

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 84/D3C/2022

N° de série : 06/BA/2022



Thèse de Doctorat  
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Immunologie Cellulaire et Moléculaire

*Présentée et soutenue par :*

**TARTOUGA MAYA ABIR**

**Intitulé :**

**Etude de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire  
d'extraits du lichen *Parmotrema hypotropia* sur un modèle de  
dermatite atopique chez la souris**

**Membres du jury :**

<b>Présidente : TEBIBEL Soraya</b>	Professeur	Université des Frères Mentouri Constantine 1
<b>Directrice de thèse : ELOUAR Ibtissem</b>	Professeur	Université des Frères Mentouri Constantine 1
<b>Examineurs : TEBBANI Fethi</b>	MCA	Université des Frères Mentouri Constantine 1
<b>BARHOUCHE Badra</b>	MCA	Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques - Constantine

**Année universitaire  
2021-2022**

Université des Frères Mentouri Constantine1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 84/D3C/2022

N° de série : 06/BA/2022



Thèse de Doctorat  
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Immunologie Cellulaire et Moléculaire

*Présentée et soutenue par :*

**TARTOUGA MAYA ABIR**

**Intitulé :**

**Etude de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire  
d'extraits du lichen *Parmotrema hypotropia* sur un modèle de  
dermatite atopique chez la souris**

**Membres du jury :**

Soutenu le 31/10/2022

<b>Présidente : TEBIBEL Soraya</b>	Professeur	Université des Frères Mentouri Constantine 1
<b>Directrice de thèse : ELOUAR Ibtissem</b>	Professeur	Université des Frères Mentouri Constantine 1
<b>Examineurs : TEBBANI Fethi</b>	MCA	Université des Frères Mentouri Constantine 1
<b>BARHOUCHE Badra</b>	MCA	Centre de Recherche en Sciences Pharmaceutiques - Constantine

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۱۴۳۸

# Dédicace

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que : Je dédie cette thèse de doctorat.

**A Ma tendre Mère.** Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

**A Mon très cher Père.** Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

**A mon cher frère et mes chères sœurs :** Aymen, Amina, Daloula et Rayouna.

**A mes chères tantes et mes belles cousines**

**A mes chers oncles et mes cousins**

**A ma bestie.** Mima

**A mes chéries.** Oumayma, Imen, Michela, Dana, Sousou, Manoula et Mouna.

**A la mémoire de mes chers oncles : « Ziouche Boubeker » et « Kehal Said » ALLAH YARHMHOUM.**

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

À tous ceux qui j'ai omis involontairement de citer.

**MAYA**

# REMERCIEMENTS

*Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.*

*Je tiens à remercier tout d'abord ma directrice de thèse Pr. EL OUAR. I, pour ses encouragements et ses précieux conseils, pour l'orientation, la confiance, sa compréhension et son aide sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

*J'exprime mes remerciements également aux membres de jury chapotés par Pr.TEBIBEL.S, Dr. TEBBANI. F, et Dr. BARHOUCHE. B qui nous font l'honneur de faire partie du jury.*

*Je tiens à remercier ma petite équipe d'immunologie : mon cher confrère MOKHTARI Mohamed, et ma chère consœur ZEGHINA Ibtissem pour leur soutien inconditionnel, et leurs encouragements, je vous souhaite que du bonheur et de la réussite inchallah.*

*Je tiens à remercier également Pr. DJEKOUN Abdelhamid pour m'avoir accueilli au sein du centre de recherche en sciences pharmaceutiques.*

*J'adresse mes vifs remerciements au Professeur BENSOUICI Chawki de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire au centre de recherche en biotechnologie et pour sa gentillesse.*

*I would like to express my sincere gratitude and thanks to Pr.MARZOCCO Stefania for having me in her laboratory in Italy and for her kindness*

*Mes vifs remerciements s'adressent à tous mes enseignants sans exceptions, au Dr MADACI chef de département de biologie animale, à tout le personnel des laboratoires. Le laboratoire de pharmacie à Salerne « Italie », CRSP, et le CRBT spécialement mes belles amies : Dr. GALI Lynda, Dr RAPA Sara, MAGLIOCCA Giorgia et GUERRIERO Rosaria. « **Grazie bellezze** »*

*À mes amies (Mima, Imène) et à tous les membres de ma famille surtout Daloula. Merci pour votre soutien, je vous adore « 사랑해요 »*

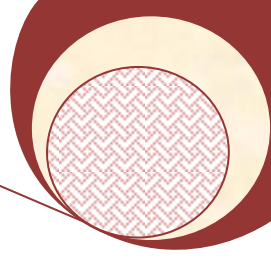
*Enfin je remercie tous ceux et celles qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.*

\*\*\*\*

*I want to thank me for believing in me and never quitting*



**MAYA**



# **Table des matières**

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction générale 1

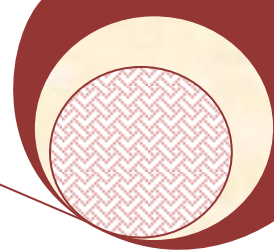
## ***Synthèse bibliographique***

### **Chapitre 1 : La peau**

1. Définition de la peau.....	4
2. Les couches de peau .....	4
2.1. L'épiderme.....	4
2.1.1. Les couches de l'épiderme.....	5
2.1.2. Les cellules de l'épiderme.....	6
2.2. La jonction dermo-épidermique.....	7
2.3. Le derme.....	8
2.4. L'hypoderme .....	8
3. Les annexes cutanées.....	9
4. Les fonctions de la peau.....	9

### **Chapitre 2 : La dermatite atopique**

1. Définition de dermatite atopique.....	10
2. Les causes et les facteurs déclenchant la dermatite atopique.....	10
2.1. La génétique.....	10
2.2. L'environnement.....	12
3. La physiopathologie de la dermatite atopique.....	12
4. Le stress oxydant et la dermatite atopique.....	14
5. Le diagnostic de la dermatite atopique.....	16
6. Les complications de la dermatite atopique.....	18



## Chapitre 3 : Les lichens

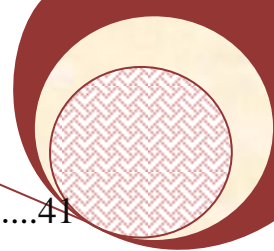
1. Définition.....	19
2. La répartition et la biodiversité des lichens.....	19
3. La structure et la morphologie des lichens.....	20
3.1. Les différents types de thalles.....	21
3.2. Les organes non sporogènes portés par le thalle.....	23
4. La reproduction de lichen.....	24
5. La symbiose lichénique.....	25
6. Les métabolites secondaires de lichens.....	26
6.1. La voie de l'acétate polymalonate.....	27
6.2. La voie de l'acide shikimique.....	30
6.3. La voie de l'acide mévalonique.....	31
7. L'intérêt des lichens.....	32

### *Partie expérimentale*

#### **I. Matériels et méthodes**

1. Le matériel végétal.....	34
1.1. Le lichen <i>Parmotrema hypotropia</i> (Nyl.) Hale.....	34
1.2. La préparation des extraits de lichen <i>Parmotrema hypotropia</i> .....	35
2. La caractérisation phytochimique .....	35
2.1. Le dosage des polyphénols totaux.....	35
2.2. La teneur totale en flavonoïdes.....	36
2.3. La détermination de la concentration de l'acide usnique dans les extraits de lichen <i>P.hypotropia</i> .....	36
3. L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits .....	38
3.1. Le test de piégeage de DPPH.....	38
3.2. Le test de piégeage ABTS.....	39
3.3. L'inhibition de blanchiment de la $\beta$ -carotène.....	40

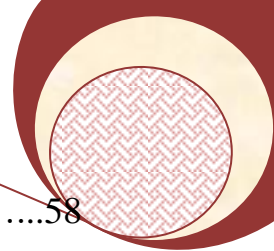




3.4. Le test de la réduction du complexe cuivre-neocuproéne (CUPRAC).....	41
4. Le test de cytotoxicité aigue sur les larves d' <i>Artémia salina</i> .....	42
5. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits.....	44
5.1. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> .....	44
5.1.1. L'inhibition de la dénaturation de BSA par la chaleur.....	44
5.1.2. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits sur les kératinocytes de la lignée HaCaT.....	45
5.1.2.1. La culture cellulaire.....	45
5.1.2.2. Le test de viabilité (MTT).....	45
5.1.2.3. Le dosage des espèces réactives d'oxygène intracellulaires (ROS).....	46
5.1.2.4. Le dosage du TNF- $\alpha$ .....	48
5.2. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> .....	49
5.2.1. Le test de toxicité cutanée sur les souris BALB/c.....	49
5.2.2. Le test de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait dichlorométhanique sur la dermatite atopique induite chez les souris .....	49
6. l'étude statistique.....	53

## II. Résultats

1. La caractérisation phytochimique.....	54
1.1. Le rendement total de l'extraction .....	54
1.2. La teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux des deux extraits de <i>P.hypotropa</i> .....	54
1.3. La détermination de la teneur en acide usnique dans les deux extraits de <i>P.hypotropa</i> .....	55
2. Les propriétés antioxydantes des deux extraits.....	56
2.1. Le test DPPH.....	56
2.2. Le test ABTS.....	56
2.3. Le test Beta-carotène.....	56
2.4. Le test CUPRAC.....	57



3. Le test de toxicité aiguë.....	58
3.1. L'effet des deux extraits de <i>P.hypotropa</i> sur la viabilité des larves d' <i>Artémia salina</i> .....	58
4. L'effet anti-inflammatoire des deux extraits.....	59
4.1. L'effet anti-inflammatoire des deux extraits <i>in vitro</i> .....	59
4.1.1. L'effet des extraits sur la dénaturation du BSA.....	59
4.1.2. L'effet des deux extraits sur l'activité anti inflammatoire des kératinocytes.....	59
4.1.2.1. L'effet des deux extraits sur la viabilité des cellules HaCaT.....	59
4.1.2.2. L'effet des deux extraits de <i>P.hypotropa</i> sur la production des ROS intercellulaires .....	61
4.1.2.3. L'effet des deux extraits sur la production du TNF- $\alpha$ .....	62
4.2. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire <i>in vivo</i> .....	63
4.2.1. L'évaluation de la dermatotoxicité <i>in vivo</i> de l'extrait dichlorométhanique.....	63
4.2.2. L'effet de l'extrait de dichlorométhane sur la dermatite atopique chez les souris.....	63
4.2.2.1. L'étude macroscopique.....	63
4.2.2.2. L'étude microscopique.....	66
<b>Discussion</b>	75
<b>Conclusion et perspectives</b>	82
<b>Références</b>	
<b>Résumé</b>	

## Liste des abréviations

<b>ABTS</b>	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
<b>BHA</b>	Butylatedhydroxyanisole
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin
<b>BHT</b>	Butylatedhydroxytoluene
<b>CARD</b>	Caspase Recruitment Domain
<b>CCL17</b>	C-C Motif Chemokine Ligand 17
<b>CCL5</b>	C-C Motif Chemokine Ligand 5
<b>CUPRAC</b>	CUPric Reducing Antioxydant Capacity
<b>DA</b>	Dermatite atopique
<b>DIC</b>	Dichloromethane
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DNCB</b>	Dinitrochlorobenzène
<b>DPPH</b>	1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl
<b>ETH</b>	Ethanol
<b>FLG</b>	Filaggrine
<b>HaCaT</b>	Human keratinocyte cell lines
<b>HPLC</b>	Chromatographie en Phase Liquide à Haute performance
<b>LETK1</b>	Lymphoepithelial Kazal-Type-Related Inhibitor
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinases
<b>MDC</b>	Macrophages Derived Chemokines

<b>RNS</b>	Reactive Nitrogen Species
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>SCORAD</b>	Severity Scoring of Atopic Dermatitis
<b>SPINK5</b>	Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 5
<b>TARC</b>	Thymus and Activation-Regulated Chemokine
<b>TLR</b>	Toll Like Receptor
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor alpha
<b>TSLP</b>	Thymic Stromal Lymphopoietin

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Rendement total d'extractions (RET%) du lichen *P.hypotropa* par le dichlorométhane et par l'éthanol.....54
- Tableau 2.** Teneur totale en phénols (exprimé en µg de GAE/ ml) et en flavonoïdes (exprimé en µg QE / ml) d'extrait de dichlorométhane et d'éthanol de *P. hypotropa*.....54
- Tableau 3.** Teneur en acide usnique des deux extraits de lichen *P.hypotropa* (exprimé en mg) et temps de rétention (exprimé en minutes).....56
- Tableau 4.** Activité antioxydante des deux extraits de *P.hypotropa*.....57
- Tableau 5.** Effet toxique de l'extrait de dichlorométhane et d'éthanol du lichen *P.hypotropa* sur les larves d'*A.salina* .....58

