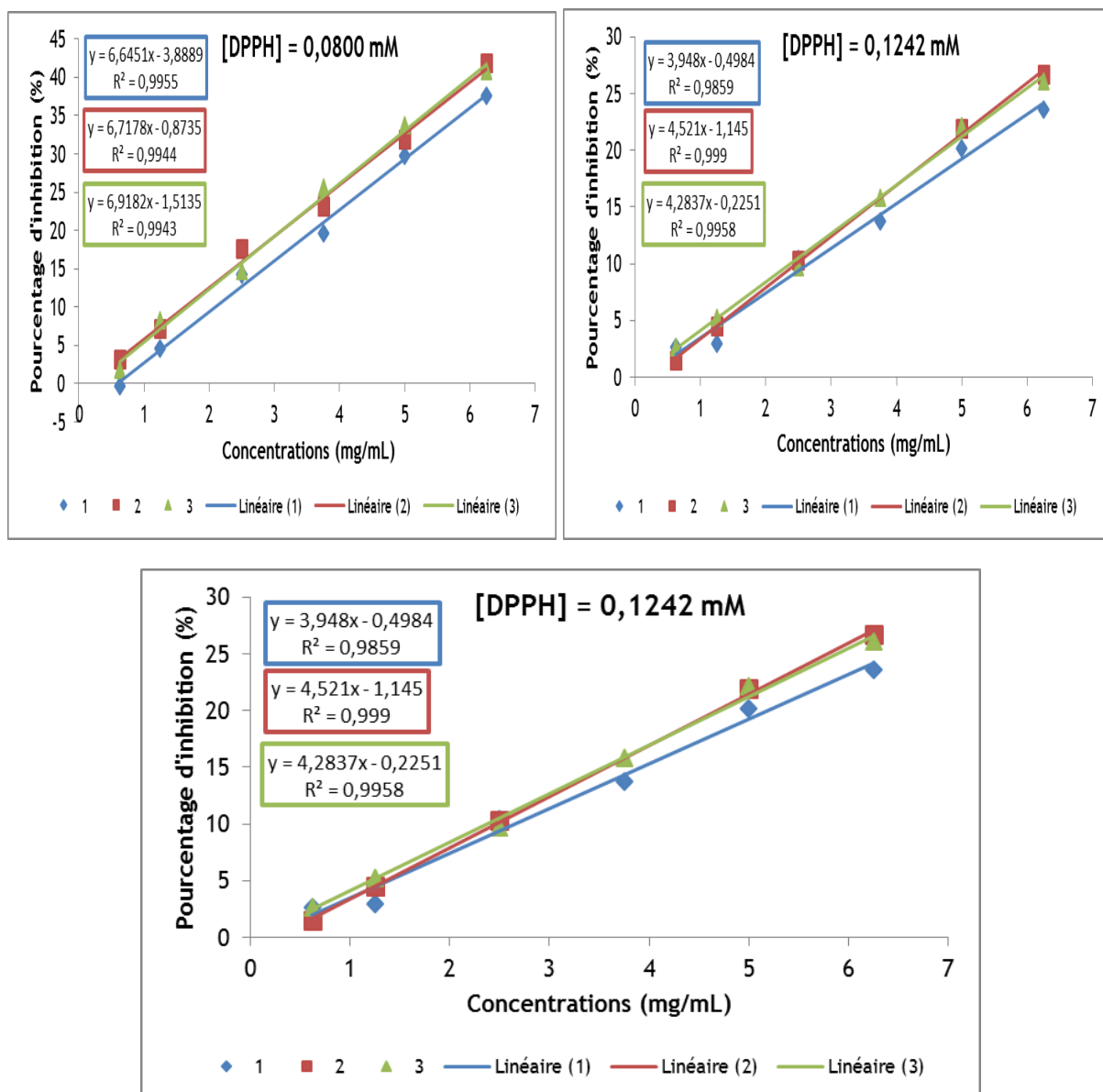
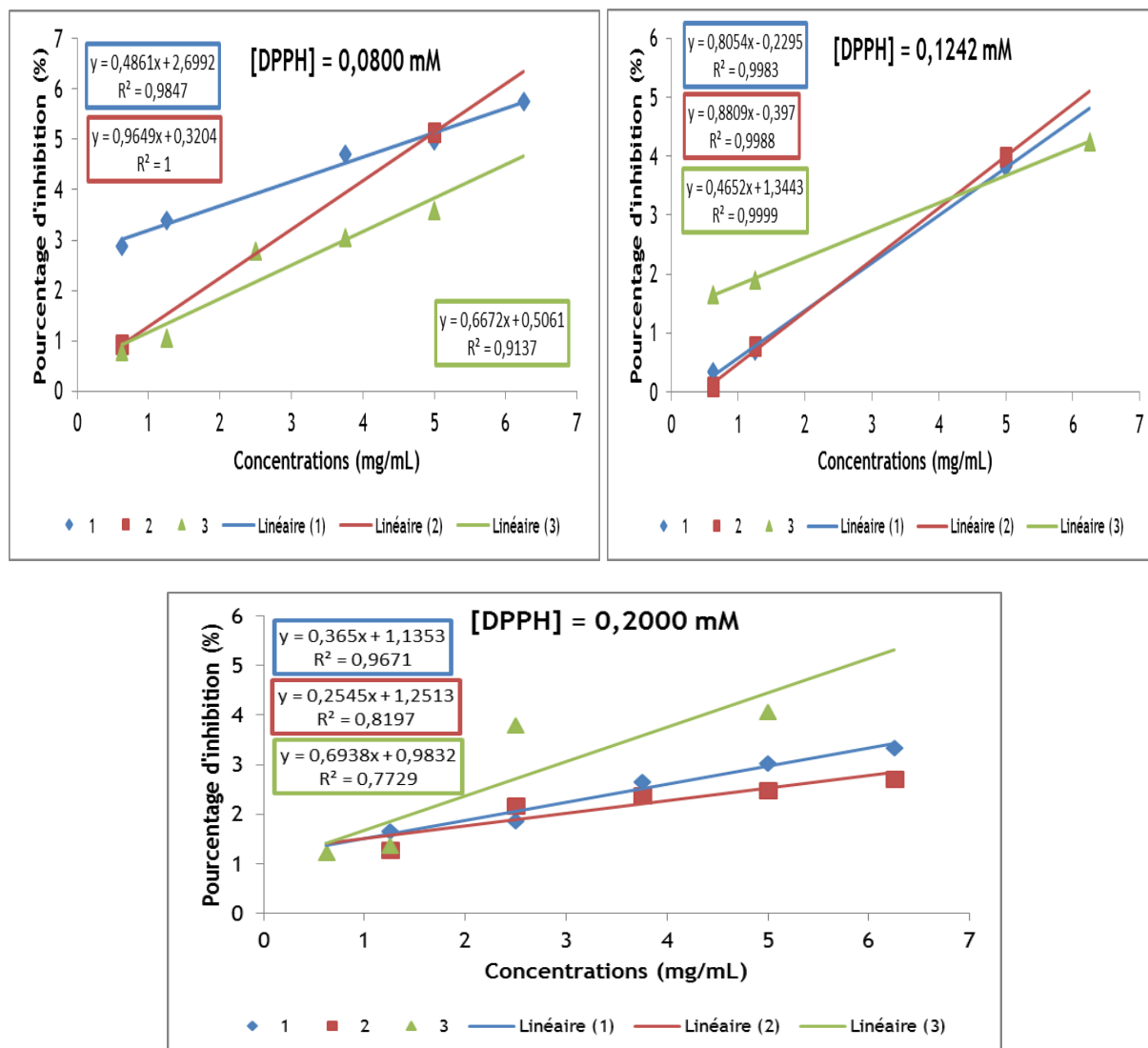


Figure 64: Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique de *Physcia mediterranea* dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0,0800 mM, 0,1242 mM et 0,2000 mM.



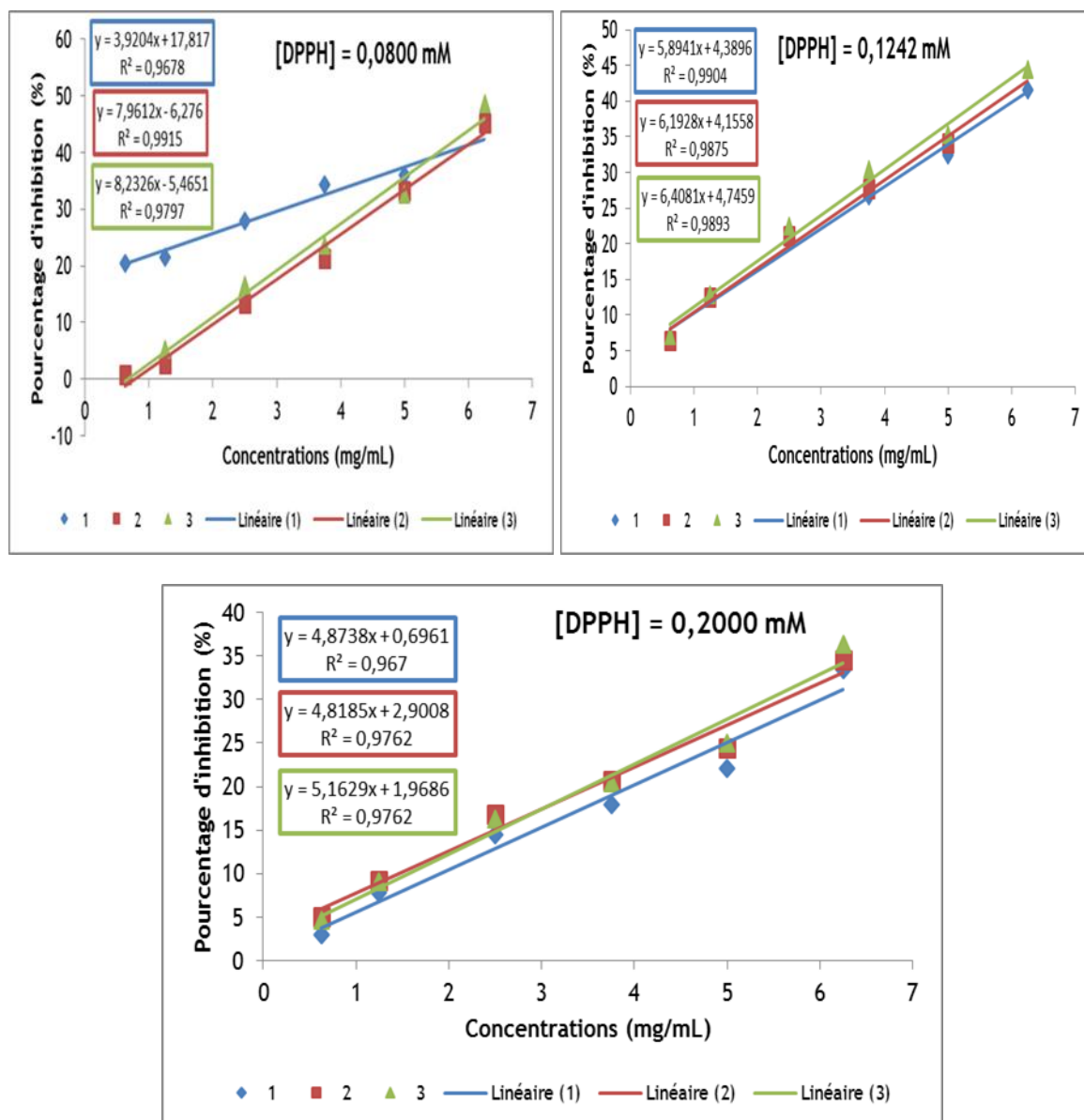
**Figure 65:** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait chloroformique de *Physcia mediterranea* dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0.0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM.

**Tableau 35:** Valeurs des IC<sub>50</sub>, AAI et classification de l'activité antioxydante pour l'extrait éthanolique, chloroformique et pour les étalons de rutine, de trolox et d'acide gallique de *Phscia mediterranea*.

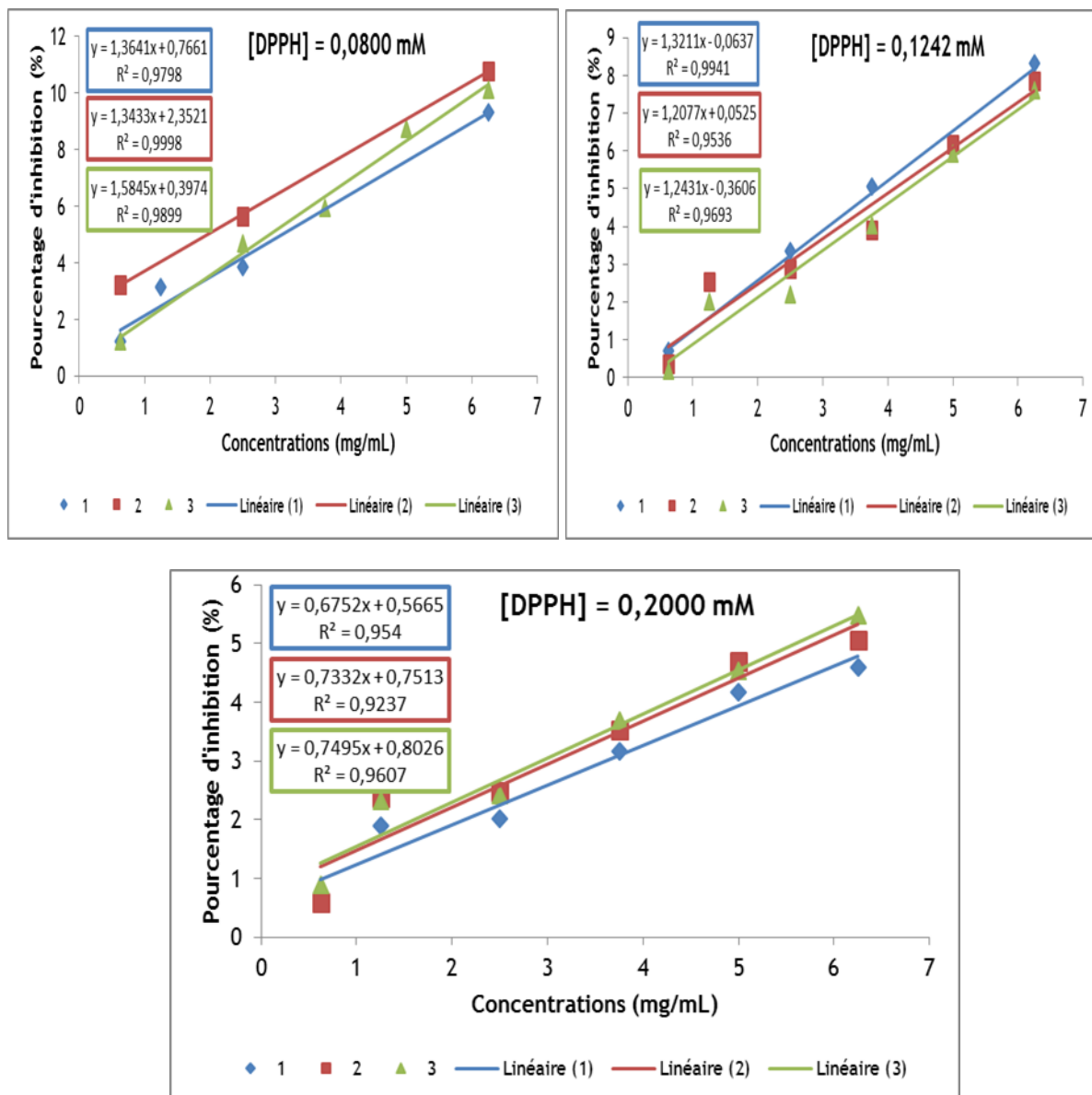
Extraits	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	AAI	Activité antioxydante
Ethanolique	14.93	2.80	<b>Plus Forte</b>
Chloroformique	93.39	0.48	<b>Faible</b>
Rutine	8.1	6.0	<b>Plus Forte</b>
Trolox	7.8	6.3	<b>Plus Forte</b>
Acide gallique	2.0	23.9	<b>Plus Forte</b>

Les résultats indiqués dans le **tableau 36**, montrent que l'extrait éthanolique de *Physcia mediterranea* présente une activité anti-radicalaire très élevée avec une (AAI= 2.80), par contre faible avec l'extrait chloroformique à une valeur de (AAI= 0.48).