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure.1.</b> Anatomie de la peau.....	4
<b>Figure.2.</b> Différentes couches de l'épiderme .....	6
<b>Figure.3.</b> Aspects cliniques de la dermatite atopique à différents âges.....	10
<b>Figure.4.</b> Les différents gènes responsables de l'apparition la dermatite atopique.....	11
<b>Figure.5.</b> Physiopathologie de la dermatite atopique .....	14
<b>Figure.6.</b> Impact du stress oxydant sur les maladies inflammatoire de la peau .....	16
<b>Figure.7.</b> L'indice SCORAD, rapport de consensus du groupe de travail européen sur la dermatite atopique.....	17
<b>Figure.8.</b> Enfant atteint d'eczéma surinfecté par <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
<b>Figure.9.</b> Principaux substrats de lichen. Lichens poussant sur leurs substrats naturels.....	20
<b>Figure.10.</b> Structure du thalle de lichen.....	21
<b>Figure.11.</b> Illustration des principaux types morphologiques de lichens.....	23
<b>Figure.12.</b> Formes sexuée et asexuée chez les lichens.....	24
<b>Figure.13.</b> Schéma des échanges entre les deux organismes constituant le lichen.....	25
<b>Figure.14.</b> Les voies de biogenèse des métabolites secondaires lichéniques.....	26

<b>Figure.15.</b> Classe de substances lichéniques dérivées par la voie d'acétate polymonate.....	27
<b>Figure.16.</b> Structure d'un didepside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique).....	28
<b>Figure.17.</b> Structure de l'acide usnique de lichen <i>Usnea sp.</i> .....	29
<b>Figure.18.</b> Classe de substances lichéniques dérivées par la voie shikimique...	30
<b>Figure.19.</b> Classe de substances de lichen dérivées par la voie de l'acide mévalonique.....	31
<b>Figure.20.</b> Produits de lichens comestibles et médicinaux.....	33
<b>Figure.21.</b> <i>Parmotrema hypotropia</i> (Nyl.) Hale.....	34
<b>Figure.22.</b> La réaction du DPPH avec un anti oxydant.....	38
<b>Figure.23.</b> Principe de neutralisation d'ABTS <sup>+</sup> par les antioxydants.....	39
<b>Figure.24.</b> Principe de réduction du complexe cuivre-neocuproïne.....	42
<b>Figure.25.</b> Larve <i>Artémia salina</i> .....	43
<b>Figure.26.</b> Principe de réduction de tetrazolium en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale.....	45
<b>Figure.27.</b> Principe de dosage des ROS intracellulaire par cytométrie en flux en utilisant la sonde H <sub>2</sub> DCF-DA (2', 7'-dichlorofluorescéine-diacétate).....	47
<b>Figure.28.</b> Principe de la technique ELISA sandwich.....	48
<b>Figure.29.</b> Schéma général du protocole de la dermatite atopique induite par le DNCB (a) et de la répartition des lots (b) .....	51

<b>Figure.30.</b> Détermination d'acide usnique dans l'extrait de dichlorométhane de <i>P.hypotropa</i> par l'HPLC en comparant les pics de temps de rétention au standard.....	55
<b>Figure.31.</b> Détermination d'acide usnique dans l'extrait éthanolique de <i>P.hypotropa</i> par HPLC en comparant les pics de temps de rétention au standard.....	55
<b>Figure.32.</b> Effet inhibiteur contre la dénaturation de BSA des extraits de dichlorométhane et d'éthanol du lichen <i>P.hypotropa</i> .....	59
<b>Figure.33.</b> Effet de l'extrait de dichlorométhane à différentes concentrations (50-200 µg/mL) sur la viabilité des cellules HaCaT après 24, 48 et 72 heures.....	60
<b>Figure.34.</b> Effet d'extrait éthanolique différentes concentrations (50-200 µg/mL) sur la viabilité des cellules HaCaT après 24, 48 et 72 heures.....	60
<b>Figure.35.</b> Effet des extraits de dichlorométhane et d'éthanol du lichen <i>P.hypotropa</i> aux concentrations 50, 100, 200 µg/mL sur les taux de ROS intracellulaires dans les cellules HaCaT stimulées par LPS.....	61
<b>Figure.36.</b> Effet d'extraits de dichlorométhane et d'éthanol du lichen <i>P.hypotropa</i> a différentes concentrations 50, 100, 200 µg/mL sur la production du TNF-α (exprimé en pg/mL) par les cellules HaCaT stimulées par LPS.....	62
<b>Figure.37.</b> Score de lésions cutanées.....	64
<b>Figure.38.</b> Effet des différents traitements topiques sur l'épaisseur de peau....	65
<b>Figure.39.</b> Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris contrôle.....	66



- Figure.40.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris sensibilisée avec le DNCB.....67
- Figure. 41.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris traitée avec la pommade à base de l'extrait dichlorométhanique du lichen *P.hypotropa* à 0.45 % pendant 15 jours.....68
- Figure. 42.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris sensibilisée avec le DNCB et traitées avec la pommade à base de l'extrait dichlorométhanique de *P.hypotropa* 0.45%.....69
- Figure. 43.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris traitée avec la pommade à base de l'extrait dichlorométhanique du lichen *P.hypotropa* à 76% pendant 15 jours.....70
- Figure. 44.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris sensibilisée avec le DNCB et traitées avec la pommade à base de l'extrait dichlorométhanique de *P.hypotropa* 0.76 %.....71
- Figure. 45.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris traitée avec la pommade à base d'acide usnique 0.05% pendant 15 jours.....72
- Figure.46.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris sensibilisée au DNCB et traitées avec la pommade à base d'acide unique (0.05%).....73
- Figure.47.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris sensibilisée avec le DNCB et traitée avec la Bétaméthasone 0.05%.....74

# *Introduction générale*

### Introduction

La dermatite atopique ou eczéma atopique est une maladie cutanée inflammatoire chronique de la peau. Sa prévalence est en constante augmentation touchant jusqu'à 25 % des enfants et 2 à 3 % des adultes (Bajgai *et al.*, 2017). La dermatite atopique est caractérisée par une peau sèche, lésée, avec des démangeaisons intenses et un épaissement de l'épiderme. La peau lésionnelle des patients atteints de dermatite atopique présente un infiltrat de cellules T caractérisées principalement par l'expression des CD4. Le profil inflammatoire est complexe et diversifié avec une activation des cellules dendritiques, des cellules résidentes, des cellules lymphoïdes innées, des cellules de Langerhans, des lymphocytes, des mastocytes, des kératinocytes avec une surproduction des immunoglobulines sériques IgE et de cytokines de type 1 comme l'IL-2, TNF- $\alpha$  et de type 2 telles que l'IL-6 et l'IL-13 (Bajgai *et al.*, 2021).

Les kératinocytes représentent plus de 90% des cellules de la peau, et jouent un rôle fondamental dans le développement des réactions inflammatoires et immunitaires. Dans la dermatite, ils agissent comme des inducteurs majeurs de la réponse immunitaire suite à leur exposition à des antigènes étrangers et peuvent activer les cellules endothéliales, libérer les différents médiateurs inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , IL-1 et les chimiokines responsables du recrutement et de maturation des éosinophiles, des monocytes, des cellules dendritiques et des lymphocytes (Esche *et al.*, 2004).

En outre, la dermatite atopique est associée à la surproduction des espèces réactives de l'azote (RNS) et de l'oxygène (ROS) qui résulte de plusieurs stimuli pro-inflammatoires des cytokines, des radiations UV, des allergènes comme le pollen...etc (Bertino *et al.*, 2020). Ce déséquilibre redox participe au maintien de l'inflammation à travers l'augmentation de l'expression des gènes inflammatoires, mais également il peut endommager les structures cellulaires de la peau et affaiblir la fonction de la barrière cutanée (Hebert, 2020). Le stress oxydatif peut entraîner une peroxydation des lipides, une oxydation des protéines et des dommages au niveau de l'ADN, induisant ainsi plusieurs dysfonctionnements physiologiques (Emmert *et al.*, 2020).

L'eczéma est une affection complexe dont les mécanismes pathologiques restent encore mal connus, néanmoins la maladie peut être déclenchée par divers facteurs y compris une susceptibilité génétique, un dysfonctionnement de la barrière immunologique de la peau

et des facteurs environnementaux (Weidinger *et al.*, 2018). En effet, il a été reporté que plus de 31 loci sont responsables de la prédisposition génétique à la maladie, des mutations au niveau des gènes codant pour le facteur de transcription STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), les récepteurs de cytokines IL-18R et IL-6R, ainsi que les gènes codant pour la filaggrine et la protéase SPINK5 (serine protease inhibitor kazal-type 5) responsable de la différenciation et l'intégrité de la barrière cutanée (Brown *et al.*, 2009; Ji *et Li*, 2016).

Le traitement de la dermatite constitue aujourd'hui un défi thérapeutique, il est basé principalement sur les antihistaminiques oraux qui sont utilisés pour soulager la maladie, tandis que les corticostéroïdes topiques sont généralement la base du traitement des formes modérées à sévères. Cependant, une utilisation prolongée de stéroïdes entraîne des effets indésirables en provoquant le purpura, l'amincissement de la peau, l'apparition des vergetures, et d'infections cutanées (Stacey *et McEleney*, 2021). Le développement de nouveaux traitements efficaces sans effets secondaires est devenu à nos jours une nécessité.

Au cours des dernières années, les chercheurs ont manifesté un grand intérêt à l'exploitation et la valorisation des ressources naturelles utilisées dans la médecine traditionnelle. Les lichens sont des organismes composites résultant d'une relation symbiotique entre un champignon et une algue et/ou cyanobactérie. Ils sont utilisés dans la médecine traditionnelle chinoise, occidentale et indienne pour traiter différentes maladies telles que l'arthrite, les maladies respiratoires et pulmonaires (Saha *et al.*, 2021). L'importance de ces organismes et le grand intérêt qu'ils ont suscité ces dernières années est lié à leur capacité à synthétiser divers métabolites secondaires d'intérêts médicaux. Le thalle développé par le champignon est la principale source de constituants phytochimiques qui sont actuellement utilisés dans les aliments, les colorants, les produits cosmétiques, les parfums et les médicaments (Tatipamula *et al.*, 2018). Actuellement, plus de 1000 métabolites d'une extrême originalité, exerçant une grande variété d'activités biologiques ont été identifiés chez les lichens (Molnár *et Farkas*, 2010; Hong *et al.*, 2018).

Dans ce contexte, l'objectif de notre travail est d'étudier l'effet thérapeutique du lichen *Parmotrema hypotropia* collecté dans l'Est Algérien contre la dermatite atopique. Dans un premier temps, nous allons procéder à la caractérisation chimique des extraits du lichen en mesurant la teneur total en polyphénols, en flavonoïdes et en acide usnique, un des composés

exclusivement retrouvés chez les lichens, puis évaluer les propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires du lichen.

Dans un deuxième temps, sera étudié l'effet des extraits *in vitro* sur une lignée cellulaire de kératinocytes où la production des médiateurs inflammatoires ROS et TNF- $\alpha$  sera mesurée.

Finalement, l'effet thérapeutique du lichen est testé sur un modèle de dermatite atopique induite chez la souris. L'effet du lichen est évalué sur l'évolution de la pathologie et ce à travers l'étude des scores de lésions ainsi que l'étude de l'histologie de la peau.



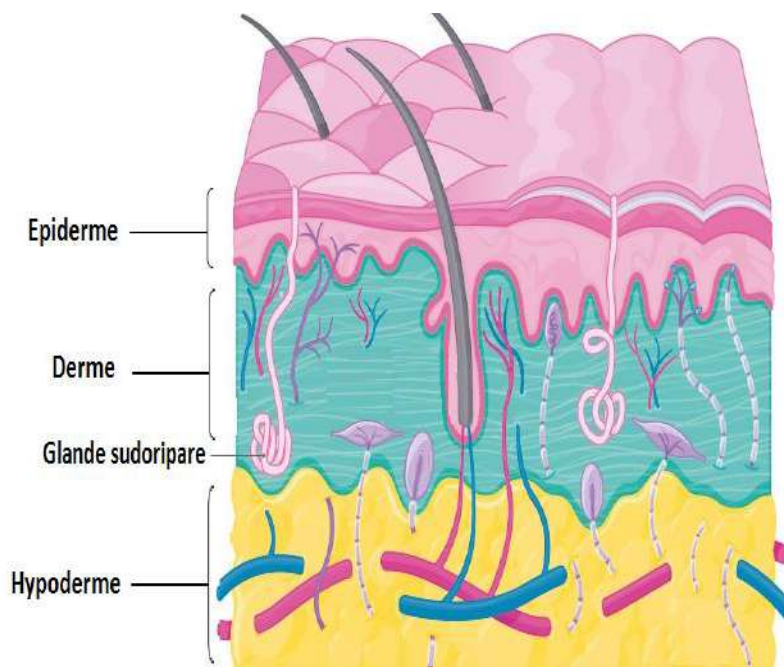
# *Synthèse bibliographique*

## La peau

### 1. Définition de la peau

La peau est le plus grand organe qui couvre toute la partie extérieure du corps humain, elle représente 15 % du poids d'un adulte soit 2m<sup>2</sup> de surface, son épaisseur varie entre 1.5mm à <0.1mm de parties plus épaisses aux plus fines (paupières) (Lawton, 2019).

La peau est composée par trois couches l'épiderme, le derme, et la troisième couche qui est la plus profonde : l'hypoderme. (Fig. 1)



**Figure 1.** Anatomie de la peau (Gould, 2018)

### 2. Les couches de peau

#### 2.1. L'épiderme

L'épiderme est la couche épithéliale squameuse stratifiée qui est en contact direct avec le milieu externe, elle se compose principalement de kératinocytes et d'autres cellules, telles que les cellules de Langerhans, les mélanocytes et les cellules de Merkel (James *et al.*, 2006). L'épiderme est généralement divisé en 4 couches (Fig. 2).