### 3. Activité anti-oxydante de l'extrait éthanolique et chloroformique de *Parmotrema reticulatum*



**Figure 66:** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait éthanolique de *Parmotrema reticulatum* dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0.0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM.



**Figure 67:** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'extrait chloroformique de *Prmotrema reticulatum* dans la cellule du spectrophotomètre, pour la concentration en DPPH de 0.0800 mM, 0.1242 mM et 0.2000 mM.

**Tableau 36:** Valeurs des IC<sub>50</sub>, AAI et classification de l'activité antioxydante pour l'extrait éthanol, chloroforme et pour les étalons de rutine, de trolox et d'acide gallique de *Parmotrema reticulatum*.

Extraits	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	AAI	Activité antioxydante
Ethanolique	14.93	5.72	Plus Forte
Chloroformique	93.39	0.89	Moyenne
Rutine	8.1	6.0	Plus Forte
Trolox	7.8	6.3	Plus Forte
Acide gallique	2.0	23.9	Plus Forte

## Conclusion

Les résultats indiqués dans le **tableau 37**, montrent que l'extrait éthanolique de *P. reticulatum* a une activité anti-radicalaire très élevée avec une (AAI= 5.72), moyenne avec l'extrait chloroformique à une valeur de (AAI= 0.48).

D'après les résultats figurant dans les tableaux ci-dessus, nous remarquons que les trois contrôles positifs utilisés possèdent une activité anti-radicalaire puissante et supérieure à celle des extraits des lichens étudiés. En effet l'acide gallique est le plus actif avec une (AAI= 23.9), ensuite Trolox (AAI= 6.3) puis la Rutine (AAI= 6.0). Mais à l'exception de *Parmotrema reticulatum*, l'extrait éthanolique a une activité presque similaire (AAI= 5.72) (**tableau 37**) à celle de la Rutine et trolox.

Cette activité protège le thalle du stress oxydatif. De nombreuses études montrent que la forte activité antioxydante des lichens est liée à la présence de composés phénoliques chez ces espèces (**Mitrovic et al., 2011**).

L'activité antioxydante des acides phénoliques augmente avec l'augmentation du degré d'hydroxylation, comme c'est le cas de l'acide gallique (trihydroxylé), qui présente la valeur AAI la plus élevée

Jusqu'à présent, l'activité antioxydante de *Parmotrema hypoleucinum* et *Physcia mediterranea* n'ont pas été testées, la plus forte activité de ces extraits éthanoliques peut s'expliquer par la présence des composés chimiques riches avec des groupements hydroxyles tel que l'acide stictique, norstictique et lécanorique.

L'acide usnique a démontré un pouvoir antioxydant (**Cansaran et al., 2007, Kosanic et al., 2013**) et pourrait être associé à des composés responsables de l'activité de l'extrait éthanolique de *Parmotrema hypoleucineum*

La nature antioxydante des extraits testés pourrait dépendre de ces composés phénoliques. Nous avons constaté que les extraits testés avec la plus grande quantité de contenu phénolique présentaient l'activité antioxydante la plus élevée. Ces résultats concordent avec de nombreuses autres études sur l'activité antioxydante d'extraits à haute teneur en composés phénoliques (**Ranković et al., 2010 ; Odabasoglu et al., 2004**). Dans la plupart des lichens, les phénols, y compris les depsides, les depsidones et les dibenzofuranes, sont des antioxydants importants en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres tels que l'oxygène singulet, le superoxyde et les radicaux hydroxyle (**Kosani, Rankovi & Stanojkovi , 2012**).

En conclusion, on peut affirmer que les extraits de lichen testés ont présenté de puissantes activités antioxydantes. Sur la base de ces résultats, le lichen semble être une bonne source naturelle d'antioxydants et pourrait être aussi utile pour augmenter la valeur nutritionnelle de différents aliments.

## **Conclusion générale et perspectives**

## Conclusion générale & perspectives

En raison de l'importance biologique des produits naturels isolés des lichens, des études de la composition chimique globale a été réalisée sur trois espèces lichéniques choisies et récoltées au niveau de différents sites dans le Parc National d'el kala : *Parmotrema hypoleucinum* (Steiner) Hale, *Physcia mediterranea* Nimis et *Parmotrema reticulatum* (Taylor) M. Choisy.

Les Objectifs assignés à notre projet de these englobe dans un premier temps, l'étude phytochimique et l'identification des composés qui caractérisent les extraits obtenus des trois espèces étudiées. Dans un deuxième temps, l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits chloroformique et ethanologique des trois espèces lichéniques.

Dans une première partie, une étude a été portée sur l'identification botanique des espèces lichéniques ciblées, à leur identification chimique préliminaires par réactions thallines ainsi que leurs études histologiques très approfondies.

Ensuite, l'étude phytochimique des 3 espèces étudiées en présentant les résultats des analyses par GC/MS puis par UHPLC-ESI-MS/MS des différents extraits obtenus à partir des solvants d'extractions utilisés (Hexane, Ethanol et Chloroforme) et l'identification de l'atranorin composé majoritaire par RMN .

► La composition chimique de deux échantillons de ***Parmotrema hypoleucinum***, prélevés sur deux supports différents : *Olea europaea* et *Quercus coccifera*. Des échantillons estérifiés de 1-hexane et de 2-hexane ont été analysés par **GC-MS** pour identifier les composants de polarité inférieure. Dans les deux échantillons, les esters méthyliques des acides 2,4-dihydroxy-3,5,6-triméthylbenzoïques, de l'acide palmitique, de l'acide linoléique, de l'acide oléique, de l'acide stéarique et de l'hydrocarbure 13-méthyl-17-norkaur-15-ène (Probablement le produit naturel sera (-)-ent-kauran-16-ol), Esters méthyliques des acides 4-hydroxy-2-méthoxy-3,5,6-triméthylbenzoïque et 2,4-dihydroxy-3,6-diméthylbenzoïque; ces produits n'ont pas été trouvés dans l'échantillon estérifié de 2-Hexane.

Les échantillons estérifiés 1-Cire et 2-Cire ont été analysés par GC-MS pour séparer et identifier les composants de plus faible polarité. Dans l'analyse effectuée, l'acide 2,4-dihydroxy-3,5,6 triméthylbenzoïque et l'acide 2,4-dihydroxy-3,6-diméthylbenzoïque ont été trouvés comme produits existants dans les deux échantillons. Dans l'échantillon estérifié au 2-Cire, l'acide 2,4-diméthoxy-6-méthylbenzoïque, qui n'existe pas dans la fraction 1-Cire estérifiée, a également été identifié dans cette analyse (2-cire). Dans la fraction estérifiée 1-Cire, l'analyse a également identifié l'acide 4-hydroxy-2-méthoxy-3,6-diméthylbenzoïque, l'hydrocarbure 13-méthyl-17-norkaur-15-ène et un produit qui n'a pas été identifié avec une masse de 312, qui n'ont pas été trouvés dans l'échantillon estérifié de 2-Cire.

L'identification et la comparaison des composants des fractions originales de 1-Hexane et 2-Hexane par **HPLC-MS/MS** indiquent qu'elles sont très similaires et ne montrent presque aucune différence, à l'exception de quelques composants très mineurs ; dans ces fractions de faible polarité, les composants les plus caractéristiques de *P hypoleucinum* sont : **Atranol**,

**Chloroatranol, Atranorin et Chloroatranorin** ; un acide triterpénique identifié comme acide **ursolique** a également été trouvé dans les deux échantillons.

L'analyse des fractions 1-Cires et 2-Cires par HPLC-MS/MS montre qu'elles sont très similaires, présentant quelques petites différences dans certains composants mineurs. Les composants prédominants identifiés sont les **acides gras** en plus du produit prédominant **Atranorine** et **Chloroatranorine**, qui seront caractéristiques de ce lichen.

L'analyse effectuée par HPLC-MS/MS des extraits de 1-chloroforme et 2-chloroforme des deux échantillons de *P hypoleucinum* ainsi que la comparaison de leurs composants, montre de légères différences dans certains composés secondaires. Dans cette analyse, les acides suivants peuvent être considérés comme des produits caractéristiques du lichen : **acide constictique**, **acide norstictique** (cet acide n'a été trouvé que dans l'extrait 1-chloroforme), acide **stictique**, acide **substictique** et **chloroatranorine**.

L'analyse HPLC-MS/MS des extraits de 1-Ethanol et 2-Ethanol n'a pas enregistré de grandes différences, et la plupart de leurs composants ont été identifiés ; les composés suivants ont été trouvés comme plus représentatifs du lichen : **acide constictique**, **acide stictique**, **acide substictique** ; l'**acide méthylstictique** n'a été identifié que dans l'extrait de 1-Ethanol.

► La composition chimique de ***Physcia mediterranea* Nimis** : dans l'échantillon estérifiés de 3-hexane a été analysés par GC-MS, plusieurs acides aromatiques, un hydrocarbure 13-méthyl-17-norkaur-15-ène et des acides gras ont été identifiés. L'analyse par **RMN 1H** et **C13** de l'échantillon estérifié 3-Cire nous a permis de caractériser et d'identifier le depside l'atranorine, en tant que composant majeur dans ce lichen.

L'identification des composés des fractions originales de 3-Hexane et 3-Cire par **HPLC-MS/MS** indiquent la présence de l'**atranorine** et la **chloroatranorine** avec les produits minoritaires identifiés dans la fraction 3-Cire. Dans la fraction 3-Hexane, cette technique identifie les acides **paraconiques** et **aliphatiques**, les **depsides**, les **depsones**, les **composés phénoliques**, les **sesquiterpènes**, les **triterpènes** et les **éthers phényliques** en plus d'autres dérivés minoritaires.

Selon le profil chromatographique de l'extrait **chloroformique** de *Physcia*, les composés majoritaires identifiés ; l'acide **Isolecanorique**, l'acide **Gyrophorique** et l'**Atranorine** (depsides), l'acide **Endocrine** (anthraquinone), l'acide **EthyI 4-O-methylolivetolcarboxylate** et l'acide **6,7-dihydroxycoumarine** (composés aromatiques) et les **acides gras**. Dans cet extrait, on a également détecté des composés chimiques caractéristiques des végétaux supérieurs tels que : l'acide **1-O-cis-cinnamoyl-β-D-glucopyranose** est un glucoside d'origine végétale dérivé de l'acide cinnamique. L'acide **Nordihydrocapsiate** ; composé phénolique a été isolée dans (*Capsicum annuum*) (Kobata et al., 1999). L'acide **gracilioéther G** a été obtenu à partir du genre *Plakinastrella*, qui présente des activités biologiques importantes (Festa et al., 2013).

Le profil chromatographique d'extrait **ethanolique**, presente des composés qui ont été identifiés précédemment chez la même espèce dans l'extrait hexanique et l'extrait chloroformique.

► La composition chimique de *Parmotrema reticulatum*, dans l'échantillon estérifiés de 4-hexane et 4-cire ont été analysés par GC-MS : 10 produits en communs ont été identifiés, parmi lesquels les acides **Atrarique, Palmitoléique, Palmitique, Linoléique, Oléique, Stéarique**, un composé phénolique acide **2,4-dihydroxy-3, 5,6-triméthylbenzoïque** et un composé non identifié.

Les produits les plus caractéristiques de de la fraction 4-Hexane par HPLC-MS/MS sont l'acide 3-méthylorsellinique, l'atranol, l'acide 4-formylbenzoïque, le chloroatranol, l'acide p-coumarique, barbatique, l'atranorine et la chloroatranorine et des lactones comme N-dodécanoyl-L-homosérine lactone et le fukinanolide et 20 composés polyphénoliques tel que acide barbatiques, 8-hydroxybarbatiques, baecomycésiques, 4'-O-déméthylsekikaiques et acides 8-hydroxydiffractaïques. Les produits les plus caractéristiques de de la fraction 4-Cire par HPLC-MS/MS étaient principalement l'acide p-coumarique, Atranorine, Chloroatranorine, 8-Hydroxydiffractaïque et 19-Acetoxylichesterinique.

D'après le profil chromatographique de l'extrait chloroformique et ethanolique, les composés identifiés étaient principalement des depsides, depsidones, composés aromatiques, dibenzofurane, acide aliphatique et acides gras. Il existe trois composés qui ont été signalé seulement dans l'extrait chloroformique de *P. reticulatum* ; l'acide Barbatolic, l'acide Divaricatic et l'acide Succinique et la présence de l'acide (+)-usnique déjà détecté dans l'extrait chloroformique de *Physcia mediterranea*.

Il existe quatre composés chimiques qui ont été signalés seulement dans l'extrait ethanolique de *Parmelia reticulatum*, l'acide Polygalaxanthone III Parietine, Ethyl everninate et acide physodalique.

► Les potentialités antioxydants des extraits chloroformiques et éthanoliques de *Parmotrema hypoleucinum*, *Physcia mediterranea* Nimis et *Parmotrema reticulatum*, ont été évaluées par le test de piégeage des radicaux libres par la méthode du radical libre DPPH, Les résultats obtenus ont révélé une importante activité anti-oxydante dans l'extrait ethanolique de ces trois espèces, par contre les extraits chloroformiques de *P. hypoleucinum* et *P. reticulatum* montrent une activité moyenne, enfin une faible activité antioxydante a été détectée chez *Physcia mediterranea*.

Ces résultats confirment les propriétés pharmacologiques de ces trois espèces étudiées, qui sont principalement dues à la composition phytochimique des extraits étudiés.

A partir de ces résultats, il serait souhaitable de :

- ❖ Elargir le panel des activités anti-oxydantes in vivo et pourquoi pas d'autres tests biologiques : anti-tumoraux et anticancéreux.
- ❖ Poursuivre les travaux de fractionnement pour arriver à ressortir une quantité suffisante de molécules pures pour permettre de réaliser tous les tests biologiques.

**PARTIE IV** Partie expérimentale (Méthodes analytiques & Appareillages)

Deux techniques chromatographiques : analytiques et séparatrices ont été utilisées. Une technique d'identification de l'atranorin par RMN, et enfin description de l'activité antioxydante par DPPH, L'ensemble des informations nécessaires et relatives à chacune des méthodes sont décrites ci-dessous.

### 1. Méthode d'analyse des extraits par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au Spectre de Masse (GC/MS) :

Les constituants des extraits de n-hexane ; la partie insoluble dans le méthanol (cires) et la partie soluble dans le méthanol froid (hexane) ont été estérifié avec le diazométhane, et analysé par GC-MS pour séparer et identifier les composants chimiques les moins polaires de ces extraits.

Pour l'analyse GC-MS, un spectromètre de masse Agilent MS220 (Varian, Inc. Walnut Creek, CA, USA) couplé à un GC 7890A. La température du four a été initialement réglée à 50 °C, maintenue pendant 5 min, puis une rampe de 30 °C / min a été appliquée jusqu'à 270 °C qui a été maintenue pendant 5 min supplémentaires. Les spectres MS ont été acquis en mode EI avec une gamme de masse de 50 à 600 uma avant d'être injectée dans le système GC-MS, la fraction ME-hex a été préestérifiée avec du diazométhane, afin d'identifier d'éventuels composés moins polaires dans cette fraction. Il a été ensuite solubilisé dans du dichlorométhane et injecté dans l'appareil.