## 2.1.1. Les couches de l'épiderme

L'épiderme est divisé en 4 couches:

### 2.1.1.1. La couche basale (*stratum germinativum*)

La couche basale la plus profonde séparée du derme par une membrane basale, est formée par une seule assise de kératinocytes accrochées entre eux par un système de jonction appelé les désmosomes, et à la matrice cellulaire par des hémidesmosomes. La couche basale est l'emplacement principal de la division des cellules souches et leur migration vers les autres couches supra-basales pour se différencier en cornéocytes pour la régénération continue de la peau. Cette couche contient également des mélanocytes (Guo, 2009 ; Qin, 2016).

### 2.1.1.2. La couche épineuse (de Malpighi) (*stratum spinosum*)

La couche épineuse constituée de cellules polyédriques irrégulières qui entrent en contact avec les cellules voisines par des désmosomes, le nombre d'assises de cellules est entre 5 à 10 (Chu, 2008).

### 2.1.1.3. La couche granuleuse (*stratum granulosum*)

C'est une couche formée de 3 à 5 couches de kératinocytes aplaties sous forme de diamant, contenant au niveau de leur cytoplasme des granules de kératohyaline qui sont spécialisées dans la production de kératine et d'autres granules nommés lamellaires agissant comme un ciment entre les cellules (Yousef *et al.*, 2019).

### 2.1.1.4. La couche claire ou *Stratum lucidum*

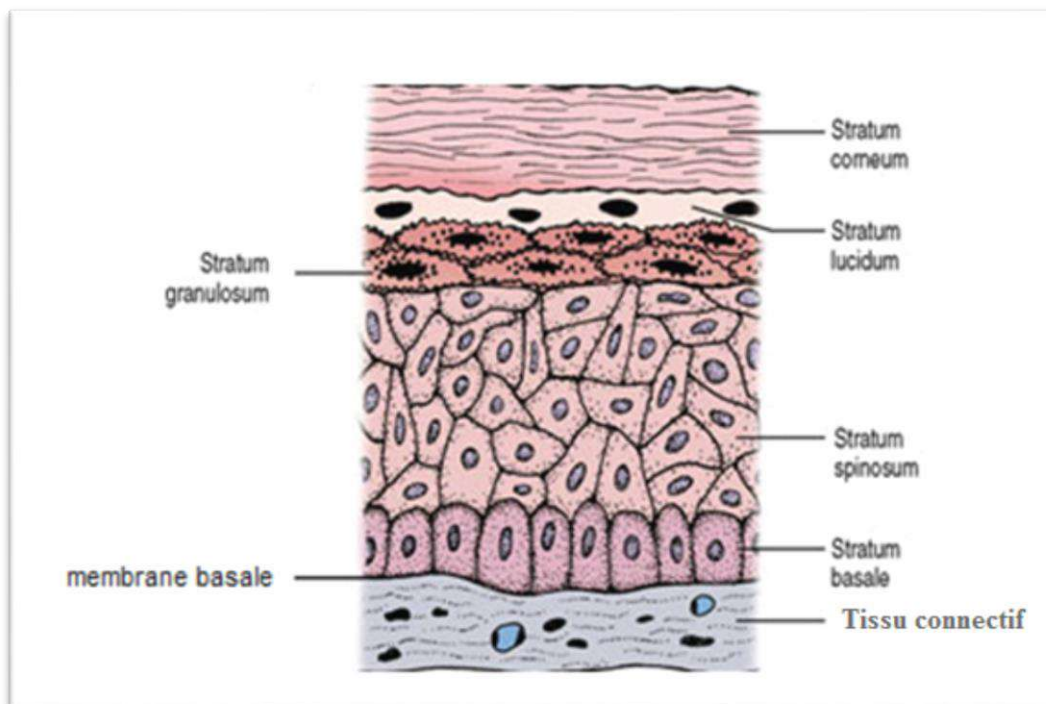
Cette couche se trouve dans la peau épaisse au niveau de la paume des mains et la plante des pieds et entre la couche cornée et granuleuse, elle est constituée d'éléidine, un produit de transformation de la kératohyaline. (Yousef *et al.*, 2019).

### 2.1.1.5. La couche cornée (*stratum corneum*)

C'est la couche superficielle de 10 à 30  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, constituée de calleuses épaisses sous forme polyédrique, dépourvues du noyau appelées les cornéocytes qui vont desquamer. Ces cellules sont composées principalement de kératine et entourées par les protéines et les lipides formés au niveau de la couche granuleuse et qui deviennent mature dans la couche cornée. Elle joue un rôle de barrière mécanique contre les agents extérieurs et



permet l'entrée des xénobiotiques (médicaments et des produits chimiques) dans la peau et prévient l'échappement d'eau (Kabashima *et al.*, 2018).



**Figure 2.** Différentes couches de l'épiderme (Suhaimi et Rose, 2016)

### 2.1.2. Les cellules de l'épiderme

#### 2.1.2.1. Les kératinocytes

Les kératinocytes représentent 95% de l'épiderme sont nommés kératinocytes en raison de leur capacité de produire la kératine de cellules constitutives de l'épiderme. Ces cellules subissent des différenciations morphologiques après leur production au niveau de la couche basale, afin de protéger la peau des agressions externes (Johansen, 2017).

#### 2.1.2.2. Les mélanocytes

Les mélanocytes sont des dérivés de la crête neurale et qui ont diffusés dans la couche basale. A l'intérieur de ces cellules se trouvent des mélanosomes, où la mélanine est synthétisée à partir de la tyrosine. Les mélanosomes sont ensuite transportés dans le cytoplasme des kératinocytes.

La fonction principale de mélanine est la pigmentation de la peau et également sa protection aux rayonnements ultraviolets (UV) par le mécanisme d'absorption.

Il y a deux types de mélanine :

- les eumélanines, de couleur brune ou noire, sont caractérisées par leur haut poids moléculaire;
- Les phaéomélanines, de couleur jaune orangée.

La différence de la couleur de peau d'un individu à l'autre est déterminée par le nombre et la taille de mélanosomes, et non par le nombre de mélanocytes car le nombre de ces derniers est identique chez toutes les populations humaines. La couleur de peau est aussi influencée par l'exposition aux rayons UV, les hormones, et les facteurs génétiques (Kolarsick *et al.*, 2011 ; Lawton, 2019).

### **2.1.2.3. Les cellules de Langerhans**

Les cellules de Langerhans dispersées dans la couche épineuse et granuleuse, et en petit nombre dans la couche basale, représentent 2 à 8% de cellules de l'épiderme. Les cellules de Langerhans ne sont pas attachées aux autres cellules, elles ont un rôle dans l'activation de l'immunité en phagocytant les antigènes (sous forme de protéines solubles) trouvés dans l'épiderme et de les présenter aux lymphocytes T (Kolarsick *et al.*, 2011).

### **2.1.2.4. Les cellules de Merkel**

Les cellules de Merkel situées dans la couche basale en un très petit nombre (< 5%), sont responsables de la sensation dans des zones particulières, telles que les lèvres, les paumes, la plante des pieds, les bouts des doigts, et les organes génitaux (Abraham et Mathew, 2019).

## **2.2. La jonction dermo-épidermique**

La jonction dermo-épidermique, zone fine poreuse, permet la cohésion et l'échange des cellules et de fluides entre l'épiderme et le derme. Elle joue un rôle du support mécanique de la couche épidermique.

Elle est composée de trois zones principales:

**-la zone claire (*Lamina lucida*):** constituée de filaments d'ancrages riches en laminine V; ces filaments relient les hémidesmosomes des kératinocytes de la couche basale avec la zone dense, située en dessous de la zone claire;

**-la zone dense (*Lamina densa*):** est constituée majoritairement en collagène de type IV et de protéoglycanes;

**-la zone fibrillaire:** comprend des fibres d'ancrages qui sont constituées de collagène de type VII; elles ont un rôle de relier la zone dense aux plaques d'ancrages du derme papillaire. (Simpson *et al.*, 2011).

### 2.3. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif représentant le second tissu de peau, d'une épaisseur varie entre 1 à 5 mm. Il est innervé et vascularisé riche en fibres et protéines, et de cellules dispersées dans la matrice extracellulaire. Il joue un rôle nutritif de l'épiderme. Il a également un rôle dans l'élasticité et l'hydratation de la peau.

Le derme est divisé en deux zones :

**-le derme papillaire :** partie superficielle du derme la plus fine, composée d'un tissu conjonctif lâche, riche en cellules et en capillaires sanguins ;

**-le derme réticulaire (ou profond) :** tissu conjonctif dense, plus épais, riche en fibres de collagènes et pauvre en cellules (Yousef *et al.*, 2019; Lawton , 2019).

### 2.4. L'hypoderme

L'hypoderme un tissu adipeux blanc situé sous le derme, c'est un tissu conjonctif composé de lobules adipeux servant de passage aux vaisseaux et nerfs destinés au derme, ces lobules sont constitués de préadipocytes (précurseurs des adipocytes), de macrophages, et majoritairement des adipocytes. L'hypoderme a un rôle de stockage d'énergie sous forme de triglycérides, de régulation thermique du corps, et de protection car il absorbe les chocs (Gilaberte *et al.*, 2016).

### 3. Les annexes cutanées

Ce sont des structures associées à la peau, elles ont un rôle important dans la composition physio-chimique de la peau (Kolarsick *et al.*, 2011). On distingue trois annexes:

- **l'appareil pilo-sébacé** : contient un follicule pileux qui comporte le poil et ses gaines , le muscle arrecteur du poil ; et une glande sébacée localisée au derme et responsable de la synthèse et la sécrétion du sébum;
- **les glandes sudoripares** : glandes situées au niveau du derme et dont le rôle est de produire de la sueur pour permettre la thermoregulation par transpiration;
- **les ongles** : l'ongle est une plaque dure de kératine qui protège la face dorsale des extrémités des doigts et des orteils.

### 4. Les fonctions de la peau

Les principales fonctions sont :

- la fonction de thermorégulation** : la peau est fortement impliquée dans la régulation de la température corporelle, grâce aux vasodilatations et vasoconstrictions des vaisseaux sanguins ; aussi la sueur peut jouer un rôle thermorégulateur par évaporation en éliminant la chaleur excédentaire de l'organisme;
- la fonction de barrière** : la peau peut assurer la protection de l'organisme contre les agressions comme les blessures, les effets nocifs des rayons UV, la perte excessive des protéines et la déshydratation.
- la fonction immunitaire** : elle peut être considérée comme organe immunitaire, lors d'une agression dont les différents facteurs du système immunitaire sont utilisés;
- la fonction métabolique** : la peau peut produire la vitamine D qui a pour but de fixer le calcium sur les os lors de l'exposition au soleil, la peau possède également des récepteurs pour les hormones stéroïdes et la vitamine A;
- la fonction sensorielle**: la peau agit comme organe sensoriel à cause des terminaisons nerveuses au niveau du derme qu'elle contient, elle détecte la chaleur, le froid, la douleur et le toucher (Lawton, 2019).

### La dermatite atopique

#### 1. Définition de dermatite atopique

La dermatite atopique (DA), maladie inflammatoire chronique de la peau, aussi appelée eczéma atopique, touche souvent les enfants (20%), mais peut se développer chez les adolescents et les adultes (10%). L'eczéma atopique se caractérise par une sécheresse excessive de la peau (xérose), des plaques rouges, et des fortes démangeaisons (Fig. 3). Différents facteurs interviennent dans le déclenchement de cette maladie chez un individu, comme les facteurs environnementaux, immunologiques et génétiques fragilisant ainsi la peau (Tsakok *et al.*, 2019).



**Figure 3.** Aspects cliniques de la dermatite atopique à différents âges (1-nourrisson, 2- enfant, 3-adulte) ( Weidinger et Novak, 2016)

#### 2. Les causes et les facteurs déclenchant la dermatite atopique

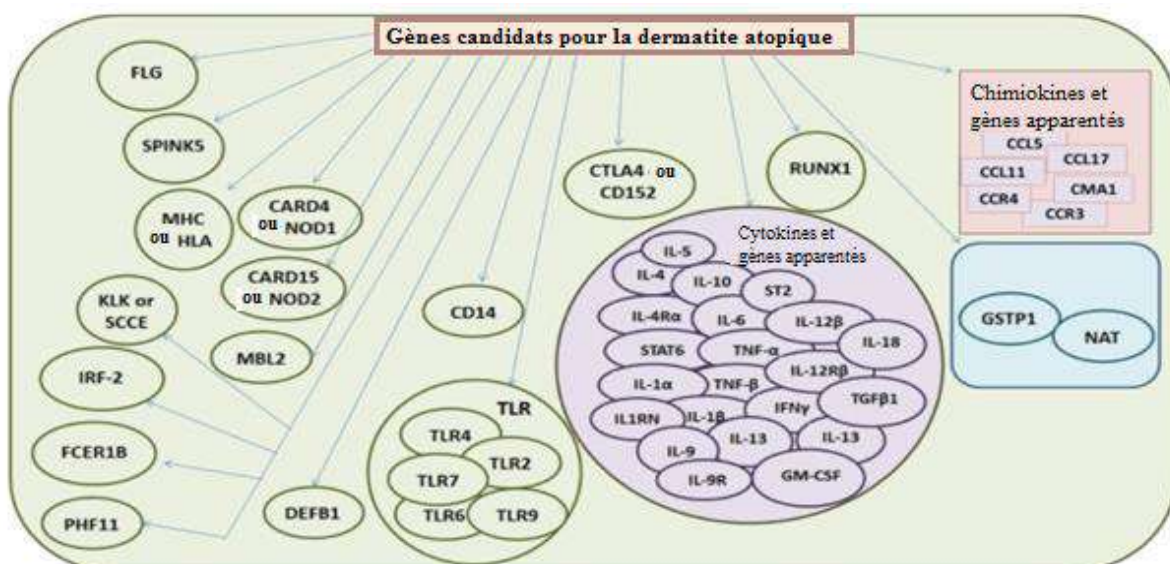
##### 2.1. La génétique

Le côté héréditaire joue un rôle prépondérant dans cette maladie. 70% des individus touchés par cette dernière, ayant un parent atteint d'eczéma (Sánchez-borges *et al.*, 2019). Le taux de risque est élevé chez les jumeaux monozygotes (72,86%) que chez les jumeaux dizygotes (21-23%) dont plusieurs gènes sont responsables de la fonction de la peau et son

altération (Fig.4). Parmi eux le FLG est un gène code pour la protéine filaggrine. Cette dernière est importante pour la peau, elle est exprimée au sein des kératinocytes granuleux et intervient au cours de leur développement, et forme une barrière cutanée étanche. Les mutations au niveau du gène FLG peuvent provoquer une absence totale de la filaggrine. Cette absence entraîne une altération des kératinocytes, et donc l'affection de la barrière épidermique en provoquant une déshydratation de peau qui se manifeste par une xérose et une augmentation du pH qui favorise la colonisation des bactéries pathogènes, l'activation des enzymes dégradants et le ralentissement de la réparation cutanée.

D'autres gènes liés à la peau ont également été identifiés comme étant associés à la dermatite atopique tels que SPINK5 (Serine Protease Inhibitor Kazal-Type 5), et LETK1 (LEKT1 Lymphoepithelial Kazal-Type-Related Inhibitor) qui contrôle l'activité de certaines sérines peptidases dans la couche cornée pour une desquamation normale de la peau en aidant à rompre les connexions entre les cellules de la couche cornée.

D'autres gènes sont impliqués dans l'immunité innée et adaptative, tels que le gène TLR4, CARD 5 (caspase recruitment domain), CARD 11, et le gène DEF1 ( $\beta$ -defensin 1), CCL5 (C-C Motif Chemokine Ligand 5), CCL17 (C-C Motif Chemokine Ligand 17) dont leurs mutations affectent le système immunitaire, ils sont aussi associés à l'apparition de la dermatite atopique (Al-shobaili *et al.*, 2016; Nutten, 2015).



**Figure 4.** Les différents gènes responsables de l'apparition la dermatite atopique (Al-shobaili *et al.*, 2016)



### 2.2. L'environnement

Les différentes modifications de l'environnement sont liées au risque et à la gravité de la dermatite atopique.

L'excès d'hygiène, le lavage excessif et l'exposition aux différentes substances chimiques (tels que les cosmétiques, les détergents, etc.) peuvent causer des dommages mécaniques qui facilitent l'invasion des microbes, allergènes, virus dans la peau. Le mode de vie d'un individu favorise aussi l'apparition de cette maladie (Hendricks *et al.*, 2020; Tsakok *et al.*, 2019).

### 3. La physiopathologie de la dermatite atopique

La dermatite atopique, inflammation allergique, résulte d'une interaction entre une altération de la barrière cutanée, des mutations des protéines de structure de l'épiderme, des anomalies du système immunitaire et des facteurs environnementaux (Agrawal et Woodfolk, 2014).

Il existe deux types de dermatite atopique :

-la dermatite intrinsèque due à une auto-réaction contre les cellules de peau, caractérisée par un taux d'IgE normal avec une fonction barrière relativement préservée;

-la dermatite extrinsèque résulte d'une altération de la barrière cutanée et qui se caractérise par une sécrétion élevée d'IgE sériques totales et une fonction barrière altérée (Yatagai *et al.*, 2018).

Dans la dermatite atopique et après une altération de l'épiderme à cause des agents externes ou des facteurs génétiques, qui va faciliter l'entrée des antigènes; les cellules présentatrices d'antigène vont capter l'antigène et migrer vers les ganglions lymphatiques afin de le présenter aux lymphocytes, au même temps que les cellules résidentes tels que les mastocytes, les fibroblastes et majoritairement les kératinocytes sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (ex : TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) et de lymphopoïétine stromale thymique (TSLP) qui vont activer d'autres cellules comme les cellules dendritiques. Ces dernières sécrètent des chimiokines telles que les TARC « thymus and activation-regulated chemokine » et MDC « Macrophages derived chemokines » qui attirent les lymphocytes et les granulocytes. Les T helper 2 (Th 2) sécrètent différentes cytokines qui sont prédominant dans la phase aigue de la

dermatite atopique (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 et IL-13) sur le lieu d'inflammation. Ces cytokines vont stimuler les lymphocytes B (LB) à produire des anticorps IgE et augmenter le nombre des éosinophiles qui sont les deux acteurs majeurs de la dermatite atopique (Fig. 5).

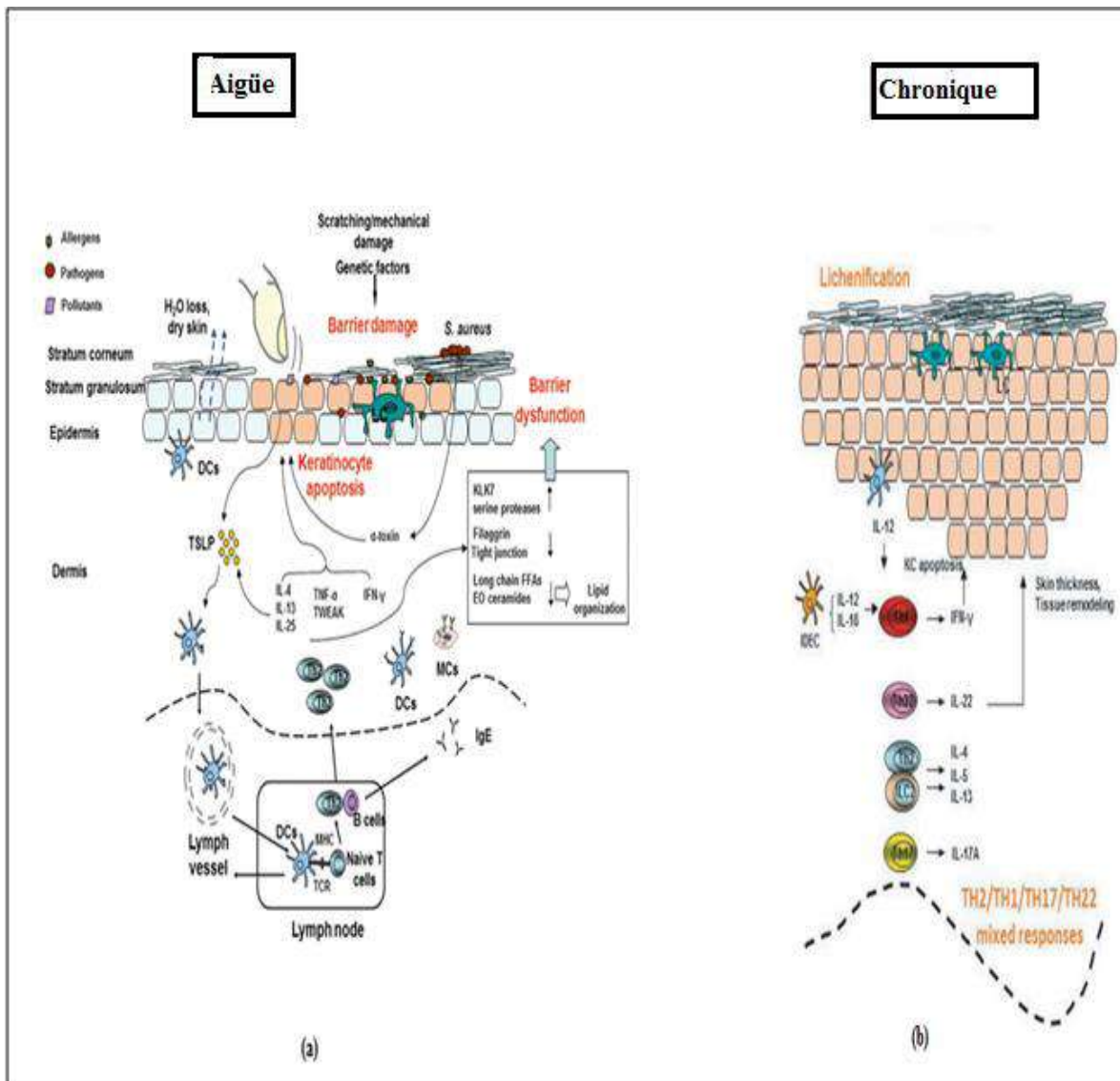
En outre, les cytokines de Th2 augmentent la sécrétion des TSLP par les kératinocytes et favorisent la dégradation de la barrière cutanée en endommageant son organisation lipidique. D'autres cytokines comme l'IL-25 et IL-33 ont un effet nocif sur la filaggrine et provoquent une diminution de l'expression des jonctions serrées et donc l'altération du film protecteur de la couche cornée. Cette dernière s'accompagne d'une augmentation de la pénétration des atopènes et favoriserait ainsi la sensibilisation à divers allergènes de l'environnement (Langan *et al.*, 2020 ; Peng et Novak, 2015).

En revanche, les TSLP peuvent directement ou indirectement stimuler les nerfs sensoriels et provoquer une inflammation neurogène avec prurit qui va continuer à son tour le cycle de dermatite atopique par la promotion de la réponse Th2, la prolifération des kératinocytes et l'épaisseur épidermique (Weidinger et Novak, 2016).

Par ailleurs, lors de cette maladie les kératinocytes produisent des peptides antimicrobiens tels que la cathélicidine et les  $\beta$ -défensines humaines suite à la stimulation des TLR (Toll Like Receptor) des kératinocytes; mais l'IL-4, l'IL-16 et l'IL-10 secrétées par les cellules immunitaires diminuent la sécrétion de ces peptides entraînant un déséquilibre du microbiote cutané et favorisent l'augmentation des bactéries dans la peau spécialement les *Staphylococcus aureus*. Ces derniers secrètent des hydrolases (céramidase) et des substances toxiques (enterotoxines) qui favorisent l'altération de la barrière cutanée et l'augmentation des IgE spécifiques (IgE enterotoxines spécifiques) en aggravant l'eczéma (Peng et Novak, 2015; Lang *et al.*, 2010).

La phase chronique de la DA est caractérisée par une prédominance d'IFN- $\gamma$  et d'IL-12 avec le recrutement des lymphocytes TH1, TH2, TH17, TH22 par une sécrétion excessive des médiateurs inflammatoires (Abramovits, 2005).





**Figure 5.** Physiopathologie de la dermatite atopique (**a**: dermatite atopique aigüe; **b**: dermatite atopique chronique) (Peng et Novak, 2015).

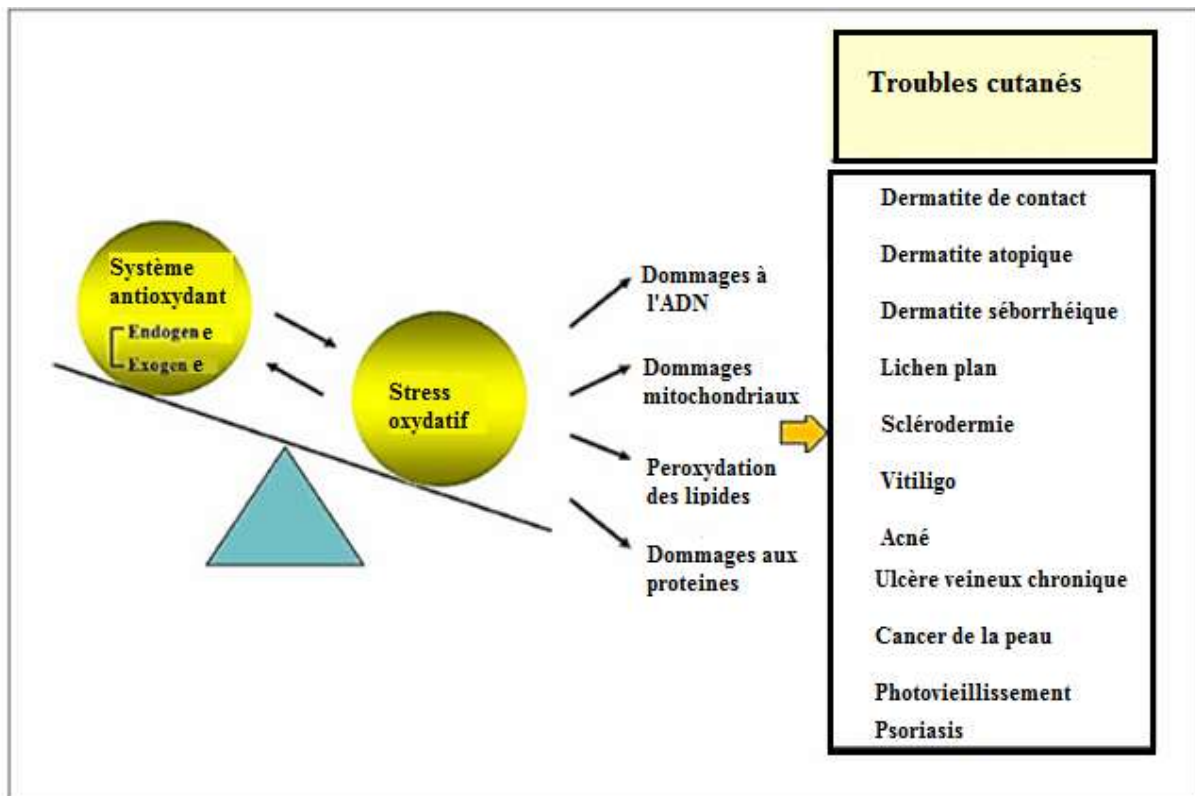
#### 4. Le stress oxydant et la dermatite atopique

Le stress oxydant est défini comme le résultat d'un déséquilibre entre la production de composés pro-oxydants et leur élimination par les antioxydants. Il résulte de l'action d'un ensemble de facteurs incluant, les agents chimiques carcinogènes, les radiations ionisantes et même le régime alimentaire (un régime riche en pro-oxydant ou pauvre en antioxydant comme la vitamine C et E). Les cellules altérées par ces facteurs produisent des taux élevés de radicaux libres principalement les ROS (Haleng *et al.*, 2007).