### 2. Méthode d'analyse des extraits par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem à ionisation par électrospray (HPLC / ESI-MS / MS)

Les extraits lichéniques obtenus par les différents solvants d'extraction choisis dans notre travail ont été analysés par (HPLC / ESI-MS / MS), ce qui nous permet d'avoir l'ion moléculaire négatif, de proposer sa formule moléculaire et d'identifier le composé.

Les analyses HPLC-ESI-MS-MS ont été effectuées sur un spectromètre de masse orbitrap Thermo q-Exactive couplé à une HPLC Vanquish.

- **Paramètres LC :** Pour la séparation HPLC, un Kinetex XB-C18 (Phenomenex) avec une taille de particule de 2,6 microns, 100 mm de longueur et un diamètre de 2,1 mm a été utilisé comme colonne. Comme solvant A, l'eau avec 0,1% d'acide formique a été utilisée et comme solvant B, on a choisi l'acétonitrile. Le débit de la colonne 0,200 ml / min. La durée totale de l'analyse a été fixée à 30 min, Le programme de gradient suivant a été utilisé :

Temps (min)	A %	B %
0	50	50
20	0	100
25	0	100
26	50	50

## - Paramètres MS

Pour l'ionisation, l'électro pulvérisation en mode négatif a été utilisée, avec les paramètres suivants : tension d'électro spray -3,8 kV, gaz de gaine 30, gaz Aux 10, température du gaz de séchage 310 °C. Capillaire temp. 320 et valeur de l'objectif S de 55,0.

L'acquisition a été effectuée dans une plage de masse de 100 à 1000 uma (unité de masse atomique) et un programme auto MS2 a été utilisé avec une tension de fragmentation de 30.

## 3. Spectrométrie de résonance Magnétique Nucleaire(RMN)

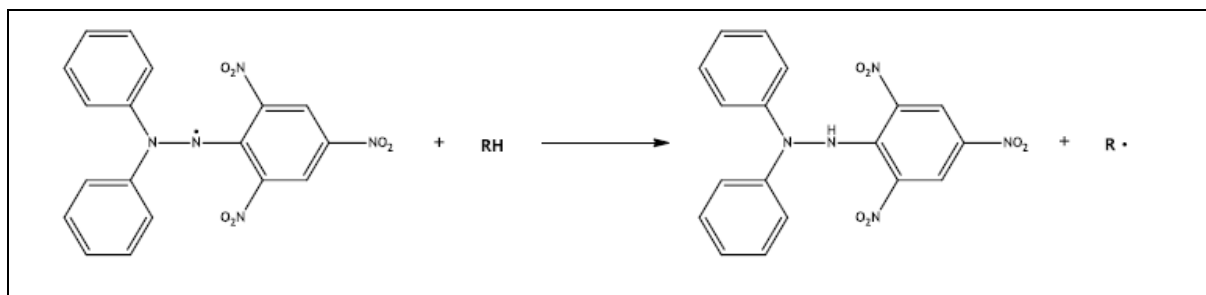
Analyse RMN 359 Les spectroscopies RMN du proton  $^1\text{H}$  et du carbone  $^{13}\text{C}$  ont été enregistrées sur un spectromètre Brüker Advance 360 III 400 MHz (Brüker Scientific Inc, USA) à 400 MHz pour le proton et 100 MHz 361 pour le carbone respectivement. Le WA récupéré a été dissous dans du solvant deutéré ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 362 (5 mg/mL) et chauffé à 95 °C. La solution a été transférée dans des tubes 363 de diamètre extérieur de 5 mm et les spectres ont été acquis à 90 °C. Le signal de pic résiduel du solvant deutéré 364 était pour les spectres  $^1\text{H}$  à 7,26 ppm et les spectres  $^{13}\text{C}$  à 77,2 ppm. Les déviations chimiques ( $\delta$ ) 365 sont exprimées en parties par million (ppm) et les constantes de couplage (J) en Hertz. Les données 366 ont été traitées à l'aide du logiciel TOPSPIN 3.5 (Brüker Scientific Inc.)

## 4. Test biologique : Activité anti-oxydante (DPPH)

Le principe de cette methode est le suivant : La mise en évidence de l'activité anti-oxydante des extraits des lichens étudiés a été réalisée par la méthode de piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) comme décrit par les auteurs **Scherer et Godoy, 2009** ; **Lucas, M.F., 2017**, largement utilisé pour décrire le pouvoir anti-radicalaire de différentes matrices.

Le radical libre 2,2-diphényl-1-picrilhidrazil (DPPH) est relativement stable et sensible à la lumière, il possède un électron dépareillé, ce qui lui donne une couleur violette, l'absorbant à une longueur d'onde spécifique (517 nm). Lorsqu'il est placé en présence d'un antioxydant, il y a une réduction de DPPH. L'atome d'azote de DPPH reçoit un atome d'hydrogène de l'espèce antioxydante, formant la diphényl-picrilhidrazina qui présente de manière caractéristique une couleur jaune (Fig.23). En parallèle, une réduction de la couleur se produit, ce qui conduit à la disparition de l'absorbance, avec une augmentation progressive ou brutale de sa diminution en fonction du pouvoir de l'antioxydant.

L'activité de piégeage des radicaux DPPH est la base de toute la méthode. Cette activité s'exprime par le pourcentage d'inhibition (% I), qui n'est pas supérieur au pourcentage de radicaux DPPH qui ont été éliminés, c'est-à-dire qui ont été séquestrés. Les résultats obtenus permettent également de calculer la concentration inhibitrice ( $\text{IC}_{50}$ ), qui est définie comme la concentration d'antioxydant nécessaire pour réduire la concentration initiale de DPPH de 50%. Plus la consommation de DPPH par un antioxydant est élevée, plus sa  $\text{CI}_{50}$  est basse et, par conséquent, plus son activité antioxydante est élevée. (**Scherer et Godoy, 2009** ; **Amorati et Foti, 2013**).

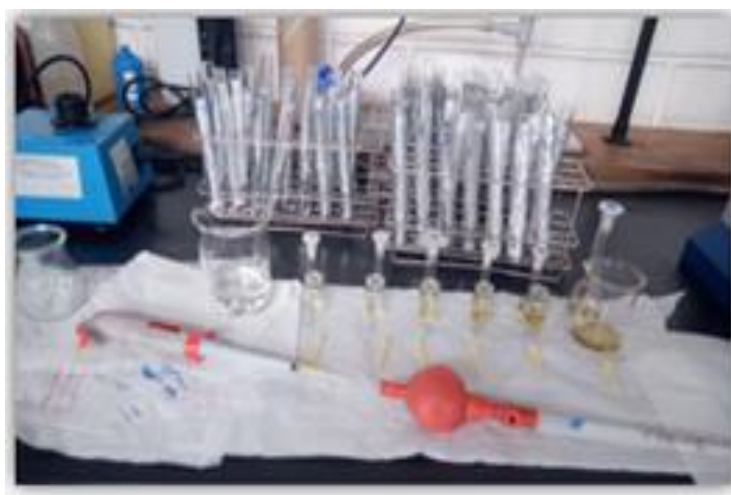


**Figure 68:** Réaction entre le radical libre DPPH et le composé antioxydant (RH), qui se traduit par la formation de diphenyl-picrilhydrazine. (Amorati et Foti, 2013).

Il existe plusieurs manières d'exprimer les résultats de l'activité antioxydante obtenue dans la méthode DPPH. Le plus utilisé aujourd'hui est l'indice d'activité antioxydante (AAI), qui le classe comme pauvre, moyenne, fort ou très fort.

Pour déterminer l'activité antioxydante de l'extrait, il a été nécessaire de préparer trois solutions de DPPH de concentrations 0,2000, 0,1242 et 0,0800 mM par jour, peser 0,0197 g de DPPH et dissoudre dans 250 ml de méthanol. Les autres solutions ont été préparées en diluant la solution mère. Pour les échantillons, des solutions avec des concentrations de 25, 50, 100, 150, 200 et 250 µg / ml ont été préparées, pour cela, 0,0062 g d'échantillon a été pesés et dissous dans 25 ml d'éthanol, pour obtenir la solution mère avec une concentration de 250 µg / ml, les solutions restantes ont été préparées en diluant la solution mère de l'échantillon (Scherer et Godoy, 2009 ; Lucas, 2017).

Pour chaque solution de DPPH préparée et pour chaque concentration de l'extrait, la procédure expérimentale suivante a été réalisée : à 0,10 ml d'échantillon, 3,9 mL de solution de DPPH ont été ajoutés. On laisse incuber dans l'obscurité, à température ambiante, pendant 90 minutes, Pour chaque solution de DPPH, un contrôle constitué de 0,10 mL de méthanol et 3,9 mL de solution de DPPH a été préparé, qui a été soumis aux mêmes conditions que les échantillons à l'étude. Le blanc ne contenait que du méthanol. Les tests ont été réalisés en trois exemplaires (Scherer et Godoy, 2009 ; Lucas, 2017). La lecture a été effectuée à 517 nm à l'aide du spectrophotomètre Thermo Scientific Evolution.



**Figure 69:** Activité antioxydante des extraits lichéniques

Après avoir déterminé les absorbances, le pourcentage d'inhibition a été calculé sur la base de la formule suivante :

$$\%I = (Abs_0 - Abs_1 / Abs_0) * 100$$

Où  $Abs_0$  est l'absorbance du contrôle à 90 minutes et  $Abs_1$  est l'absorbance de l'échantillon à 90 minutes. (Scherer et Godoy, 2009 ; Lucas, 2017)

La concentration des extraits responsables de 50% de l'inhibition ( $IC_{50}$ ) a été calculée à partir de la linéarité obtenue dans la représentation graphique du % I en fonction de la concentration de l'échantillon dans la cellule du spectrophotomètre. En utilisant la courbe d'étalonnage, la concentration de DPPH dans le contrôle a été obtenue à 90 minutes et à partir de celle-ci et de la  $IC_{50}$ , l'indice d'activité antioxydante (AAI) à partir de la formule suivante : (Scherer et Godoy, 2009 ; Lucas, 2017)

$$AAI = \text{DPPH en contrôle à 90 minutes } (\mu\text{g/ml}) / IC_{50} (\mu\text{g/ml})$$

La valeur AAI obtenue a permis de classer l'activité antioxydante de l'extrait selon les catégories citées dans le **tableau 38**. (Scherer et Godoy, 2009 ; Lucas, 2017).

**Tableau 37: Classification d'un échantillon selon le type d'activité antioxydante montré**

Activité antioxydante	AAI
Faible	$AAI < 0.5$
Moyenne	$0.5 < AAI < 1.0$
Forte	$1.0 < AAI < 2.0$
Très forte	$AAI > 2.0$

**References bibliographique**

1. Barth, A. (1985). L'utilisation actuelle des algues et des lichens en pharmacie et en alimentation. These de doctorat en pharmacie, Paris XI, n°35/83, 12-49. Ann. Pharm Fr, 64 : 373-381.
2. Biéro, T., Laroubine, C., Lottin, N., and Vaudoré, D. (2008) Les lichens de Normandie (Actes du Colloque). Val d'Orne Environ. Société Linnéenne Normandie Parc Nat. régional Normandie Maine, p 94.
3. Elix, J.A.(1996). Biochemistry and secondary metabolites. In Lichen biology. Nash T. H., Ed. Cambridge University Press, Cambridge. pp 154-180.
4. P.N.E.K., 2010. Plan de gestion du Parc National d'El Kala. Direction du Parc National d'El Kala, 92 p
5. Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, E. (2000). Biologie végétale, De Boeck, Royaume-Uni, p 733.
6. Souchon C. (1971). « Que sais-je » Les lichens. Presses universitaires de France, Paris, 137p.
7. Pokorný,J.,& KORCZAK, J.(2001). Preparation of natural antioxidants. Antioxidants in food, 311-330.
8. . Häffner, E., Lomský, B., Hynek, V., Hällgren, J. E., Batič, F., & Pfanz, H. (2001). Air pollution and lichen physiology. Physiological responses of different lichens in a transplant experiment following an SO<sub>2</sub>-gradient. Water, Air, and Soil Pollution, 131(1-4), 185-201.
9. .Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. Journal of agricultural and food chemistry, 61(46), 10835-10847.
10. Ivanova, V., Backor, M., Dahse, H.M., Graefe, U., (2010). Molecular structural studies of lichen substances with antimicrobial, antiproliferative, and cytotoxic effects from *Parmelia subrudecta*. Prep. Biochem. Biotechnol. 40, 377–388.
11. Gilbert O. (2000). Lichens. Harper Collins, Canada, 288 p.
12. Slimani, R.(2014) . Inventaire de la flore lichénique au niveau du Parc National d'El Kala et extraction de quelques dérivés lichéniques. These de doctorat LMD, Université Badji Mokhtar. Annaba. 242p
13. Abo-Khatwa, A. N., Al-Robai, A. A., & Al-Jawhari, D. A. (1996). Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. Natural Toxins, 4(2), 96-102.
14. Agelet, A., Vallès, J. (2003). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part III. Medicinal uses of non-vascular plants. J Ethnopharmacol 84:229–234.

15. AHAD, A. M., GOTO, Y., KIUCHI, F., TsUDA, Y., KoNDō, K., & SATō, T. (1991). Nematocidal principles in " oakmoss absolute" and nematocidal activity of 2, 4-dihydroxybenzoates. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 39(4), 1043-1046.
16. Akbar, S., & Akbar, S. (2020). *Dolichousnea longissima* (Ach) Articus/*Parmelia perlata* Esch.(Parmeliaceae) (Formerly Known as *Usnea longissima*). *Handbook of 200 Medicinal Plants: A Comprehensive Review of Their Traditional Medical Uses and Scientific Justifications*, 873-878.
17. Akhtar, N., Malik, A., Ali, S. N., & Kazmit, S. U. (1992). Proceragenin, an antibacterial cardenolide from *Calotropis procera*. *Phytochemistry*, 31(8), 2821-2824.
18. Amorati, R., Foti, M. C., & Valgimigli, L. (2013). Antioxidant activity of essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(46), 10835-10847.
19. Amrani, S., Seaward, M. R., Sipman, H. J., & Feuerer, T. (2018). Lichenological exploration of Algeria II: checklist of lichenized, lichenicolous and allied fungi. *Herzogia*, 31(2), 817-892.
20. Anar, M., Aslan, A., Agar, G., & Ozgencli, I. (2016). Antigenotoxic and antioxidant activity of lichens *Anaptychia ciliaris*, *Bryoria fuscescens*, *Parmotrema chinensa* and *Xanthoria candelaria*: An in vitro study. *Med Aromat Plants*, 5(233), 2167-0412.
21. Aouadi, H. (1989). *La végétation de l'Algérie nord-orientale: histoire des influences anthropiques et cartographie à 1/200 000* (These de doctorat, Grenoble 1).
22. Aprile, G. G., Catalano, I., Migliozi, A., & Mingo, A. (2011). Monitoring epiphytic lichen biodiversity to detect environmental quality and air pollution: The case study of Roccamonfina Park (Campania Region–Italy). *Air Pollution-New Developments*, 227-244.
23. Ari, F., Ulukaya, E., Oran, S., Celikler, S., Ozturk, S., & Ozel, M. Z. (2015). Promising anticancer activity of a lichen, *Parmelia sulcata* Taylor, against breast cancer cell lines and genotoxic effect on human lymphocytes. *Cytotechnology*, 67, 531-543.
24. ASTA, J. (1975). Contribution à l'étude de la flore et de la végétation lichéniques du massif des Aiguilles Rouges et du massif du Mont-Blanc. *Annales du centre universitaire de Savoie*, 107-140.
25. Asta, J., Delzenne-Van Haluwyn, C., Bertrand, M., Sussey, J. M., & Gavériaux, J. P. (2016). *Guide des lichens de France: Lichens des roches*. Belin.
26. Atalay, F., HALICI, M. B., Mavi, A., Cakir, A., Odabaşoğlu, F., Kazaz, C., ...& Küfrevioğlu, Ö. İ. (2011). Antioxidant phenolics from *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. and *Usnea longissima* Ach. lichen species. *Turkish Journal of chemistry*, 35(4), 647-661.
27. Aubert, S., Juge, C., Boisson, A. M., Gout, E., & Bligny, R. (2007). Metabolic processes sustaining the reviviscence of lichen *Xanthoria elegans* (Link) in high mountain environments. *Planta*, 226, 1287-1297.