Le stress oxydant joue un rôle central dans de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose (Vogiatzi *et al.*, 2009), le diabète de type 2 (Pitocco *et al.*, 2010), les pathologies neurodégénératives (Darvesh *et al.*, 2010), les maladies inflammatoires de la peau comme le psoriasis et la dermatite (Emmert *et al.*, 2020).

Les antioxydants enzymatiques représentent la composante la plus importante des systèmes de défense cellulaires contre les attaques oxydatives. Ces enzymes sont hautement conservées et présentes chez l'ensemble des mammifères (comme la superoxyde dismutase, la catalase, le glutathion peroxydase) (Ighodaro *et al.*, 2018). Parmi les antioxydants non-enzymatiques, on distingue des composés endogènes (le glutathion, l'acide urique, la bilirubine et l'ubiquinol) et des composés exogènes comme les vitamines C et E et les polyphénols qui sont principalement apportés à l'organisme par l'alimentation (Santovito *et al.*, 2021).

Le stress oxydatif semble être l'un des facteurs importants dans la pathogenèse de la dermatite atopique dont la source pourrait être environnementale ou physique (Fig.6). Divers polluants atmosphériques, tels que la fumée de tabac, les composés organiques volatils, le formaldéhyde, le toluène, le dioxyde d'azote et les particules d'air, constituent des facteurs de risque et des aggravants de la maladie. Les polluants atmosphériques induisent un stress oxydatif dans la peau, entraînant un dysfonctionnement de la barrière cutanée ou un dysfonctionnement immunitaire. Le stress oxydatif non seulement, il endommage directement les structures cellulaires de la peau, mais il renforce également l'inflammation dermique, il affaiblit la fonction de barrière cutanée et favorise les infections par des agents pathogènes microbiens. Les patients atteints de la dermatite atopique présentent souvent des taux d'antioxydants systémiques plus faibles et une altération des marqueurs du stress oxydant, une augmentation du 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) urinaire, un marqueur d'oxydation de l'ADN et un déséquilibre de homéostasie des radicaux oxygène/azote, nitrite/ nitrate et sélénium ont été observés chez les enfants atteints d'eczéma. La capacité antioxydante du sang est également significativement inférieure avec des taux élevés du MDA ont été enregistrés chez les patients atteints de dermatite (Bertino *et al.*, 2020).



**Figure 6.** Impact du stress oxydatif sur les maladies inflammatoires de la peau  
(Fahad et Mohammed, 2020)

### 5. Le diagnostic de la dermatite atopique

Le diagnostic de la dermatite atopique est complexe car son apparition diffère d'une personne à l'autre. Les critères d'examen chez un nourrisson ne sont pas les mêmes chez l'enfant ou l'adulte, ils se divisent entre des critères majeurs et mineurs selon Hanifin et Ranjka en 1979, ou plus simplifiés par l'UKWP (United Kingdom Working Party) en 1994 et pour les nourrissons par Taïeb et Boralevi (2004). (Langan et al. 2020; Lahouel et al. 2020)

Le diagnostic de la dermatite atopique est un examen clinique, repose sur un interrogatoire minutieux sur l'historique de la maladie, les antécédents familiaux, l'évolution de la maladie et l'environnement du patient. Une fois le diagnostic posé des examens complémentaires sont réalisés pour identifier la cause de la maladie (biopsie cutanée, patch test, dosage des IgE) et de calculer la sévérité de la maladie comme le score de gravité SCORAD (Fig.7). (Thomsen 2014)

**SCORAD**  
EUROPEAN TASK FORCE  
DERMATITE ATOPIQUE

Nom  Prénom

Date de Naissance

Date de Visite

**Steroïde local utilisé :**

Puissance (marque)

Quantité/mois

Nombre de poussées/mois

Chiffres entre parenthèses pour enfants de moins de 2 ans

**A : ETENDUE** (indiquer les zones atteintes)

**B : INTENSITE**

CRITERE	INTENSITE	METHODE DE CALCUL
Erythème		<b>CRITÈRES D'INTENSITÉ</b> (surface représentative moyenne) 0 = absent 1 = léger 2 = modéré 3 = sévère
Oedème/papule		
Lésions squameuses ou croûteuses		
Excoriations		
Lichenification		
Sécheresse cutanée*		*La sécheresse cutanée est évaluée sur des zones sèches

**C : SYMPTÔMES SUBJECTIFS**  
**PRURIT + PERTE DE SOMMEIL**

**SCORAD  $A/5 + 7B/2 + C$**

Echelle analogique visuelle (moyenne des 3 derniers jours ou nuits)

Prurit (0 à 10)

Perte de sommeil (0 à 10)

**TRAITEMENT :**

**OBSERVATIONS :**

**Figure 7.** L'indice SCORAD, rapport de consensus du groupe de travail européen sur la dermatite atopique (Thomsen 2014)

### 6. Les complications de la dermatite atopique

L'eczéma atopique peut entraîner des complications, les plus communes comme les surinfections bactériennes (*Staphylococcus aureus*) (Fig.8) ou virales (Herpes : HSV-1), d'autres complications peuvent survenir comme l'érythrodermie syndrome caractérisé par une rougeur généralisée de peau, ou des complications ophtalmologiques (kératoconjonctivite, cataracte) (Hsu *et al.*, 2019; Thomsen, 2014).



**Figure 8.** Enfant atteint d'eczéma surinfecté par *Staphylococcus aureus* (Boguniewicz et Leung 2010)

### Les lichens

#### 1. Définition

Le mot lichen est d'origine grec ''leichên'', d'où sa prononciation « leikhen » qui lèche, car le lichen semble lécher son support, et qui signifiait « lèpre » et « dartre. » selon Chevalier en 2003. Auparavant, les lichens étaient considérés comme des organismes simples, des intermédiaires entre les algues et les champignons mais après la découverte de Schwendener dans ses deux mémoires célèbres en 1867 et 1869, les lichens sont connus comme des organismes composites (Garneau de L'Isle-Adam, 2020; Sipribille *et al.*, 2022).

Les lichens sont des organismes symbiotiques composés généralement d'un partenaire fongique filamenteux hétérotrophe (champignon) appelé mycobionte, et d'un partenaire algal photoautotrophe appelé photobionte qui peut être, soit un chlorobionte eucaryote (algue verte), soit un cyanobionte procaryote (cyanobactérie), parfois entre les trois. Environ 95% des lichens sont bipartites (symbiose entre deux partenaires: mycobionte et chlorobionte), et presque 4% des lichens sont des triparties (symbiose entre trois partenaires: mycobionte, chlorobionte et cyanobionte) (Zachariah et Varghese, 2018).

#### 2. La répartition et la biodiversité des lichens

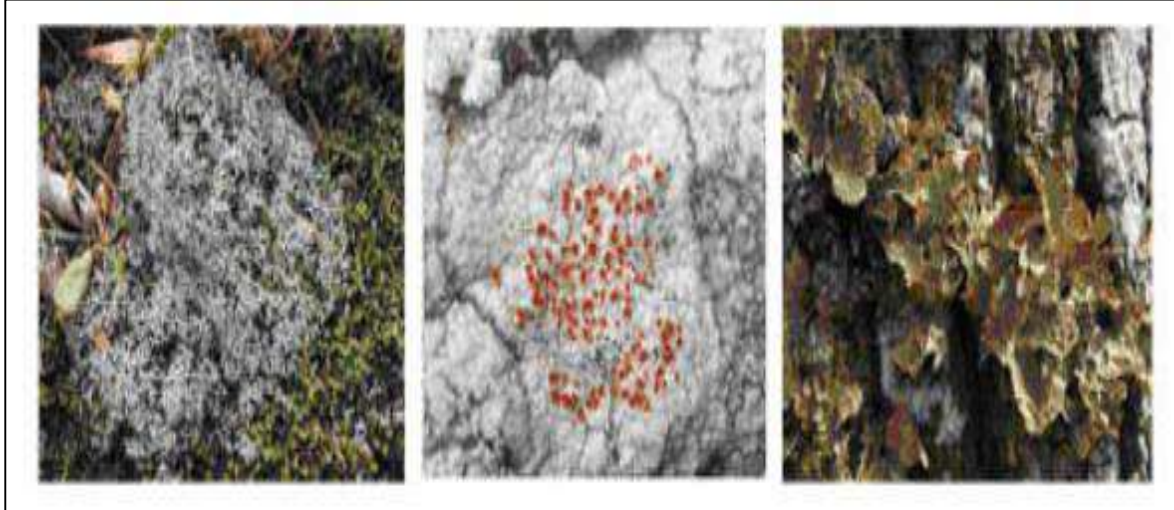
Les lichens contribuent substantiellement à la biodiversité, les plus anciens fossiles de lichens découverts datent d'environ 600 millions d'années. Ils colonisent presque toute la surface de la Terre. Ils vivent dans la plupart des écosystèmes terrestres et aquatiques souvent dans des environnements extrêmes inaccessibles pour la plupart des autres formes de vie comme les régions polaires, arides et tropicales.

En effet, les lichens peuvent s'adapter dans les conditions environnementales difficiles via le phénomène de reviviscence, ils entrent dans un mode de vie ralenti où leur activité métabolique est en pause, pour survivre à de longues périodes de sécheresse et sortent de cette dormance dès que les conditions environnementales sont favorables (humidité suffisante) et reprennent ensuite leur activité métabolique. (De La Torre Noetzel *et al.*, 2018)

Les lichens ont la capacité de s'installer sur des substrats naturels tels que les roches (saxicoles), le sol (terricoles), l'écorce (corticoles), le bois mort (lignicoles), les feuilles (foliicoles), et les mousses (musciholes) (Fig. 9), comme ils peuvent coloniser les substrats



artificiels comme le caoutchouc, le plastique, les métaux ou le verre (Lutzoni et Miadlikowska, 2009; Aprille *et al.*, 2011).



**Figure 9.** Principaux substrats de lichen. Lichens poussant sur leurs substrats naturels. a) sol (*Cladonia rangiformis* Hoffm., types *terricoles*); b) roches (*Caloplaca erythrocarpa* (Pers.) Zwackh, types *saxicoles*); c) écorces d'arbres (*Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm., types *épiphytes*) (Aprille *et al.*, 2011)

### 3. La structure et la morphologie des lichens

Contrairement aux plantes supérieures, les lichens ne possèdent ni racine, ni tige, ni feuille mais un appareil végétatif rudimentaire appelé thalle.

Un thalle de lichen se compose généralement de plusieurs couches : le cortex supérieur et inférieur, une couche d'algues et de médulle (Fig. 10). Les couches diffèrent en épaisseur et sont plus développées chez certaines espèces que chez d'autres. Les hyphes fongiques constituent la majeure partie du thalle; les photobiontes sont des cellules qui ne représentent qu'un petit pourcentage (environ 7 %) du volume total. La structure du thalle des lichens est, dans l'ensemble, moins variable que leur morphologie. Deux structures sont classiquement reconnues: homéomère et hétéromère (Ranković et Kosanić, 2015).