28. Avdeeva, E., Shults, E., Rybalova, T., Reshetov, Y., Porokhova, E., Sukhodolo, I., ... & Belousov, M. (2019). Chelidonic acid and its derivatives from *Saussurea Controversa*: Isolation, structural elucidation and influence on the osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells in vitro. *Biomolecules*, 9(5), 189.
29. Babula, P., Masarik, M., Adam, V., Provaznik, I., & Kizek, R. (2013). From Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cardiac glycosides to cytotoxicity and cancer treatment. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 13(7), 1069-1087.
30. Barreto, R. S., Albuquerque-Júnior, R. L., Pereira-Filho, R. N., Quintans, J. S., Barreto, A. S., DeSantana, J. M., ... & Quintans-Júnior, L. J. (2013). Evaluation of wound healing activity of atranorin, a lichen secondary metabolite, on rodents. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(2), 310-319.
31. Behera, B. C., Verma, N., Sonone, A., & Makhija, U. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *Biotechnology letters*, 27, 991-995.
32. Benitez-Lopez, A., Alkemade, R., Schipper, A. M., Ingram, D. J., Verweij, P. A., Eikelboom, J. A. J., & Huijbregts, M. A. J. (2017). The impact of hunting on tropical mammal and bird populations. *Science*, 356(6334), 180-183.
33. Benyacoub S. (1993) – Ecologie de l'avifaune forestière nicheuse de la région d'El-Kala (Nord-Est Algérien). Thèse de doctorat : Sciences biologiques fondamentales et appliquées, psychologie : Université de Dijon.
34. Benyacoub, S., Louanchi, M., Baba Ahmed, R., Benhouhou, S., Chalabi, B., Haou, F., ... & Rouag, R. (1998). Plan directeur de gestion du Parc National d'El Kala et du complexe des zones humides. Projet GEF (Global Environment Facility)-Banque Mondiale, 220.
35. Białońska, D., & Dayan, F. E. (2005). Chemistry of the lichen *Hypogymnia physodes* transplanted to an industrial region. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 2975-2991.
36. Biswas, K. (1947). The lichen flora of India. *J Roy Asiatic Soc Bengal Sci* 13:75–113
37. Boumedris, Z. E. (2014). Utilisation de la bio indication lichenique (méthode de it. pa) pour l'évaluation de la pollution atmosphérique dans la région d'annaba, est de l'algerie. Thèse de Doctorat., Univ. Annaba, Algérie.
38. Boustie, J., & Grube, M. (2005). Lichens—a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources*, 3(2), 273-287.
39. Boutlelis, D. A. (2014). Etude phytochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, antihépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* L (Doctoral dissertation, Université Badji Mokhtar de Annaba, Département de Biologie).
40. BRAUN-BLANQUET, J. (1928). *Pflanzensoziologie. Grundzüge der Vegetationskunde*. Ed. Biologische Studienbücher 7. Berlin, 330 p
41. Brodo, I. M. (1973). Substrate ecology. In *The lichens* (pp. 401-441). Academic Press.

42. Brodo, I. M., Freebury, C., & Alfonso, N. (2013). Notes on the Lichens *Physcia aipolia* and *P. alnophila* in North America. *Evansia*, 30(4), 110-119.
43. Buçukoglu, T. Z., Albayrak, S., Halici, M. G., & Tay, T. (2013). Antimicrobial and Antioxidant Activities of Extracts and Lichen Acids Obtained from Some Umbilicaria Species from Central Anatolia, Turkey. *Journal of food processing and preservation*, 37(6), 1103-1110.
44. Büdel, B., & Scheidegger, C. (2008). Thallus morphology and anatomy. *Lichen biology*, 40-68.
45. Bychek-Gushchina, I. A. (1997). Study of biochemical aspects of lichen symbiosis. I. Lipids and fatty acids in cultured lichen symbionts. *Biochemistry (Moscow)*, 62(5), 490-494.
46. Cai, H., Wang, H. Y. L., Venkatadri, R., Fu, D. X., Forman, M., Bajaj, S. O., ... & Arav-Boger, R. (2014). Digitoxin analogues with improved anticytomegalovirus activity. *ACS medicinal chemistry letters*, 5(4), 395-399.
47. Cansaran, D., Atakol, O., Halici, M. G., & Aksoy, A. (2007). HPLC Analysis of Usnic Acid in Some Ramalina. Species from Anatolia and Investigation of their Antimicrobial Activities. *Pharmaceutical Biology*, 45(1), 77-81.
48. Cardinale, B. J., Srivastava, D. S., Emmett Duffy, J., Wright, J. P., Downing, A. L., Sankaran, M., & Jouseau, C. (2006). Effects of biodiversity on the functioning of trophic groups and ecosystems. *Nature*, 443(7114), 989-992.
49. Carpentier, C., Queiroz, E. F., Marcourt, L., Wolfender, J. L., Azelmat, J., Grenier, D., ... & Voyer, N. (2017). Dibenzofurans and pseudodepsidones from the lichen *Stereocaulon paschale* collected in northern Quebec. *Journal of natural products*, 80(1), 210-214.
50. Castro, O. N., Benites, J., Rodilla, J., Santiago, J. C., Simirgiotis, M., Sepulveda, B., & Areche, C. (2017). Metabolomic analysis of the lichen *Everniopsis trulla* using ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-orbitrap mass spectrometry (UHPLC-Q-OT-MS). *Chromatographia*, 80, 967-973.
51. Chen, J. B., Wang, S. L., & Elix, J. (2005). Parmeliaceae (Ascomycota) lichens in China's mainland III. The genus *Parmotrema*
52. Chester, D. O., Elix, J. A., & Jones, A. J. (1979). Lecideoidin and 3'-Dechlorolecideoidin, New Depsidones from an Australian Lecidea (Lichen). *Australian Journal of Chemistry*, 32(8), 1857-1861.
53. Clauzade, G., & Ozenda, P. (1970). *Les Lichens: Étude biologique et flore illustrée*. Editorial Masson et cie., Paris.
54. Clauzade, G., & Roux, C. (1987). *Likenoj de Okcidenta Eŭropo: Suplemento 2a*.
55. Clauzade, G., Roux, C., Houmeau, J. M., & Roux, C. (1985). *Likenoj de Okcidenta Eŭropo: ilustrita determinlibro*. Société botanique du centre-ouest.

56. Cornejo, A., Salgado, F., Caballero, J., Vargas, R., Simirgiotis, M., & Areche, C. (2016). Secondary metabolites in *Ramalina terebrata* detected by UHPLC/ESI/MS/MS and identification of parietin as tau protein inhibitor. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1303.
57. Culberson, C. F. (1963). The lichen substances of the genus *Evernia*. *Phytochemistry*, 2(4), 335-340.
58. Culberson, C. F. (1969). *Chemical and botanical guide to lichen products*.
59. Culberson, C. F. (1986). Biogenetic relationships of the lichen substances in the framework of systematics. *Bryologist*, 91-98.
60. Culberson, C. F., & Elix, J. A. (1989). *Lichen Substances: Methods in Plant Biochemistry* (PM Dey and JB Harborne, eds.), vol. 1.
61. Culberson, W. L. (1970). Chemosystematics and ecology of lichen-forming fungi. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1(1), 153-170.
62. de Bélair, G., 1990. Structure, fonctionnement et perspectives de gestion de quatre écosystèmes lacustres et marécageux (El Kala, Est-Algérien). Thèse de doctorat, Université Montpellier II (FR): 193 p. + tableaux, graphes et cartes (122 p.).
63. Dembitsky, V. M., Rezanka, T., & Bychek, I. A. (1994). Seasonal variation of lipids and fatty acids from tree-growing lichens of the genus *Physcia*. *Phytochemistry*.
64. Devlin, J. P., Mahandru, M. M., Ollis, W. D., & Smith, C. (1986). Phytochemical examination of the lichen, *Lecanora gangaleoides* Nyl. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1491-1494.
65. Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
66. Dorvault, F. (1955). *La nouvelle officine: répertoire général de pharmacie pratique*. Préf. de René Fabre (Vol. 2). Vigot frères.
67. Duraffourd, C., & Lapraz, J. C. (2002). *Traité de phytothérapie clinique: endobiogénie et médecine*. Elsevier Masson.
68. Durand, J.-H. (1952). *Les sols du bassin versant du lac Tonga*. Publication du S. C. H., 12 p.
69. Elix, J. A. (2014). A catalogue of standardized chromatographic data and biosynthetic relationships for lichen substances. Published by the author, Canberra, 323-327
70. Endo, T., Takahagi, T., Kinoshita, Y., Yamamoto, Y., & Sato, F. (1998). Inhibition of photosystem II of spinach by lichen-derived depsides. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(10), 2023-2027.
71. Farrar, J. F., & Smith, D. C. (1976). Ecological physiology of the lichen *hypogymnia physodes*: III. the importance of the rewetting phase. *New Phytologist*, 77(1), 115-125.

72. Favre-Bonvin, J., Bernillon, J., Salin, N., & Arpin, N. (1987). Biosynthesis of mycosporines: mycosporine glutaminol in *Trichothecium roseum*. *Phytochemistry*, 26(9), 2509-2514.
73. Fehrer, J., Slavíková-Bayerová, Š., & Orange, A. (2008). Large genetic divergence of new, morphologically similar species of sterile lichens from Europe (*Lepraria*, *Stereocaulaceae*, Ascomycota): concordance of DNA sequence data with secondary metabolites. *Cladistics*, 24(4), 443-458.
74. Ferrari, P., Ferrandi, M., Valentini, G., & Bianchi, G. (2006). Rostafuroxin: an ouabain antagonist that corrects renal and vascular Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase alterations in ouabain and adducin-dependent hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(3), 529-535.
75. Festa, C., D'Amore, C., Renga, B., Lauro, G., De Marino, S., D'Auria, M. V., ... & Fiorucci, S. (2013). Oxygenated polyketides from *Plakinastrella mamillaris* as a new chemotype of PXR agonists. *Marine Drugs*, 11(7), 2314-2327.
76. Fukuyama, Y., Shida, N., Kodama, M., Kido, M., Nagasawa, M., & Sugawara, M. (1992). Illicinolides A and B, novel sesquiterpene lactones from the wood of *Illicium tashiroi*. *Tetrahedron*, 48(28), 5847-5854.
77. Garibaldi, A. (1999). Medicinal flora of the Alaska natives. Anchorage: University of Alaska, Alaska Natural Heritage Program.
78. Gasulla, F., Del Campo, E. M., Casano, L. M., & Guéra, A. (2021). Advances in understanding of desiccation tolerance of lichens and lichen-forming algae. *Plants*, 10(4), 807.
79. Gavériaux, J. P. (2009). *Lexique des principaux termes de lichénologie*.
80. Goel, M., Dureja, P., Rani, A., Uniyal, P. L., & Laatsch, H. (2011). Isolation, characterization and antifungal activity of major constituents of the Himalayan lichen *Parmelia reticulata* Tayl. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(6), 2299-2307.
81. González-Tejero, M. R., Martínez-Lirola, M. J., Casares-Porcel, M., & Molero-Mesa, J. (1995). Three lichens used in popular medicine in Eastern Andalusia (Spain). *Economic Botany*, 96-98.
82. Goss, R., & Wilhelm, C. (2009). Lipids in algae, lichens and mosses. Lipids in photosynthesis: essential and regulatory functions, 117-137.
83. Goujon M. (2004). Lichens et biosurveillance de la qualité de l'air. Publication de l'Agence régionale de l'environnement de Haute-Normandie : connaitre pour agir. 4 p.
84. Grube, M., & Blaha, J. (2005). Halotolerance and lichen symbioses. In *Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria, and eukarya* (pp. 471-488). Springer Netherlands.
85. Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lead and copper effects on lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. *Phytochemistry*, 67(16), 1731-1739.

86. Güvenç, A., Akkol, E. K., Süntar, İ., Keleş, H., Yıldız, S., & Çalış, İ. (2012). Biological activities of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf extracts and isolation of the active compounds. *Journal of ethnopharmacology*, 144(3), 726-734.
87. Haghikia, A., Linker, R., & Gold, R. (2014). Fumarsäure in der Therapie der Multiplen Sklerose. *Der Nervenarzt*, 6(85), 720-726.
88. Halama, P., & Van Haluwin, C. (2004). Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl*, 49(1), 95-107.
89. Hale, M. E. (1987). A monograph of the lichen genus *Parmelia Acharius* sensu stricto (Ascomycotina: Parmeliaceae): Smithsonian contributions to botany.
90. Haluwyn, D. V., Asta, J., & Gavériaux, J. P. (2009). Guide des lichens de France.
91. Hamzehzarghani, H., Paranidharan, V., Abu-Nada, Y., Kushalappa, A. C., Mamer, O., & Somers, D. (2008). Metabolic profiling to discriminate wheat near isogenic lines, with quantitative trait loci at chromosome 2DL, varying in resistance to fusarium head blight. *Canadian Journal of Plant Science*, 88(4), 789-797.
92. Haraldsdóttir, S., Guðlaugsdóttir, E., Ingólfssdóttir, K., & Ögmundsdóttir, H. M. (2004). Anti-proliferative effects of lichen-derived lipoxygenase inhibitors on twelve human cancer cell lines of different tissue origin in vitro. *Planta medica*, 70(11), 1098-1100.
93. Harikrishnan, A., Veena, V., Lakshmi, B., Shanmugavalli, R., Theres, S., Prashantha, C. N., ... & Nandi, S. (2021). Atranorin, an antimicrobial metabolite from lichen *Parmotrema rampoddense* exhibited in vitro anti-breast cancer activity through interaction with Akt activity. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(4), 1248-1258.
94. Haugan, R., & Timdal, E. (1994). *Tephromela perlata* and *T. talayana*, with notes on the *T. aglaea*-complex. *Graphis Scripta*, 6(1), 17-26.
95. Hawksworth, D. L. (1976). Lichen chemotaxonomy. In 'Lichenology: progress and problems'. (Eds DH Brown, DL Hawksworth, RH Bailey) pp. 139–184.
96. Hessenkemper, W., Roediger, J., Bartsch, S., Houtsmuller, A. B., van Royen, M. E., Petersen, I., ... & Baniahmad, A. (2014). A natural androgen receptor antagonist induces cellular senescence in prostate cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 28(11), 1831-1840.
97. Hickey, B. J., Lumsden, A. J., Cole, A. L. J., & Walker, J. R. L. (1990). Antibiotic compounds from New Zealand plants: methyl haematommate, an anti-fungal agent from *Stereocaulon ramulosum*.
98. Hoffmann, H. R., Matusch, R., & Baniahmad, A. (2013). U.S. Patent No. 8,481,519. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

99. Honda, N. K., Pavan, F. R., Coelho, R. G., de Andrade Leite, S. R., Micheletti, A. C., Lopes, T. I. B., ... & Leite, C. Q. F. (2010). Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine*, 17(5), 328-332.
100. Honegger, R. (2012). Differential gene expression within the cyanobacterial cell population of a lichen thallus. *New Phytologist*, 196(3), 657-660.
101. Hongyan, L. (2016). Esculetin attenuates Th2 and Th17 responses in an ovalbumin-induced asthmatic mouse model. *Inflammation*, 39, 735-743.
102. Huneck, S., & Santesson, J. (1969). 64. Mitteilung über Flechteninhaltsstoffe. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 24(6), 750-756.
103. Huneck, S., Feige, G. B., & Schmidt, J. (2004). Chemie von *Cladonia furcata* und *Cladonia rangiformis*. *Herzogia*, 17, 51-58.
104. Huneck, S., Yoshimura, I., Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996). Identification of lichen substances (pp. 11-123). Springer Berlin Heidelberg.
105. Huynh, B. L. C., Duong, T. H., Do, T. M. L., Pinnock, T. G., Pratt, L. M., Yamamoto, S., ... & Nguyen, K. P. P. (2016). New [gamma]-Lactone Carboxylic Acids from the Lichen *Parmotrema praesorediosum* (Nyl.) Hale, Parmeliaceae. *Records of Natural Products*, 10(3), 332.
106. Ilica, R. A., Kloetzer, L., Galaction, A. I., & Cașcaval, D. (2019). Fumaric acid: production and separation. *Biotechnology letters*, 41, 47-57.
107. Ismed, F. (2012). Phytochimie de lichens du genre *Stereocaulon*: étude particulière de *S. Halei* Lamb et *S. montagneanum* Lamb, deux lichens recoltés en Indonésie (These de doctorat, Université Rennes 1).
108. Ivanova, V., Bačkor, M., Dahse, H. M., & Graefe, U. (2010). Molecular structural studies of lichen substances with antimicrobial, antiproliferative, and cytotoxic effects from *Parmelia subrudecta*. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 40(4), 377-388.
109. Jabłońska-Trypuć, A., Krętowski, R., Wołejko, E., Wydro, U., & Butarewicz, A. (2019). Traumatic acid toxicity mechanisms in human breast cancer MCF-7 cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 106, 137-146.
110. Jabłońska-Trypuć, A., Pankiewicz, W., & Czerpak, R. (2016). Traumatic acid reduces oxidative stress and enhances collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. *Lipids*, 51, 1021-1035.
111. Jacob, P. L., Leite, J. A., Alves, A. K. A., Rodrigues, Y. K. S., Amorim, F. M., Nérís, P. L. N., ... & Rodrigues-Mascarenhas, S. (2013). Immunomodulatory activity of ouabain in *Leishmania leishmania* amazonensis-infected Swiss mice. *Parasitology Research*, 112, 1313-1321.
112. Jayalal, U., Divakar, P. K., Joshi, S., Oh, S. O., Koh, Y. J., & Hur, J. S. (2013). The Lichen Genus *Parmotrema* in South Korea. *Mycobiology*, 41(1), 25-36.

113. Jayaprakasha, G. K., & Rao, L. J. (2000). Phenolic constituents from the lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(11-12), 1018-1022.
114. Joleaud, L. (1936). *Étude géologique de la région de Bône et de Lacalle...* Imp. La Typo-litho & J. Carbonel.
115. Karunaratne, V., Bombuwela, K., Kathirgamanathar, S., & Thadhani, V. M. (2005). Lichens: a chemically important biota. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 33(3).
116. Kaushik, A., & Kumaran, M. S. (2020). Platelet-rich plasma: the journey so far. *Indian Dermatology Online Journal*, 11(5), 685.
117. Kekuda, T. P., Vinayaka, K. S., Kumar, S. P., & Sudharshan, S. J. (2009). Antioxidant and antibacterial activity of lichen extracts, honey and their combination. *J Pharm Res*, 2(12), 1875-1879.
118. Kerboua, M., Ahmed, M. A., Samba, N., Aitfella-Lahlou, R., Silva, L., Boyero, J. F., ... & Lopez Rodilla, J. M. (2021). Phytochemical Investigation of New Algerian Lichen Species: *Physcia Mediterranea* Nimis. *Molecules*, 26(4), 1121.
119. Kerboua, M., Monia, A. A., Samba, N., Silva, L., Raposo, C., Díez, D., & Rodilla, J. M. (2022). Phytochemical Composition of Lichen *Parmotrema hypoleucinum* (J. Steiner) Hale from Algeria. *Molecules*, 27(16), 5229.
120. Khatri, H. R., Bhattarai, B., Kaplan, W., Li, Z., Curtis Long, M. J., Aye, Y., & Nagorny, P. (2019). Modular total synthesis and cell-based anticancer activity evaluation of ouabagenin and other cardiotonic steroids with varying degrees of oxygenation. *Journal of the American Chemical Society*, 141(12), 4849-4860.
121. Kiringe, J. W. (2006). A survey of traditional health remedies used by the Maasai of Southern Kaijiado District, Kenya.
122. Kobata, K., Sutoh, K., Todo, T., Yazawa, S., Iwai, K., & Watanabe, T. (1999). Nordihydrocapsiate, a new capsinoid from the fruits of a nonpungent pepper, *Capsicum annum*. *Journal of natural products*, 62(2), 335-336.
123. Kolattukudy, P. E., Kronman, K., & Poulouse, A. J. (1975). Determination of structure and composition of suberin from the roots of carrot, parsnip, rutabaga, turnip, red beet, and sweet potato by combined gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *Plant Physiology*, 55(3), 567-573.
124. Kolattukudy, P.E. (2005). Cutin from Plants. In: *Biopolymers Online*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
125. Komaty, A., & Boudraa, A. O. (2015). Sur l'aspect banc de filtres de l'EMD multivariée. In *Colloque GRETSI* (pp. 1-4).
126. Kosanić, M. M., Ranković, B. R., & Stanojković, T. P. (2012). Antioxidant, antimicrobial and anticancer activities of three *Parmelia* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(9), 1909-1916.

127. Kosanić, M., Manojlović, N., Janković, S., Stanojković, T., & Ranković, B. (2013). *Evernia prunastri* and *Pseudoevernia furfuraceae* lichens and their major metabolites as antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food and chemical toxicology*, 53, 112-118.
128. Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T., Rančić, A., & Manojlović, N. (2014). *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 518-525.
129. Koyama, M., Takahashi, K., Chou, T. C., Darzynkiewicz, Z., Kapuscinski, J., Kelly, T. R., & Watanabe, K. A. (1989). Intercalating agents with covalent bond forming capability. A novel type of potential anticancer agents. 2. Derivatives of chrysophanol and emodin. *Journal of medicinal chemistry*, 32(7), 1594-1599.
130. Kumar KC, S., & Müller, K. (1999). Lichen metabolites. 2. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth. *Journal of natural products*, 62(6), 821-823.
131. Kumar, A., Yogendra, K. N., Karre, S., Kushalappa, A. C., Dion, Y., & Choo, T. M. (2016). WAX INDUCER1 (HvWIN1) transcription factor regulates free fatty acid biosynthetic genes to reinforce cuticle to resist *Fusarium* head blight in barley spikelets. *Journal of Experimental Botany*, 67(14), 4127-4139.
132. Kumar, S.K.C., & Müller, K. (1999). Depsides as non-redox inhibitors of leukotriene B4 biosynthesis and HaCaT cell growth. 1. Novel analogues of barbatic and diffractaic acid. *European journal of medicinal chemistry*, 34(12), 1035-1042.
133. Kurokawa, S., & Lai, M. J. (2001). Parmelioid lichen genera and species in Taiwan. *Mycotaxon*, 77, 225-284.
134. Larsen, R. S., Bell, J. N. B., James, P. W., Chimonides, P. J., Rumsey, F. J., Tremper, A., & Purvis, O. W. (2007). Lichen and bryophyte distribution on oak in London in relation to air pollution and bark acidity. *Environmental pollution*, 146(2), 332-340.
135. Lauterwein, M., Oethinger, M., Belsner, K., Peters, T., & Marre, R. (1995). In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(11), 2541-2543.
136. Le gac E., Miralles B.M., Brosseau L. & De champeaux E, (2006). Les lichens : Structure, écologie et intérêt, Mem. lic. Univ de Rennes 1 UFR SVE, 135p.
137. Le Pogam, P., & Boustie, J. (2016). Xanthones of lichen source: A 2016 update. *Molecules*, 21(3), 294.
138. Le Pogam, P., Schinkovitz, A., Legouin, B., Le Lamer, A. C., Boustie, J., & Richomme, P. (2015). Matrix-free UV-laser desorption ionization mass spectrometry as a versatile approach for accelerating dereplication studies on lichens. *Analytical chemistry*, 87(20), 10421-10428.

- 139.Lendemer, J. C., Allen, J. L., & Noell, N. (2015). The Parmotrema acid test: a look at species delineation in the *P. perforatum* group 40 y later. *Mycologia*, 107(6), 1120-1129.
- 140.Longton, R. E. (1988). *Biology of polar bryophytes and lichens*. CUP Archive.
- 141.Loppi, S., Frati, L., Paoli, L., Bigagli, V., Rossetti, C., Bruscoli, C., & Corsini, A. (2004). Biodiversity of epiphytic lichens and heavy metal contents of *Flavoparmelia caperata* thalli as indicators of temporal variations of air pollution in the town of Montecatini Terme (central Italy). *Science of the total environment*, 326(1-3), 113-122.
- 142.Lucas, M. F. M. (2017). *Caraterização fitoquímica e determinação da atividade biológica de extratos de cascas de Salix salviifolia* (These de doctorat).
- 143.Lucas, M. F., Monza, E., Jørgensen, L. J., Ernst, H. A., Piontek, K., Bjerrum, M. J., ... & Guallar, V. (2017). Simulating substrate recognition and oxidation in laccases: from description to design. *Journal of chemical theory and computation*, 13(3), 1462-1467.
- 144.Lumbsch, H. T. (1998). The use of metabolic data in lichenology at the species and subspecific levels. *The Lichenologist*, 30(4-5), 357-367.
- 145.Maass, W. S. G., Towers, G. H. N., & Neish, A. C. (1964). Flechtenstoffe: I. Untersuchungen zur Biogenese des Pulvinsaureanhydrids. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 77, 157-161.
- 146.Maizi, N., Kadri, N., & Serradj, M. (2017). Absorption capacity of lead by different lichenic species. *Int. J. Biosci*, 10(2), 61-71.
- 147.Mallavadhani, U. V., Tirupathamma, R. S., Sagarika, G., & Ramakrishna, S. (2019). Isolation, chemical modification, and anticancer activity of major metabolites of the lichen *Parmotrema mesotropum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 55, 825-831.
- 148.Manojlovic, N. T., Vasiljevic, P. J., Gritsanapan, W., Supabphol, R., & Manojlovic, I. (2010). Phytochemical and antioxidant studies of *Laurera benguelensis* growing in Thailand. *Biological Research*, 43(2), 169-176.
- 149.Marante, F. T., Castellano, A. G., Rosas, F. E., Aguiar, J. Q., & Barrera, J. B. (2003). Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis*: phytotoxicity and antioxidative activity. *Journal of chemical ecology*, 29, 2049-2071.
- 150.Marles, R. J., Clavelle, C., Monteleone, L., Tays, N., & Burns, D. (2000). *Aboriginal plant use in Canada's northwest boreal forest*. UBC Press (University of British Columbia).
- 151.Marques, J. M. M. (2013). *A framework for assessing the vulnerability of schist surfaces to lichen-induced weathering in the Upper Douro region (NE Portugal)* (These de doctorat, Universidade do Porto (Portugal)).
- 152.Marre, A. (1987). *Etude géomorphologique du tell oriental Algérien de Collo à la frontière Tunisienne* (These de doctorat, Aix-Marseille 2).

153. Martins, M. C. B., Lima, M. J. G. D., Silva, F. P., Azevedo-Ximenes, E., Silva, N. H. D., & Pereira, E. C. (2010). *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. *Brazilian archives of biology and technology*, 53, 115-122.
154. Melo, M. G. D. D., Araújo, A. A. D. S., Serafini, M. R., Carvalho, L. F., Bezerra, M. S., Ramos, C. S., ... & Quintans-Júnior, L. J. (2011). Anti-inflammatory and toxicity studies of atranorin extracted from *Cladonia kalbii* Ahti in rodents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47, 861-872.
155. Melo, M. G. D., Araújo, A. A. S., Rocha, C. P. L., Almeida, E. M. S. A., de Souza Siqueira, R., Bonjardim, L. R., & Quintans-Júnior, L. J. (2008). Purification, physicochemical properties,
156. Melo, M. G. D., dos Santos, J. P. A., Serafini, M. R., Caregnato, F. F., de Bittencourt Pasquali, M. A., Rabelo, T. K., ... & Gelain, D. P. (2011). Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicology in vitro*, 25(2), 462-468.
157. Middleton, E., Kandaswami, C., & Harborne, J. (1993). *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall/CRC, New York
158. Millot, M., Dieu, A., & Tomasi, S. (2016). Dibenzofurans and derivatives from lichens and ascomycetes. *Natural product reports*, 33(6), 801-811.
159. Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., ... & Marković, S. (2011). Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International journal of molecular sciences*, 12(8), 5428-5448.
160. Mitrović, T., Stamenković, S., Cvetković, V., Tošić, S., Stanković, M., Radojević, I., ... & Marković, S. (2011). Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International journal of molecular sciences*, 12(8), 5428-5448.
161. Mjallal, I., Feghali, E., Hammoud, M., Habchi, C., & Lemenand, T. (2021). Exploring the colligative properties of Arachidic acid for potential use as PCM. *Solar Energy*, 214, 19-25.
162. Molina, M. C., Crespo, A., Vicente, C., & Elix, J. A. (2003). Differences in the composition of phenolics and fatty acids of cultured mycobiont and thallus of *Physconia distorta*. *Plant physiology and biochemistry*, 41(2), 175-180.
163. Molnár, K., & Farkas, E. (2010). Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(3-4), 157-173.
164. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, 26(2), 211-219.
165. Monia, A. A., Rafika, B., & Tarek, H. (2018). Lichen diversity in the edough peninsula, North East of Algeria. *Bot. complut*, 42, 9-18.