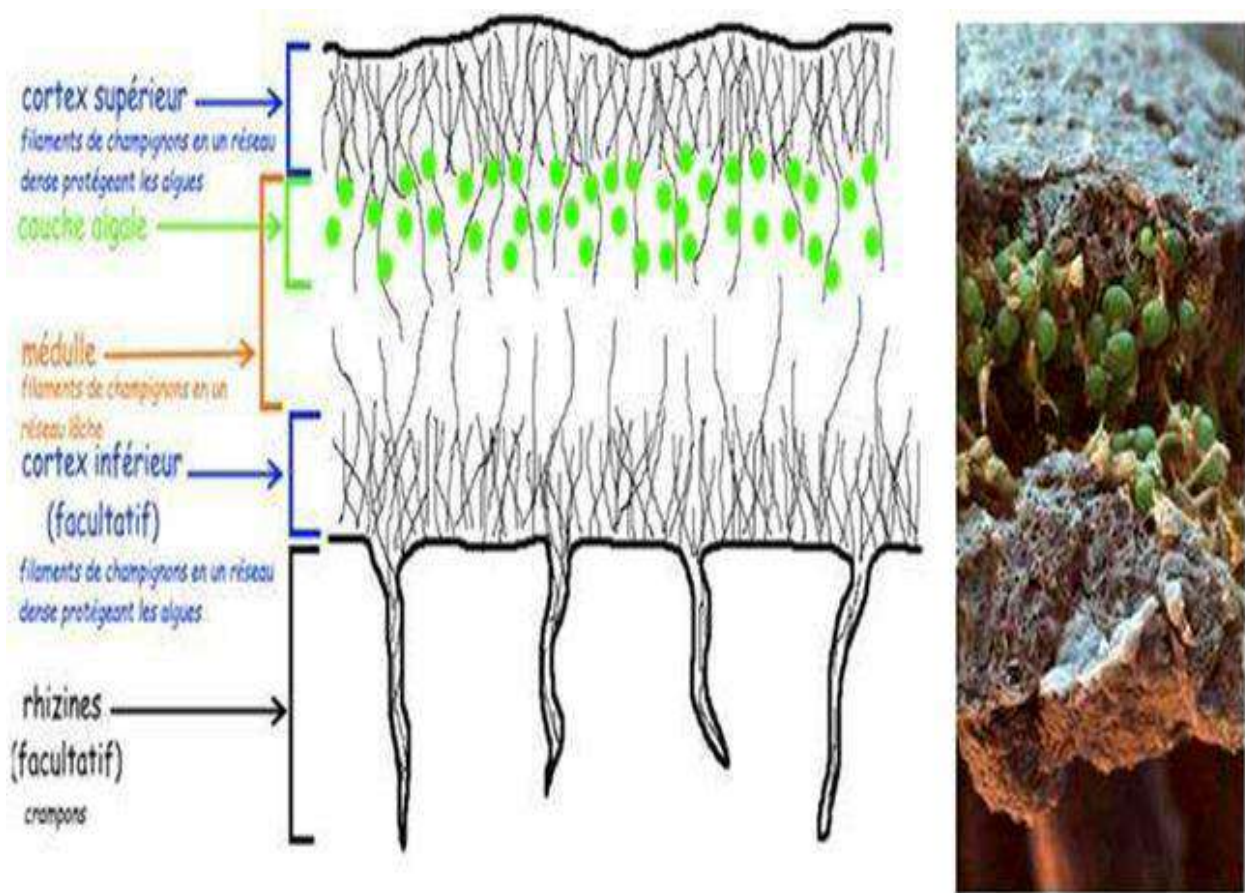


Figure 10. Structure du thalle de lichen

### 3.1. Les différents types de thalles

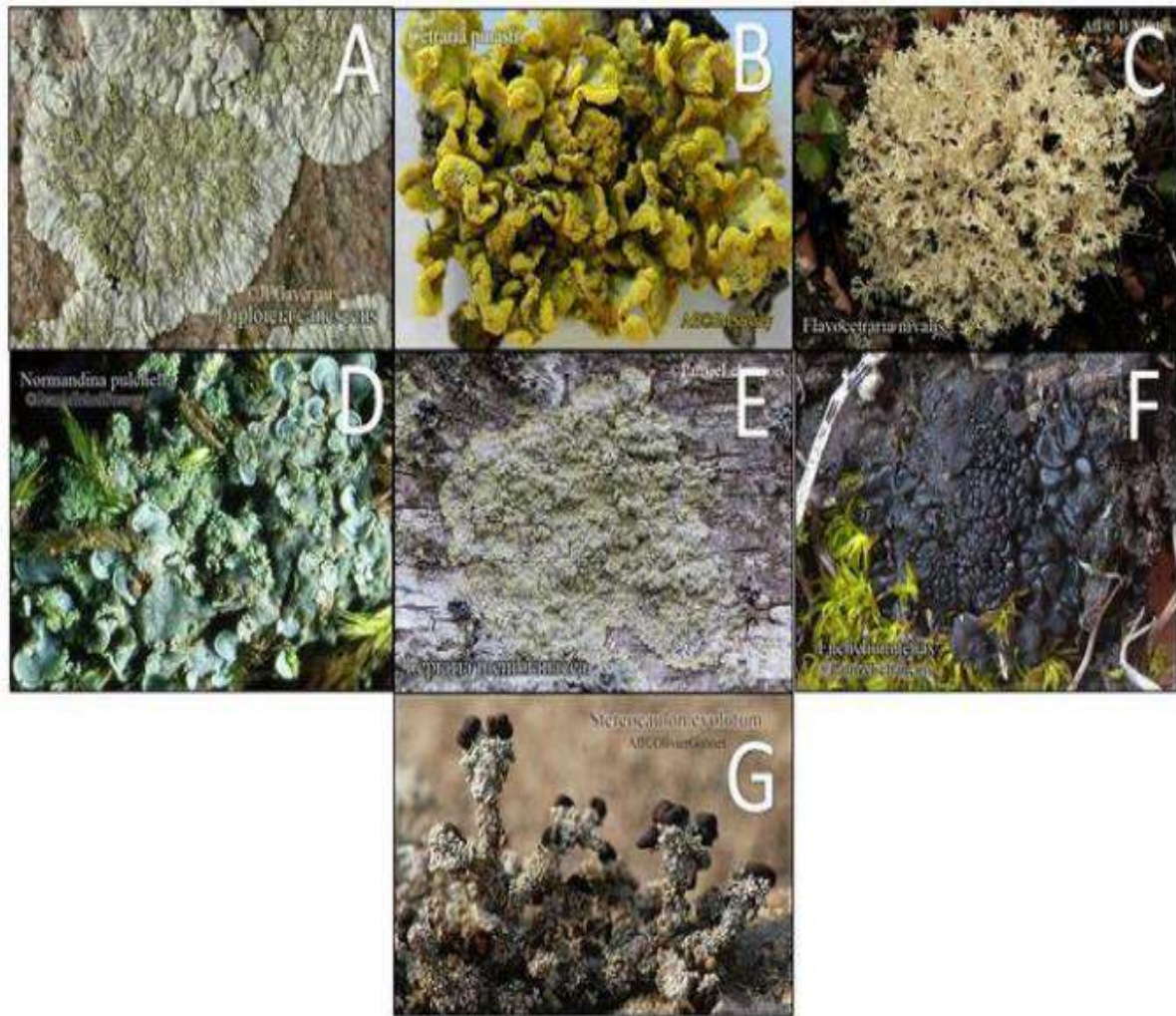
Le lichen est constitué du thalle, appareil végétatif du lichen, d'où leur appartenance aux thallophytes. Le thalle constitue l'essentiel du lichen, il assure sa nutrition, son entretien de la vie et sa reproduction.

La classification des lichens repose sur la morphologie du thalle. Selon la forme, on distingue divers type de thalle :

- **les thalles crustacés** sont les plus communs (90 %), formant des croûtes fortement adhérentes au substrat dans lequel pénètrent des hyphes. Les croûtes peuvent être bien délimitées à la périphérie et être distinctement lobées (thalle placodiomorphe); leur surface peut être continue, fendillée ou nettement fragmentée en petites aréoles. (Fig.11A) ;



- **les thalles foliacés** se représentent sous forme de lames ou de feuilles, ils sont aplatis et pourvus d'un cortex supérieur et inférieur plus ou moins lobé ou découpé. Ils sont généralement fixés au substrat par de petits crampons ou rhizines. Ils se détachent facilement du substrat. (Fig.11B) ;
  
- **les thalles fruticuleux** sont des thalles en lanières ou tiges plus ou moins ramifiées ou dressées. Ils se fixent sur son substrat uniquement par une petite partie appelée crampon. (Fig.11C) ;
  
- **les thalles squamuleux** se présentent sous forme de petites squamules ou écailles pouvant se chevaucher partiellement. (Fig.11D) ;
  
- **les thalles lépreux** ou léproïdes sont formés par une association de granules pulvérulents qui donnent l'impression d'une surface farineuse. Ils se détachent facilement du substrat. (Fig.11E) ;
  
- **les thalles gélatineux** ont une consistance gélatineuse à l'état humide. Leur aspect varie selon les conditions environnementales. À l'état sec, leurs thalles sont noirs, rigides et cassants; à l'état humide, ils s'épaississent et deviennent mous et gélatineux. (Fig.11F) ;
  
- **les thalles complexes** ou thalles composites associant deux thalles différents, un thalle primaire en écaille, au sol et adhère au substrat, sur lequel se développe un thalle secondaire érigé sous forme d'entonnoir. (Fig.11G) (Le Pogam-Alluard, 2016).



**Figure 11.** Illustration des principaux types morphologiques de lichens. **A** – thalle crustacé de *Diploicia canescens*; **B** – thalle foliacé de *Vulpicida pinastri*; **C** – thalle fruticuleux de *Flavocetraria nivalis*; **D** – thalle squamuleux de *Normandina pulchella* ; **E** – thalle lépreux de *Lepraria membranacea*; **F** – thalle gélatineux d'*Enchylium tenax*; **G** – thalle complexe de *Stereocaulon evolutum*. (Le Pogam-Alluard, 2016)

### 3.2. Les organes non sporogènes portés par le thalle

Les organes non sporogènes sont très divers et ont des fonctions vitales importantes. Portés par le thalle, soit sur sa face supérieure où on peut constater des poils, des cils, des papilles, des fibrilles, des nodules ou des cephalodies ; soit sur la face inférieure comme les cyphelles, les pseudocyphelles et les rhizines. Ces organes interviennent dans l'alimentation en eau, en échanges gazeux et dans la protection contre les rayonnements lumineux nocifs (Tiévant, 2001).

### 4. La reproduction de lichen

Les lichens adoptent différentes stratégies pour se reproduire selon deux modes : le mode végétatif (reproduction asexuée) et le mode sexué. (Mouillère-gonnet, 2008).

#### a. La reproduction asexuée

**Les isides** : les lichens produisent des boutures sous forme de boutons ou de cylindres à la surface du thalle qui se détachent facilement du lichen et donnent un nouveau lichen autour du thalle mère.

**Les soralies** : ce sont des fragments légers (soralies) issus de la déchirure de la surface du thalle mère qui vont se libérer et se disperser par le vent afin de donner un nouveau lichen identique au thalle mère. Ces soralies sont un mélange de cellules d'algues et de champignons et ont un aspect granuleux.

#### b. La reproduction sexuée

La reproduction sexuée est assurée par le mycobionte qui forme deux types d'organes spécialisés : les apothécies (forme de cupules très colorées à la surface du cortex) (Fig.12) ou les périthèces (forme d'outres enfoncées superficiellement dans le thalle) dans lesquels se forment des spores qui, en germant, vont redonner un nouveau mycélium. Ce mycélium devra capturer une algue pour former un nouveau lichen. Ce mode de reproduction est très aléatoire et rare (Mouillère-gonnet, 2008).



**Figure 12.** Formes sexuée et asexuée chez les lichens (Lü *et al.*, 2011; Thell *et al.*, 2014).

5. La symbiose lichénique

Les échanges entre les deux organismes constituant le lichen se déroulent de la manière suivante :

Chacun des deux partenaires de lichens a un rôle important dans la survie de l'autre. Le champignon a un rôle de fixation sur le substrat grâce aux rhizines et assure la protection physique à l'algue ou à la cyanobactérie contre les diverses agressions tels que les rayonnements solaires nocifs. Il fournit aussi au photosymbiote (algue) l'eau et les sels minéraux, des vitamines comme la vitamine C et les antibiotiques nécessaires à leur développement.

L'algue ou la cyanobactérie, quant à elle, par son activité photosynthétique, va fournir au champignon la matière organique nécessaire au champignon, notamment de la vitamine B et des polyols, substances dérivées des sucres. Chez les cyanobactéries, le carbone fixé est plutôt cédé au champignon sous forme de glucose. Les cyanobactéries sont aussi capables de fixer l'azote atmosphérique, cédé au champignon sous forme d'ammonium (Van-Haluwyn *et al.*, 2014). (Fig.13)

L'association champignon-algue présente une grande originalité où le champignon produit des substances lichéniques (ce qui n'est pas le cas du champignon seul) qui s'accumulent dans la médulle et peuvent représenter jusqu'à 40% du poids sec (Mouillèregonnet, 2008).