- 166.Montaño, A. M., Menesses, R., Bravo, J. A., & Vila, J. L. (2016). Presence of atranorin in *Physcia solediosa*. *Rev. Boliv. Quím.*, 33, 175-178.
- 167.Morimura, K. I., Gatayama, A., Tsukimata, R., Matsunami, K., Otsuka, H., Hirata, E., ... & Takeda, Y. (2006). 5-O-glucosyldihydroflavones from the leaves of *Helicia cochinchinensis*. *Phytochemistry*, 67(24), 2681-2685.
- 168.Mosbach, K. (1964). On the biosynthesis of lichen substances Part 2. The pulvic acid derivative vulpinic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 17(4), 363-367.
- 169.Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., ... & Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food chemistry*, 72(2), 145-171.
- 170.Musa, M. A., Badisa, V. L., Latinwo, L. M., Cooperwood, J., Sinclair, A., & Abdullah, A. (2008). Cytotoxic activity of new acetoxycoumarin derivatives in cancer cell lines. *Anticancer research*, 31(6), 2017-2022.
- 171.Musharraf, S. G., Kanwal, N., Thadhani, V. M., & Choudhary, M. I. (2015). Rapid identification of lichen compounds based on the structure–fragmentation relationship using ESI-MS/MS analysis. *Analytical Methods*, 7(15), 6066-6076.
- 172.Nakashima, K. I., Tanabe, H., Fujii-Kuriyama, Y., Hayashi, H., & Inoue, M. (2016). Atranorin and lecanoric acid antagonize TCDD-induced xenobiotic response element-driven activity, but not xenobiotic response element-independent activity. *Journal of natural medicines*, 70, 476-482.
- 173.Nash, T. H. (2008). *Lichen Biology* ; Cambridge, Royaume-uni, p. 498.
- 174.NASH, T. H., & GRIES, C. (2002). Lichens as bioindicators of sulfur dioxide. *Symbiosis*.
- 175.Nazzaro-Porro, M., & Passi, S. (1979). Identification of tyrosinase inhibitors in cultures of *Pityrosporum*. *Journal of Investigative Dermatology*, 71(3), 205-208.
- 176.Nielsen, K. F., Månsson, M., Rank, C., Frisvad, J. C., & Larsen, T. O. (2011). Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *Journal of natural products*, 74(11), 2338-2348.
- 177.Nishiyama, Y., Noda, Y., Nakatani, N., Shitan, N., Sudo, T., Kato, A., & Chalo Mutiso, P. B. (2019). Structure of constituents isolated from the bark of *Cassipourea malosana* and their cytotoxicity against a human ovarian cell line. *Journal of natural medicines*, 73, 289-296.
- 178.Nybakken, L., Helmersen, A. M., Gauslaa, Y., & Selås, V. (2010). Lichen compounds restrain lichen feeding by bank voles (*Myodes glareolus*). *Journal of chemical ecology*, 36, 298-304.
- 179.Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Halici, M., & Bayir, Y. (2004). Comparison of antioxidant activity and phenolic content of three lichen

- species. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 18(11), 938-941.
180. Odabasoglu, F., Cakir, A., Suleyman, H., Aslan, A., Bayir, Y., Halici, M., & Kazaz, C. (2006). Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 103(1), 59-65.
181. Ögmundsdóttir, H. M., Zoëga, G. M., Gissurarson, S. R., & Ingólfssdóttir, K. (1998). Natural Products: Anti-proliferative Effects of Lichen-derived Inhibitors of 5-Lipoxygenase on Malignant Cell-lines and Mitogen-stimulated Lymphocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50(1), 107-115.
182. Orellana, A. M., Kinoshita, P. F., Leite, J. A., Kawamoto, E. M., & Scavone, C. (2016). Cardiogenic steroids as modulators of neuroinflammation. *Frontiers in endocrinology*, 7, 10.
183. Oswalt, W. H. (1957). A western Eskimo ethnobotany. *Anthropological papers of the University of Alaska*, 6(1), 16-36.
184. Ozenda P. 2000. Les végétaux. Organisation et diversité biologique. Éd. Dunod, Paris. 512 p
185. Papadaki, A., Papapostolou, H., Alexandri, M., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., de Castro, A. M., ... & Koutinas, A. A. (2018). Fumaric acid production using renewable resources from biodiesel and cane sugar production processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 35960-35970.
186. Papadopoulou, P., Tzakou, O., Vagias, C., Kefalas, P., & Roussis, V. (2007).  $\beta$ -Orcinol Metabolites from the Lichen *Hypotrachyna revoluta*. *Molecules*, 12(5), 997-1005.
187. Paris, R., & Moyse, H. (1976). *Précis de matière médicale*. Paris : Masson
188. Paris, R.R. & Moyse, H. (1976-1981) .*Matière médicale*, 3 tomes, Masson, 420, 509-518.
189. Parrot, D. (2014). Etude de quatre lichens marins, maritime ou terrestre et des bactéries associées: Evaluation de la diversité bactérienne et recherche de métabolites d'intérêt (These de doctorat, Univ de Rennes, INSA).
190. Paudel, B., Bhattarai, H. D., Lee, H. K., Oh, H., Shin, H. W., & Yim, J. H. (2010). Antibacterial activities of Ramalin, usnic acid and its three derivatives isolated from the Antarctic lichen *Ramalina terebrata*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(1-2), 34-38.
191. Paz-Bermúdez, G., & de Silanes, M. L. (1998). *Bactrospora carneopallida*, new to Europe. *The Lichenologist*, 30(3), 291-292.
192. Perry, N. B., Benn, M. H., Brennan, N. J., Burgess, E. J., Ellis, G., Galloway, D. J., ... & Tangney, R. S. (1999). Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of New Zealand lichens. *The Lichenologist*, 31(6), 627-636.

193. Pfau, A. S. (1928). Zur Kenntnis der Flechtenbestandteile II. Die Konstitution der Barbatinsäure. *Helvetica Chimica Acta*, 11(1), 864-876.
194. Piovano, M., Guzmán, G., Garbarino, J. A., & Chamy, M. C. (1997). *Rhizoplaca melanophthalma* a new chemical race. *Biochemical systematics and ecology*, 4(25), 359-360.
195. Podterob, A. P. (2008). Chemical composition of lichens and their medical applications. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(10), 582-588.
196. Poelt, J., & Vězda, A. (1977). Bestimmungsschlüssel europäischer Flechten.
197. Pompilio, A., Pomponio, S., Di Vincenzo, V., Crocetta, V., Nicoletti, M., Piovano, M., ... & Di Bonaventura, G. (2013). Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. *Future microbiology*, 8(2), 281-292.
198. Purvis, O. W. (2014). Adaptation and interaction of saxicolous crustose lichens with metals. *Botanical Studies*, 55(1), 1-14.
199. Purvis, W. (2000). *Lichens*. natural history museum.
200. Putra, P. P., Abdullah, S. S., Rahmatunisa, R., Junaidin, J., & Ismed, F. (2020). Structure, activity, and drug-likeness of pure compounds of Sumatran lichen (*Stereocaulon halei*) for the targeted ACE2 protein in COVID-19 disease. *Pharmaciana*, 10(1), 135.
201. Rabelo, T. K., Zeidán-Chuliá, F., Vasques, L. M., dos Santos, J. P. A., da Rocha, R. F., de Bittencourt Pasquali, M. A., ... & Gelain, D. P. (2012). Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). *Toxicology in Vitro*, 26(2), 304-314.
202. Ranković, B., & Kosanić, M. (2019). Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. *Lichen secondary metabolites: bioactive properties and pharmaceutical potential*, 1-29.
203. Ranković, B., Mišić, M., & Sukdolak, S. (2008). The antimicrobial activity of substances derived from the lichens *Physcia aipolia*, *Umbilicaria polyphylla*, *Parmelia caperata* and *Hypogymnia physodes*. *World journal of microbiology and biotechnology*, 24, 1239-1242.
204. Ranković, B., Ranković, D., Kosanić, M., & Marić, D. (2010). Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Anaptychya ciliaris*, *Nephroma parile*, *Ochrolechia tartarea* and *Parmelia centrifuga*. *Central European Journal of Biology*, 5, 649-655.
205. Reis, R. A., Iacomini, M., Gorin, P. A. J., de Souza, L. M., Grube, M., Cortes Cordeiro, L. M., & Sasaki, G. L. (2005). Fatty acid composition of the tropical lichen *Teloschistes flavicans* and its cultivated symbionts. *FEMS microbiology letters*, 247(1), 1-6.

- 206.Řezanka, T., & Dembitsky, V. M. (1999). Fatty acids of lichen species from Tian Shan Mountains. *Folia microbiologica*, 44, 643-646.
- 207.Rouag, R., & Benyacoub, S. (2006). Inventaire et écologie des reptiles du Parc national d'El Kala (Algérie). *Bull. Soc. Herp. Fr*, 117, 25-40.
- Braun-Blanquet, J. (2013). *Pflanzensoziologie: grundzüge der vegetationskunde*. Springer-Verlag.
- 208.Rouessac, F., & Rouessac, A. (2000). « Analyse Chimique : Méthodes et Techniques Instrumentales modernes », 5<sup>e</sup> éd., Dunod, Paris.
- 209.Rousteau, A. (2006). La végétation lichénique de la réserve naturelle de Camargue. *Bulletin de l'Association française de lichénologie*, vol 30-1 : pp.10-26
- 210.-Roux, C. (2017). & coll., (2018). Liste des lichens et champignons lichénicoles de France métropolitaine (mise à jour 2018/02/13).
- 211.Roux, C., Coste, C., Bricaud, O., & Masson, D. (2006). Catalogue des lichens et des champignons lichénicoles de la région Languedoc-Roussillon (France méridionale). *Bulletin de la Société Linnéenne de Provence*, 57, 85-200.
- 212.Saadane, F. Z., Boublata, N. E. I., Habbachi, S., Bouzar, A., Habbachi, W., Slimani, A., & Tahraoui, A. (2021). Evaluation of ramalina farinacea (ramalinaceae) insecticide effects: impact on the lethality, sexual behaviour and reproduction of drosophila melanogaster (diptera: drosophilidae). *Studia Universitatis" Vasile Goldis" Arad. Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)*, 31(3), 113-121.
- 213.Saklani, A., & Upreti, D. K. (1992). Folk uses of some lichens in Sikkim. *Journal of ethnopharmacology*, 37(3), 229-233.
- 214.Salgado, F., Albornoz, L., Cortéz, C., Stashenko, E., Urrea-Vallejo, K., Nagles, E., ... & Areche, C. (2017). Secondary metabolite profiling of species of the genus *Usnea* by UHPLC-ESI-OT-MS-MS. *Molecules*, 23(1), 54.
- 215.Samraoui, B., & De Belair, G. (1997). The Guerbes-Senhadja wetlands (NE Algeria). Part I: an overview. *Ecologie*, 28(3), 233-250.
- 216.Sato, M., Katsube, Y., Katai, M., Katakawa, J. I., & Tetsumi, T. (1994). Crystal and molecular structure of asebotoxin IV. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 67(3), 866-868.
- 217.Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3), 654-658.
- 218.Seaward, M. R. (2008). Environmental role of lichens. *Lichen biology*, 274-298.
- 219.Sebastian, J., Hegde, K., Kumar, P., Rouissi, T., & Brar, S. K. (2019). Bioproduction of fumaric acid: An insight into microbial strain improvement strategies. *Critical reviews in biotechnology*, 39(6), 817-834.
- 220.Semadi, A. (1989). Effets de la pollution atmosphérique (pollution globale, fluorée et plombique) sur la végétation dans la région de Annaba (Algérie) (Doctoral dissertation, Paris 6).

- 221.Senese, G., & Critelli, P. (2000). Biomonitoraggio della Qualità dell'Aria dell'Isola d'Elba (LI) tramite licheni epifiti. *Not. Soc. Lich. Ital*, 13, 83-86.
- 222.Sen-Salerno, M. & Blakeway, J., 1987. La mousse de chêne, une base de la parfumerie. *Revue pour la Science*, N° 115, pp: 82-92 in *Bull. Ass. fr. Lichénologie*, Paris, 12 (1): 12-14.
- 223.Serradj, A. A. M., El Oualidi, J., Slimani, A., & Boumedris, Z. (2013). Contribution to the lichens inventory from the Oubeira lake (NE Algeria). *Bull. Inst. Sci. Rabat Sect. Sci. Vie*, 35, 15-17.
- 224.Sérusiaux, E., Diederich, P., & Lambinon, J. (2004). Les macrolichens de Belgique, du Luxembourg et du nord de la France. Clés de détermination.
- 225.Shukla, V., Joshi, G. P., & Rawat, M. S. M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry reviews*, 9, 303-314.
- 226.Sieber, M. A., & Hegel, J. K. E. (2014). Azelaic acid: properties and mode of action. *Skin pharmacology and physiology*, 27(Suppl. 1), 9-17.
- 227.Singh, D. K., Gulati, K., & Ray, A. (2016). Effects of chelidonic acid, a secondary plant metabolite, on mast cell degranulation and adaptive immunity in rats. *International Immunopharmacology*, 40, 229-234.
- 228.Singh, H., Husain, T., Agnihotri, P., Pande, P. C., & Iqbal, M. (2012). Biodiversity conservation through traditional beliefs system: a case study from kumaon himalayas, india. *International Journal of Conservation Science*, 3(1).
- 229.Sipman, H. J. M. (2006). Diversity and biogeography of lichens in neotropical montane oak forests. *Ecology and Conservation of Neotropical montane oak forests*, 69-81.
- 230.Sisodia, R., Verma, S., Rani, A., & Dureja, P. (2013). Antibacterial and antioxidant activity of lichen species *Ramalina roesleri*. *Natural product research*, 27(23), 2235-2239.
- 231.Slimani, A., Serradj, A. A. M., Hamel, T., & Coste, C. (2013). Contribution a l'etude de la flore lichénique dans la zéenaie de Bougous (foret de Ramel Tonal) au niveau du Parc National d'El Kala Nord Est Algerien. *Synthèse: revue des sciences et de la technologie*, 27, 22-29.
- 232.Solárová, Z., Liskova, A., Samec, M., Kubatka, P., Büsselberg, D., & Solár, P. (2020). Anticancer potential of lichens' secondary metabolites. *Biomolecules*, 10(1), 87.
- 233.Solberg, Y. (1986). Chemical constituents of the lichen species *Cetraria islandica*. *The Journal of the Hattori Botanical Laboratory*, 60, 391-406.
- 234.Solhaug, K. A., Larsson, P., & Gauslaa, Y. (2010). Light screening in lichen cortices can be quantified by chlorophyll fluorescence techniques for both reflecting and absorbing pigments. *Planta*, 231, 1003-1011.