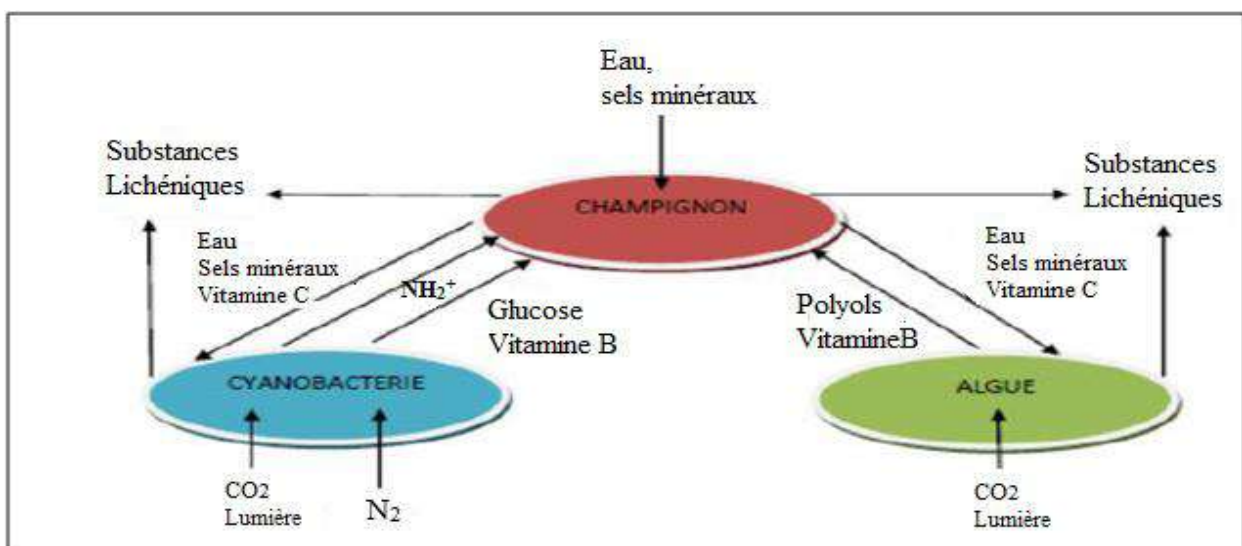


Figure 13. Schéma des échanges entre les deux organismes constituant le lichen (Van-Haluwyn *et al.*, 2014)



6. Les métabolites secondaires de lichens

Les lichens peuvent produire deux groupes de métabolites, primaires (intracellulaires) et secondaires (extracellulaires). Les métabolites primaires comprennent les protéines, des polyols, des saccharides, caroténoïdes et des vitamines, qui sont liés dans les parois cellulaires et les protoplastes. La plupart d'entre eux sont solubles dans l'eau et peuvent être extraits à l'eau bouillante. Certains métabolites primaires sont produits par les champignons et d'autres par le partenaire photosynthétique.

Les composés organiques présents dans les lichens sont des métabolites secondaires allant de 10 % à 30% du poids sec du thalle. Il existe plus de 800 métabolites secondaires qui sont d'origine fongique et sont solubles dans la plupart des solvants organiques, mais pas dans l'eau.

Les métabolites secondaires du lichen sont dérivés de trois voies chimiques : la voie acétate-polymalonate, la voie de l'acide shikimique et la voie de l'acide mévalonique (Ranković et Kosanić, 2015) (Fig.14).

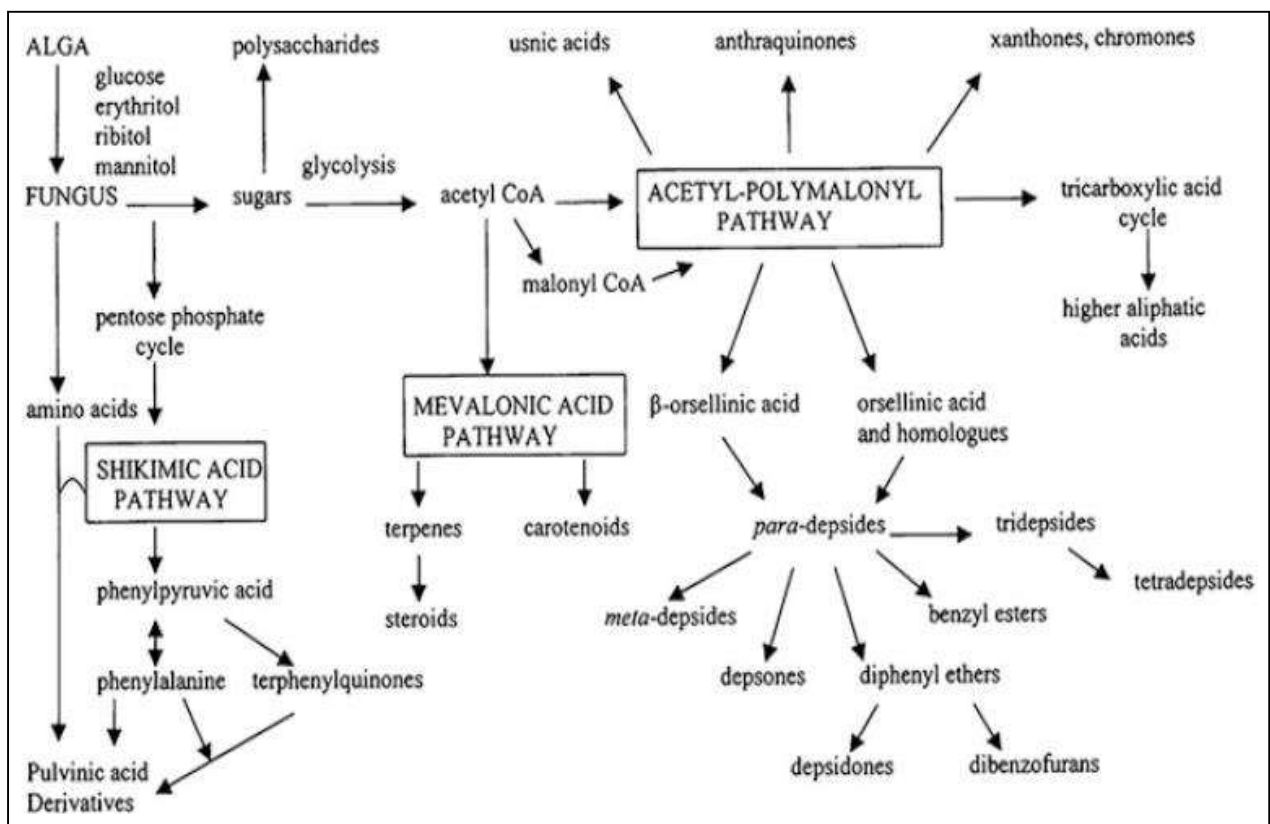


Figure 14. Les voies de biogenèse des métabolites secondaires lichéniques. (Ranković et Kosanić, 2015)

### 6.1. La voie de l'acétate polymalonate

La voie de l'acétate polymalonate conduit à la synthèse des produits aromatiques tels que les depsides, les depsidones, les depsones, les dibenzofuranes, les anthraquinones, les xanthones, les chromones, les acides aliphatiques et les dérivés de l'acide orsellinique. (Fig.15) (Goga *et al.*, 2020).

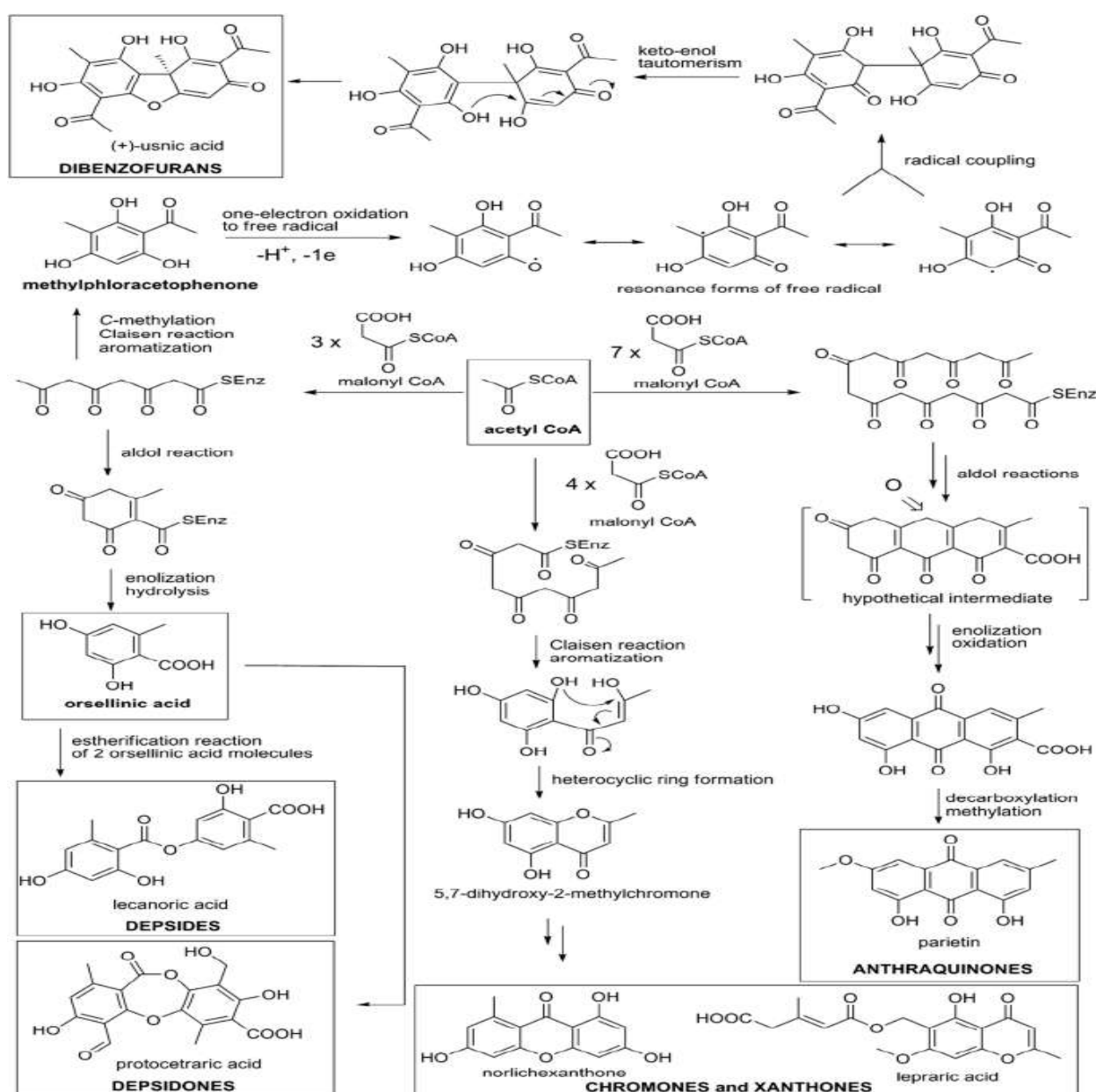


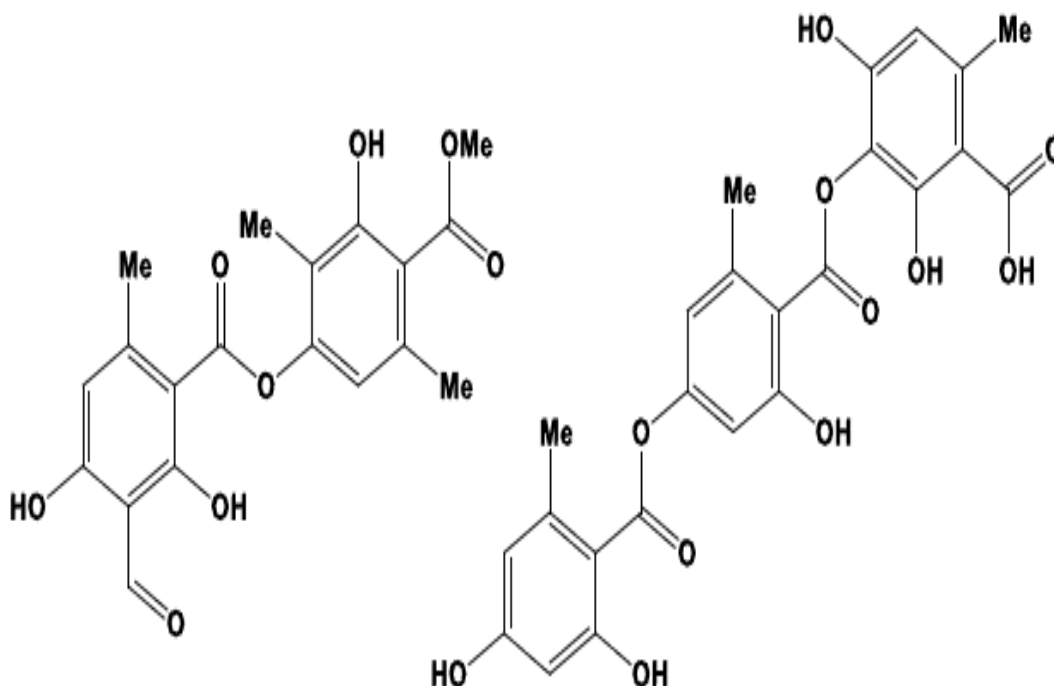
Figure 15. Classe de substances lichéniques dérivées par la voie d'acétate polymalonate.

(Goga *et al.*, 2020)

### 6.1.1. Les depsides

Parmi les depsides, les didepsides comme l'atranorine et les tridepsides (exemple: acide lasallique) sont issus du couplage entre deux ou trois unités d'acide orsellinique par estérification du groupement carboxylique d'une molécule avec le groupement hydroxyle d'une seconde molécule (Fig.16). Cet hydroxyle peut être en *para* ou en *meta* du deuxième noyau d'où la nomenclature de *para*- et *meta*-depsides.

Les depsides ne sont pas spécifiques aux lichens et sont également retrouvés dans certaines plantes de la famille des Lamiacées, des Géraniacées ou des Papavéracées (Ranković et Kosanić, 2015).