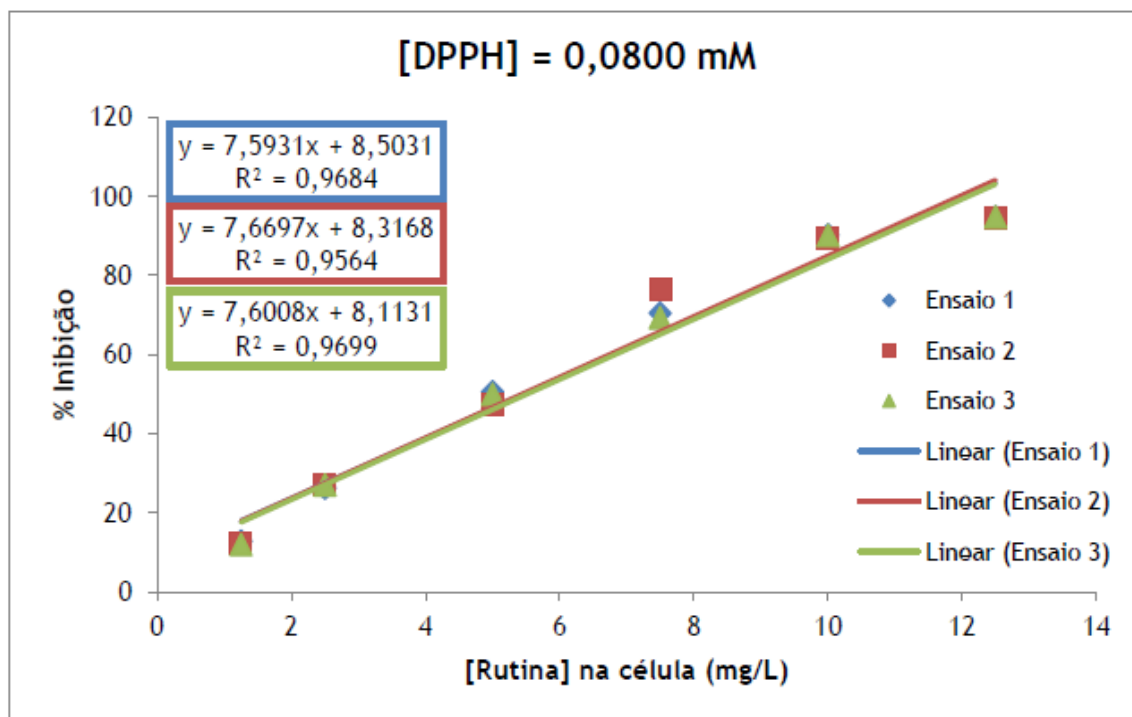
235. Sonesson, M., Grimberg, Å., Sveinbjörnsson, B., & Carlsson, B. Å. (2011). Seasonal variation in concentrations of carbohydrates and lipids in two epiphytic lichens with contrasting, snow-depth related distribution on subarctic birch trees. *The Bryologist*, 114(3), 443-452.
236. Song, K., Sivanesan, I., Ak, G., Zengin, G., Cziáky, Z., Jekő, J., ... & Kim, D. H. (2020). Screening of bioactive metabolites and biological activities of calli, shoots, and seedlings of *Mertensia maritima* (L.) Gray. *Plants*, 9(11), 1551.
237. Spribille, T., Klug, B., & Mayrhofer, H. (2011). A phylogenetic analysis of the boreal lichen *Mycoblastus sanguinarius* (Mycoblastaceae, lichenized Ascomycota) reveals cryptic clades correlated with fatty acid profiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59(3), 603-614.
238. Srikrishna, D., Godugu, C., & Dubey, P. K. (2016). A review on pharmacological properties of coumarins. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(2), 113-141.
239. Stead, C. K. (1998). *The new poetic: Yeats to Eliot*. A&C Black.
240. Stefanachi, A., Leonetti, F., Pisani, L., Catto, M., & Carotti, A. (2018). Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds. *Molecules*, 23(2), 250.
241. Stocker-Wörgötter, E. (2008). Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural product reports*, 25(1), 188-200.
242. Stocker-Wörgötter, E., Cordeiro, L. M. C., & Iacomini, M. (2013). Accumulation of potential pharmaceutically relevant lichen metabolites in lichens and cultured lichen symbionts. *Studies in natural products chemistry*, 39, 337-380.
243. Stojanović, I. Ž., Radulović, N. S., Mitrović, T. L., Stamenković, S. M., & Stojanović, G. S. (2011). Volatile constituents of selected Parmeliaceae lichens. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(7), 987-994.
244. Studzinska-Sroka, E., Galanty, A., & Bylka, W. (2017). Atranorin-an interesting lichen secondary metabolite. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 17(17), 1633-1645.
245. Sumida, C., Graber, R., & Nunez, E. (1993). Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 48(1), 117-122.
246. Svoboda, D., Bouda, F., Malíček, J., & Hafellner, J. (2010). A contribution to the knowledge of lichenized and lichenicolous fungi in Albania. *Herzogia*, 25(2), 146-165.
247. Szadkowska, D., Zawadzki, J., Kozakiewicz, P., & Radomski, A. (2021). Identification of extractives from various poplar species. *Forests*, 12(5), 647.
248. Tanaka J. (1976). *Cyclopedia of edible plants of the world*. Keigaku Publ. Co., Tokyo, 924p.

249. Tasende, M. G. (2000). Fatty acid and sterol composition of gametophytes and sporophytes of *Chondrus crispus* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Scientia Marina*, 64(4), 421-426.
250. Tay, T., Türk, A. Ö., Yılmaz, M., Türk, H., & Kıvanç, M. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid, and protocetraric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(5-6), 384-388.
251. Temina, M., Levitsky, D. O., & Dembitsky, V. M. (2010). Chemical constituents of the epiphytic and lithophilic lichens of the genus *Collema*. *Records of Natural Products*, 4(1), 79.
252. Thadhani, V. M., Choudhary, M. I., Ali, S., Omar, I., Siddique, H., & Karunaratne, V. (2011). Antioxidant activity of some lichen metabolites. *Natural product research*, 25(19), 1827-1837.
253. Thi Huyen Vu. (2014). Etude des acides gras du genre *Stereocaulon* et étude phytochimique du lichen *S. evolutum* Graewe, Ph.D. Dissertation, Université de Rennes, France, Rennes.
254. Thuy, T. T., Tam, N. T., Anh, N. T. H., Hau, D. V., Phong, D. T., Adorisio, S., ... & Delfino, D. V. (2017). 20-Hydroxyecdysone from *Dacrycarpus imbricatus* bark inhibits the proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(2), 157-159.
255. Torres, A., Dor, I., Rotem, J., Srebnik, M., & Dembitsky, V. M. (2003). Characterization of surface n-alkanes and fatty acids of the epiphytic lichen *Xanthoria parietina*, its photobiont a green alga *Trebouxia* sp., and its mycobiont, from the Jerusalem hills. *European journal of biochemistry*, 270(10), 2120-2125.
256. Torres-Benítez, A., Rivera-Montalvo, M., Sepúlveda, B., Castro, O. N., Nagles, E., Simirgiotis, M. J., ... & Areche, C. (2017). Metabolomic analysis of two *Parmotrema* lichens: *P. robustum* (Degel.) Hale and *P. andinum* (Mull. Arg.) Hale using UHPLC-ESI-OT-MS-MS. *Molecules*, 22(11), 1861.
257. Türk, H., Yılmaz, M., Tay, T., Türk, A. Ö., & Kıvanç, M. (2006). Antimicrobial activity of extracts of chemical races of the lichen *Pseudevernia furfuracea* and their physodic acid, chloroatranorin, atranorin, and olivetoric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(7-8), 499-507.
258. Upreti, D. K., Bajpai, R., & Nayaka, S. (2015). Lichenology: current research in India. *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement*, 263-280
259. Van haluwyn, C. (1999). Les lichens: des organismes symbiotiques originaux. In *Annales pharmaceutiques françaises* (Vol. 57, No. 6, pp. 448-454).

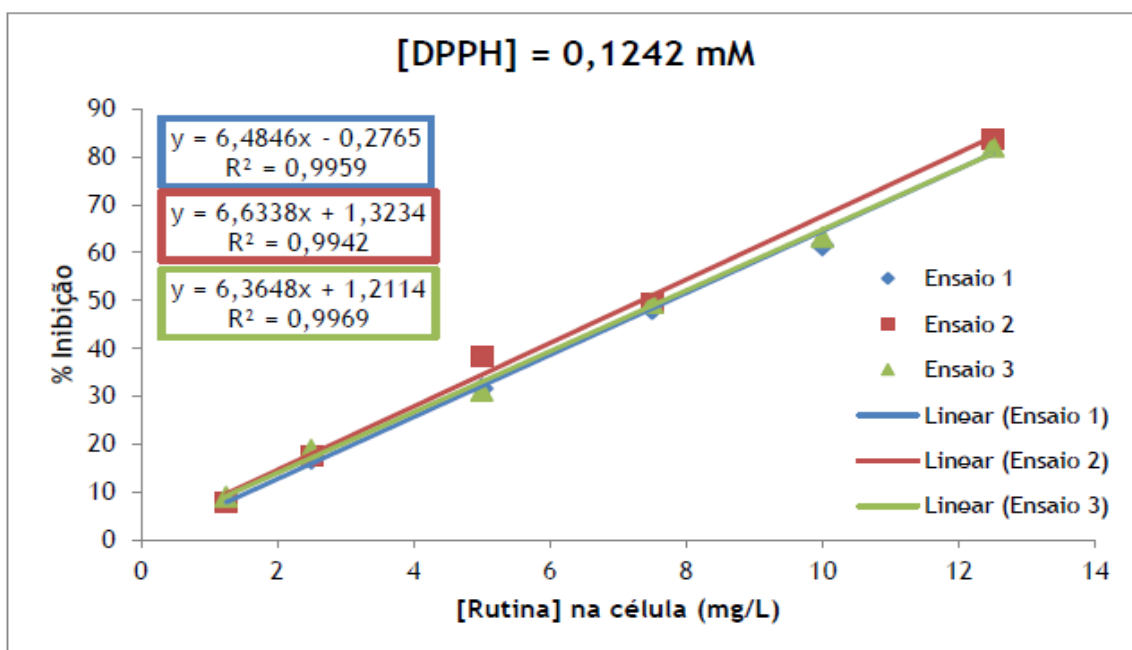
260. Verma, N., Behera, B. C., & Makhija, U. (2008). Antioxidant and hepatoprotective activity of a lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 167-181.
261. Verma, N., Behera, B. C., Parizadeh, H., & Sharma, B. O. (2011). Bactericidal activity of some lichen secondary compounds of *Cladonia ochrochlora*, *Parmotrema nilgherrensis* and *Parmotrema sancti-angelii*. *Int J Drug Dev Res*, 3, 222-232.
262. Vesty, E. F., Whitbread, A. L., Needs, S., Tanko, W., Jones, K., Halliday, N., ... & Coates, J. C. (2020). Cross-kingdom signalling regulates spore germination in the moss *Physcomitrella patens*. *Scientific reports*, 10(1), 2614.
263. Vladimirova, I. N., & Georgiyants, V. A. (2013). Extracted compounds from *Cetraria islandica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49, 347-348.
264. Vu, T. H., Catheline, D., Delmail, D., Boustie, J., Legrand, P., & Lohezic-Le Devehat, F. (2016). Gas chromatographic analysis to compare the fatty acid composition of fifteen lichen species, with a focus on *Stereocaulon*. *The Lichenologist*, 48(4), 323-337.
265. Walters, D., Raynor, L., Mitchell, A., Walker, R., & Walker, K. (2004). Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. *Mycopathologia*, 157, 87-90.
266. Wang, C., Pei, A., Chen, J., Yu, H., Sun, M. L., Liu, C. F., & Xu, X. (2012). A natural coumarin derivative esculetin offers neuroprotection on cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Journal of neurochemistry*, 121(6), 1007-1013.
267. Wirth, N. (1995). A plea for lean software. *Computer*, 28(2), 64-68.
268. Yamamoto, Y., & Watanabe, A. (1974). Fatty acid composition of lichens and their phyco- and mycobionts. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 20(2), 83-86.
269. Yamamoto, Y., Nishimura, K., & Kiriya, N. (1976). Studies on the metabolic products of *Aspergillus terreus*. I. Metabolites of the strain IFO 6123. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 24(8), 1853-1859.
270. Yılmaz, M., Türk, A. Ö., Tay, T., & Kıvanç, M. (2004). The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (–)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59(3-4), 249-254.
271. Zedda, L. (2002). The epiphytic lichens on *Quercus* in Sardinia (Italy) and their value as ecological indicators. *Englera* 24: 1-468
272. Zhou, R., Yang, Y., Park, S. Y., Nguyen, T. T., Seo, Y. W., Lee, K. H., ... & Kim, H. (2017). The lichen secondary metabolite atranorin suppresses lung cancer cell motility and tumorigenesis. *Scientific reports*, 7(1), 8136.

## ANNEXE 01 : Activité antioxydante - Méthode DPPH

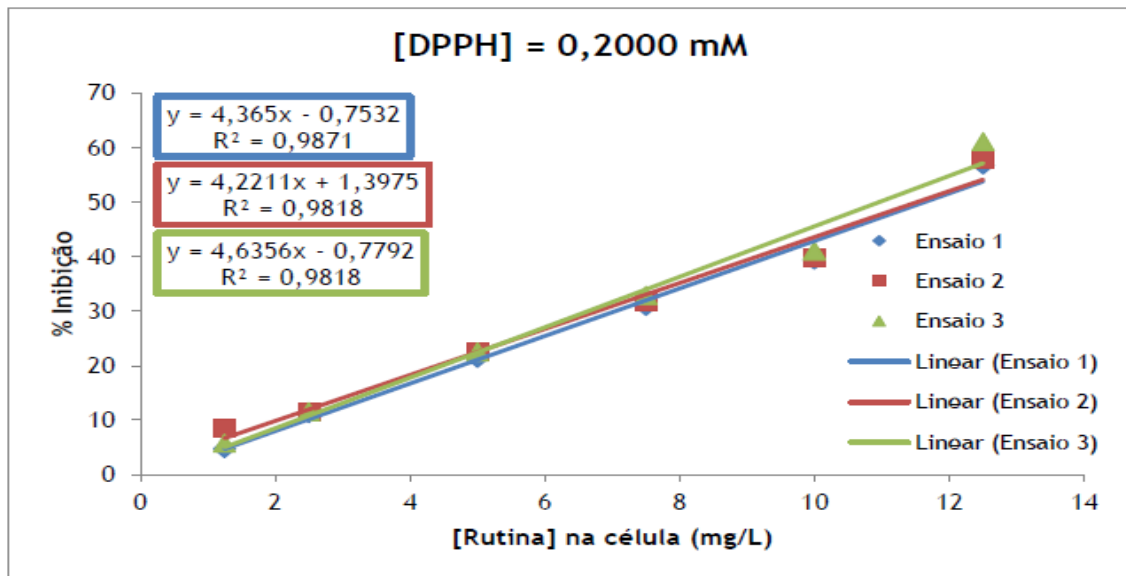
### 1. Rutine



**Figure 1** : Représentation graphique du % I en fonction de la concentration standard de rutine dans la cellule du spectrophotomètre, pour une concentration de DPPH de 0,0800 mM.



**Figure 2** : Représentation graphique du % I en fonction de la concentration standard de rutine dans la cellule du spectrophotomètre, pour une concentration de DPPH de 0,1242 mM

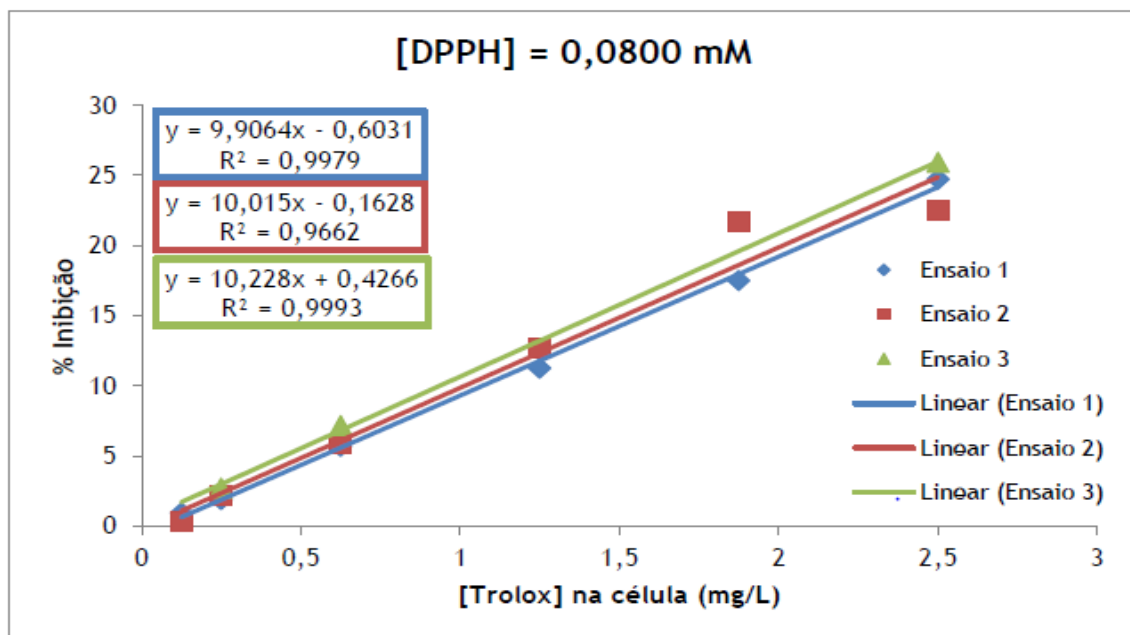


**Figure 3 :** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration standard de rutine dans la cellule du spectrophotomètre, pour une concentration de DPPH de 0,2000 mM.

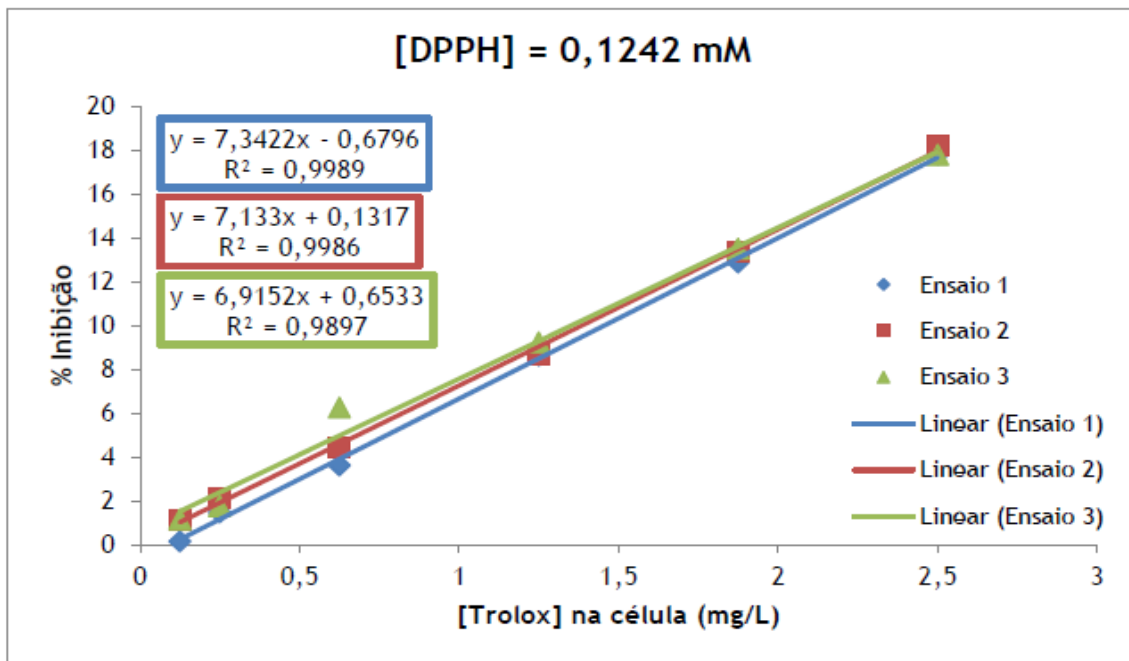
**Tableau 1 :** Valeurs des IC50, AAI et classification de l'activité antioxydante de la rutine

Rutine	Moyenne	Activité antioxydante
IC 50% (µg/ml)	8.1	Plus Forte
AAI	6.0	

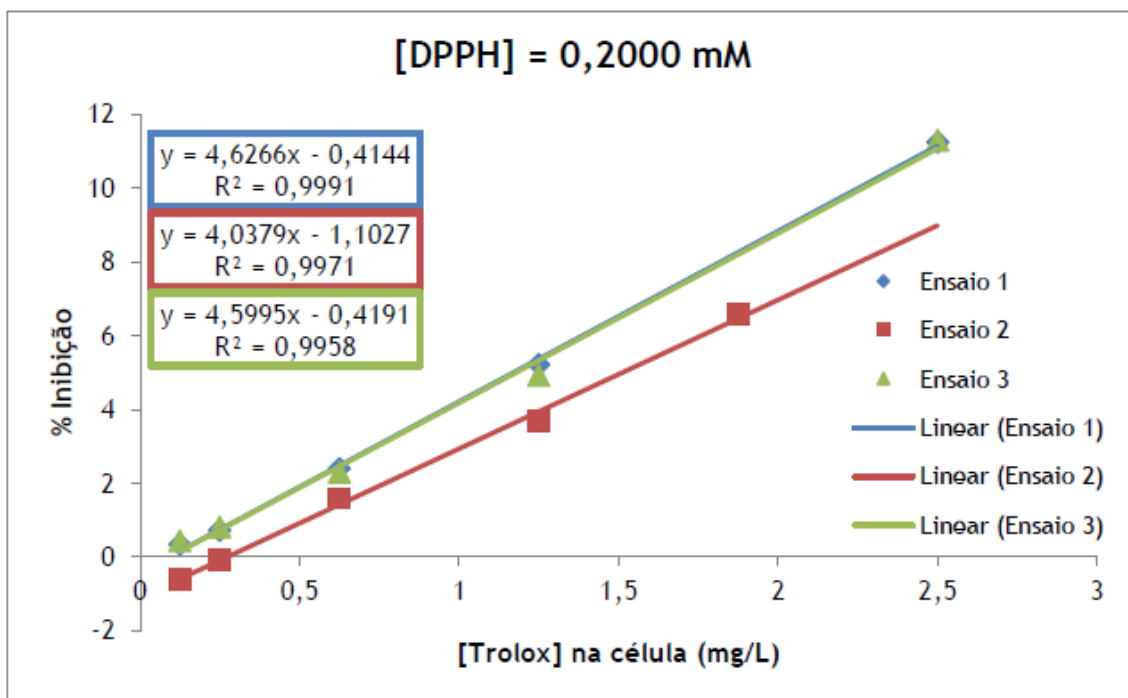
## 2. Troloxe



**Figure 4 :** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration standard de troloxe dans la cellule du spectrophotomètre, pour une concentration de DPPH de 0,0800 mM.



**Figure 5 :** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration standard de troloxe dans la cellule du spectrophotomètre, pour une concentration de DPPH de 0,1242 mM.

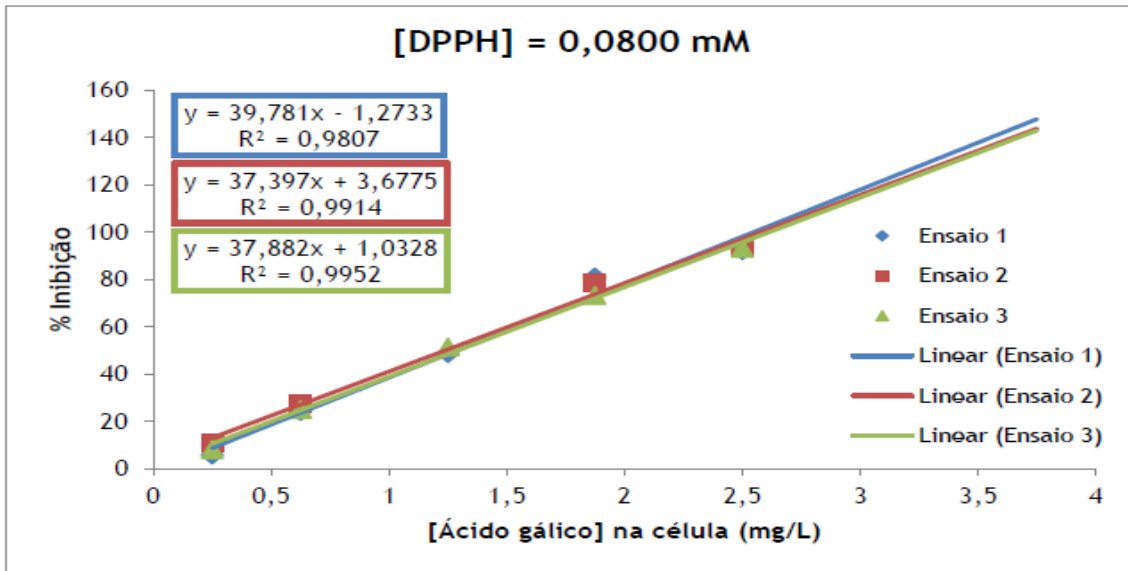


**Figure 6 :** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration standard de troloxe dans la cellule du spectrophotomètre, pour une concentration de DPPH de 0,2000 mM.

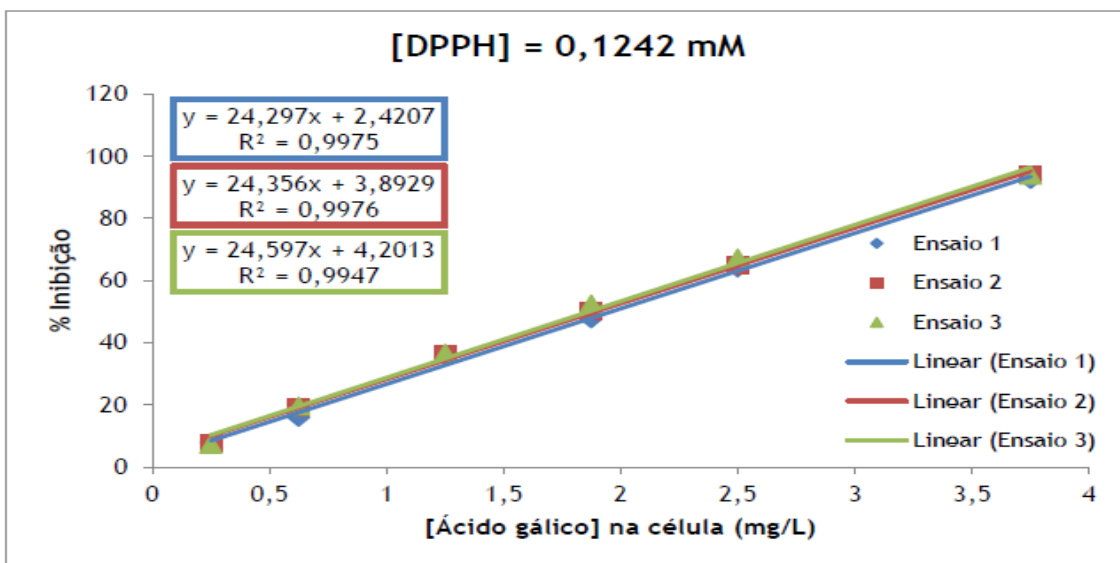
**Tableau 2 :** Valeurs des IC50, AAI et classification de l'activité antioxydante de la troloxe

Troloxe	Moyenne	Activité antioxydante
IC 50% (µg/ml)	7.8	Plus Forte
AAI	6.3	

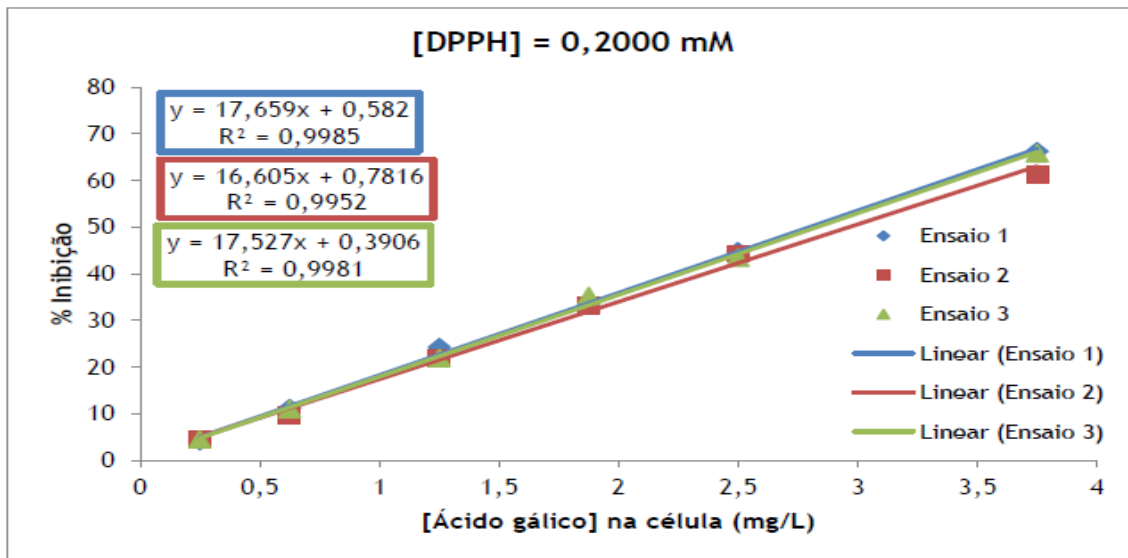
### 3. Acide gallique



**Figure 7 :** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration standard d'Acide gallique dans la cellule du spectrophotomètre, pour une concentration de DPPH de 0,0800 mM.



**Figure 8 :** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration standard d'Acide gallique dans la cellule du spectrophotomètre, pour une concentration de DPPH de 0,1242 mM.



**Figure 9 :** Représentation graphique du % I en fonction de la concentration standard d'Acide gallique dans la cellule du spectrophotomètre, pour une concentration de DPPH de 0,0200 mM.

**Tableau 3 :** Valeurs des IC50, AAI et classification de l'activité antioxydante d'Acide gallique

Acide gallique	Moyenne	Activité antioxydante
IC 50% (µg/ml)	2.0	Plus Forte
AAI	23.9	

## ANNEXE 02 : Lexique

**Apothécies :** Fructifications de lichen avec un disque ouvert correspondant à un hyménium non clos.

**Céphalodies :** Formations organisées par le mycobionte du lichen, mais contenant un photobionte différent de celui qui domine le thalle proprement dit. Les céphalodies sont connues uniquement chez les lichens à algues vertes et contiennent toujours une cyanobactérie.

**Cils :** Organes particuliers des lichens ne servant pas à l'adhésion du thalle au substrat. Ils peuvent être localisés à la marge du thalle ou des ascocarpes.

**Cyphelles :** Dépressions de contour généralement arrondi, assez profondes et à cavité de couleur claire, que l'on observe à la face inférieure des thalles du genre *Sticta*. **Fibrilles :** Petits filaments de même couleur que le thalle.

**Haptères :** Crampons de fixation.

**Isidies :** Petites excroissances du thalle, toujours cortiquées.

**Lecanorine:** Apothécies présentant des cellules algales.

**Lécidéine :** Apothécies dépourvues de cellulues agales. Nodules : Saillies du thalle, en cônes, visibles à l'oeil nu. Papilles : Minuscules excroissances coniques, visibles à la loupe. Paraphyses : Filaments simples ou ramifiés constituant l'hyménium.

**Plectenchyme :** Faux tissu, parfois très structuré, formé de l'association d'hyphes mycéliens. Phyllidies : Tissu de régénération d'une partie lésée d'un thalle lichénique, auquel les deux symbiotes participent. Poils : Ensemble d'hyphes plus ou moins libres et fines, parfois incurvées pouvant se développer à la surface du thalle. Leur ensemble forme un tomentum.

**Pseudocyphelles :** Ce sont des interruptions du cortex laissant entrevoir la médulle sousjacent. Elles peuvent être ténues ou bien distinctes, et peuvent adopter des formes diverses : punctiformes, allongées ou linéaires ou en réseau

**Rhizines :** crampons ou faisceaux plus ou moins compacts d'hyphes assurant l'adhésion du thalle à son substrat (particularité quasi exclusive des thalles foliacés). Schizidies : Propagules de multiplication végétative, en forme d'écaille, prenant naissance par fissuration de la partie supérieure du thalle lichénique.

**Soralies :** Amas granuleux de médulle libérée par une déchirure du cortex du thalle lichénique.

**Sorédies :** granules élaborés par le thalle lichénique, constitués d'hyphes fongiques et d'algues, elles permettent la reproduction végétative des lichens en disséminant ensemble, les deux partenaires de la symbiose

**Spinules :** Prolongements épais et rigides, plus ou moins en forme d'épine, formés de plusieurs hyphes agglomérés.

**Thalles :** Parties végétatives du lichen. Veines : Nervures