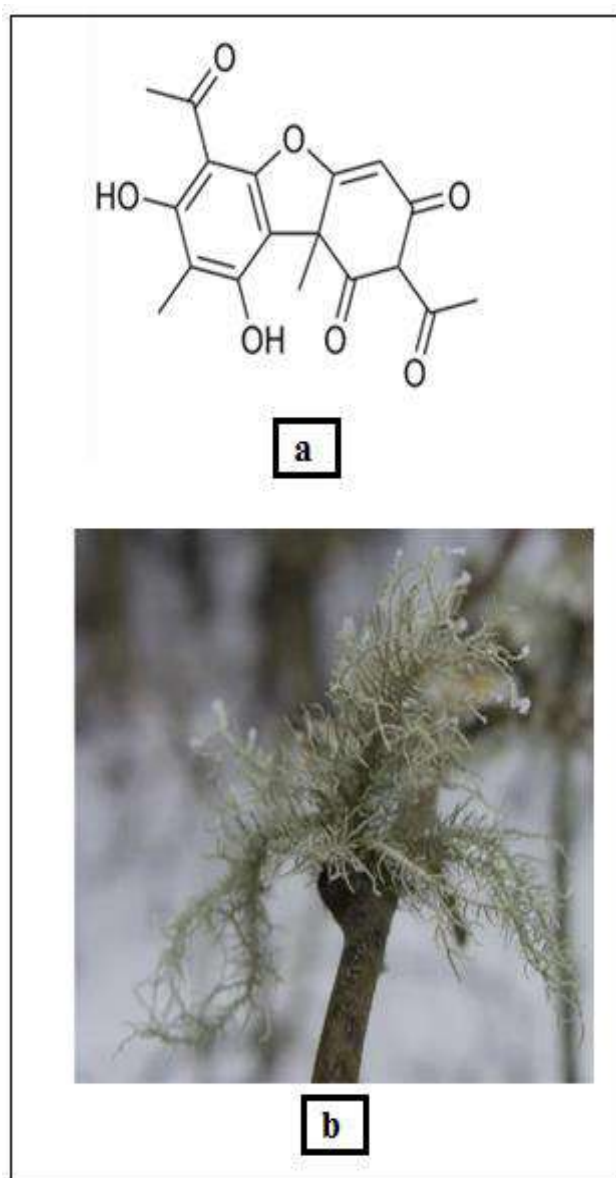
**Figure 16.** Structure d'un didepside (atranorine) et d'un tridepside (acide lasallique)  
(Ranković et Kosanić, 2015)

### 6.1.2. Les dibenzofuranes

Les dibenzofuranes sont des composés organiques aromatiques hétérocycliques avec deux cycles benzéniques fusionnés à un cycle furane central. En tant que métabolites secondaires, les unités phénoliques sont issues de la cyclisation de type acide orsellinique. Les

dibenzofuranes semblent se former par couplage carbone-carbone et cyclodéshydratation de deux de ces unités d'acide phénolique dérivées d'acétate-polymalonate (Goga *et al.*, 2020).

L'acide usnique parmi les composés les plus caractéristiques des lichens, c'est un dérivé de dibenzofurane de formule  $C_{18}H_{16}O_7$  présent chez plusieurs espèces de lichens. Il s'agit des pigments jaunes de saveur amère produits dans le cortex supérieur de nombreuses espèces de lichens. Ces pigments sont présents que chez les lichens. (Goga *et al.*, 2020)



**Figure 17.** Structure de l'acide usnique (a) de lichen *Usnea sp.*(b) (Goga *et al.*, 2020)



6.2. La voie de l'acide shikimique

La voie de l'acide shikimique permet la synthèse d'acides aminés aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) qui, chez les plantes, sont les précurseurs des flavonoïdes, des coumarines, ou encore des alcaloïdes (Fig. 18) (Goga *et al.*, 2020.)

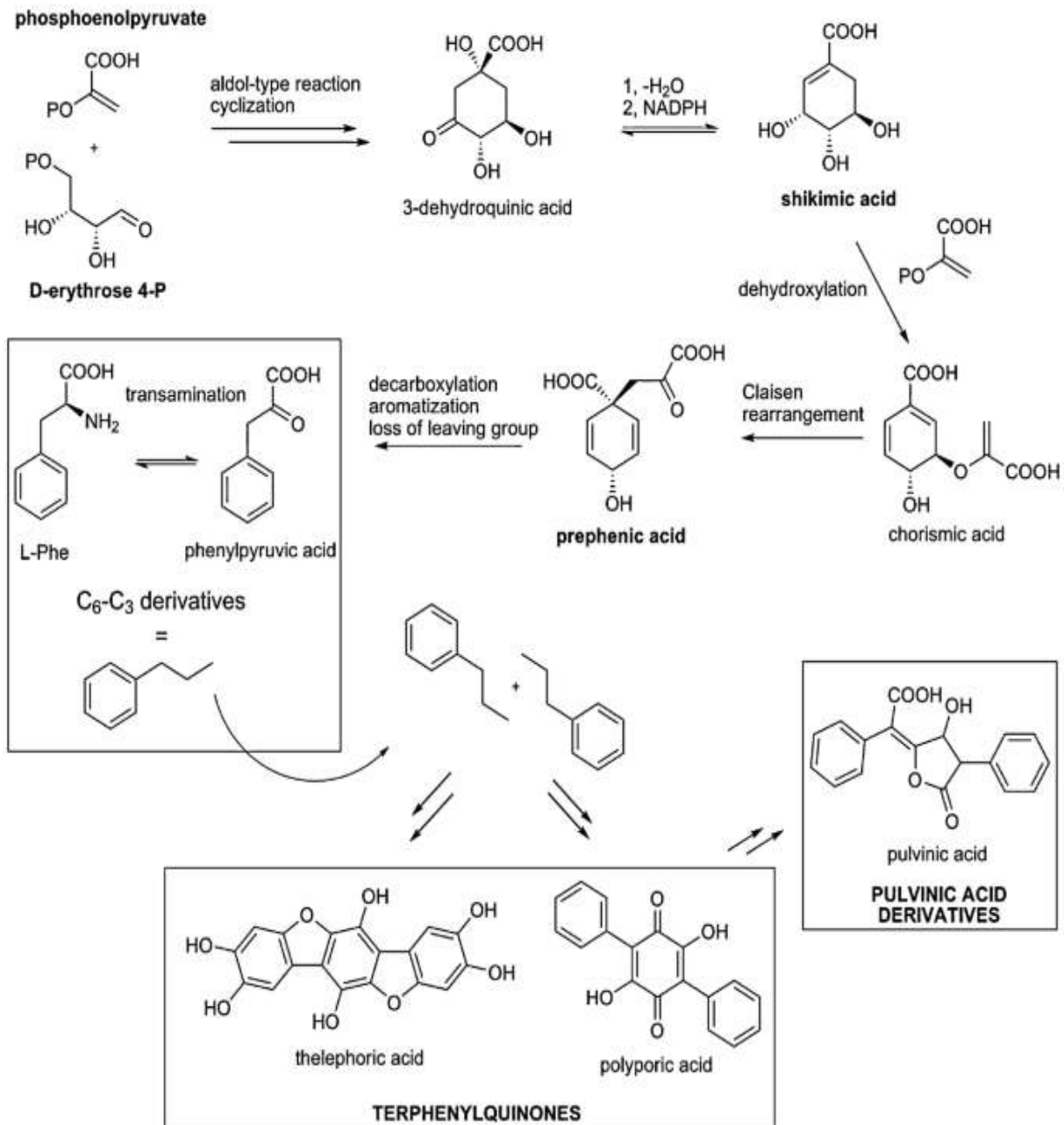


Figure 18. Classe de substances lichéniques dérivées par la voie shikimique (Goga *et al.*, 2020)

6.3. La voie de l'acide mévalonique

La voie de l'acide mévalonique conduit essentiellement à la synthèse des terpènes, stéroïdes et caroténoïdes. Pour la plupart, ils ne sont pas spécifiques des lichens (Fig.19) (Goga *et al.*, 2020).

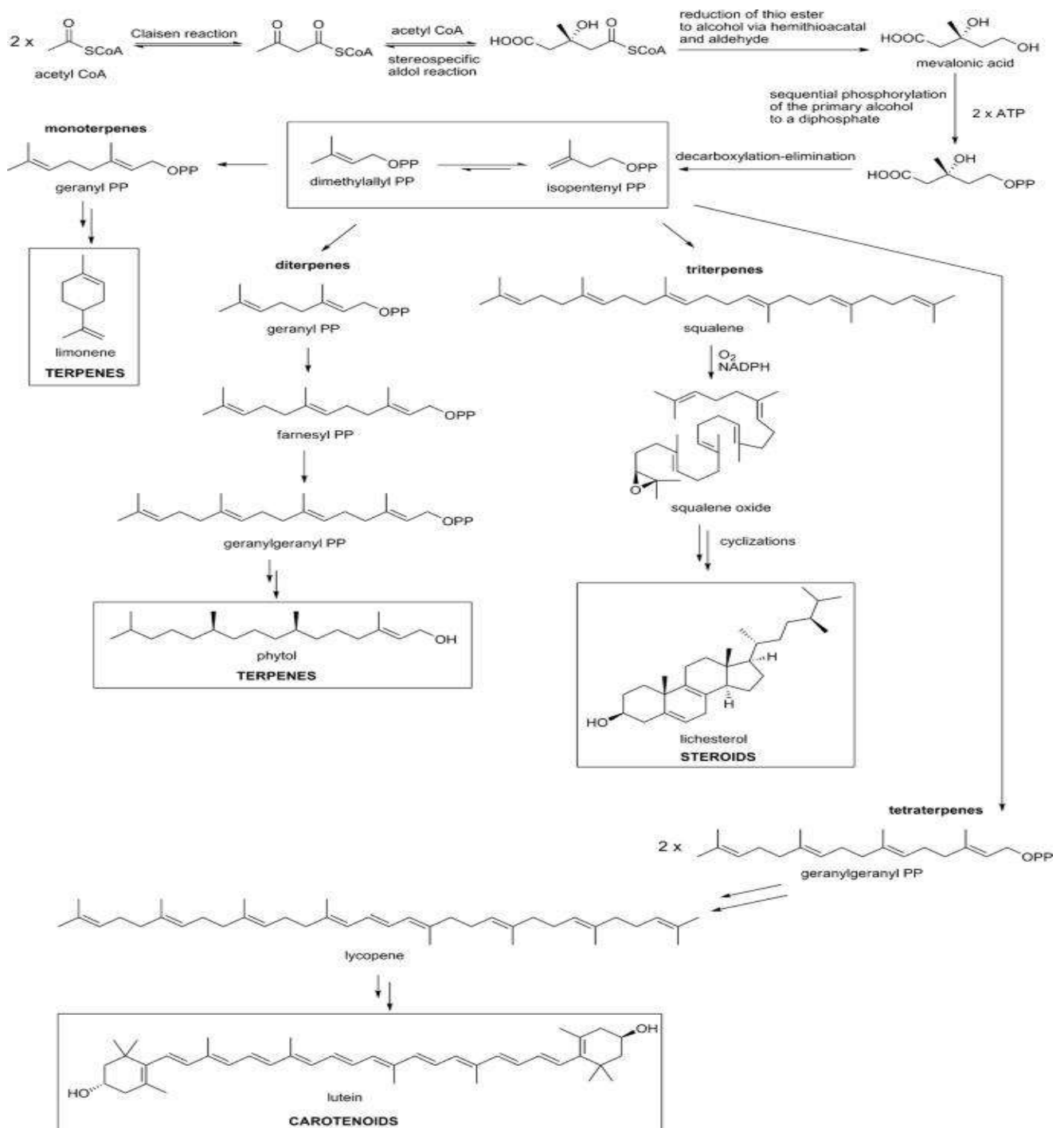


Figure 19. Classe de substances de lichen dérivées par la voie de l'acide mévalonique (Goga *et al.*, 2020).

### 7. L'intérêt des lichens

Les lichens sont utilisés depuis l'antiquité comme des plantes médicinales et pour de multiples usages alimentaires ou artisanaux :

- **les usages alimentaires** : certains lichens constituent un fourrage pour des animaux tels que les mammifères alpins mais c'est essentiellement dans la nutrition du Renne, le Caribou. Les mêmes lichens et notamment *Cetraria islandica* sont utilisés dans les pays nordiques à la nourriture des porcs, des chevaux et des vaches. D'autres peuvent également être une source de glucose et dans certaines régions tels que le Japon et le Canada ils sont consommés comme aliment pour l'homme (Ozenda, 2000);

- **les usages industriels** : les huiles essentielles de certaines espèces de lichens sont utilisées pour la fabrication de parfums et de savons. Les lichens sont également connus pour la fabrication artisanale de teintures. Ils sont utilisés aussi dans la décoration des tables, la confection des maquettes où ils représentent des arbres et dans la fabrication des couronnes funéraires dans certains pays. Entre 8000 et 9000 tonnes de lichens sont utilisés chaque année pour la production des parfums (Ozenda, 2000);

- **l'usage en bio-indication** : de nombreuses espèces de lichens sont utilisées pour indiquer les caractères physiques ou chimiques d'un milieu donné. Ils permettent d'étudier la chimie et la stabilité des sols, la hauteur moyenne de l'enneigement, le degré de pureté de l'atmosphère, etc. (Ozenda, 2000);

- **les usages médicaux** : les métabolites secondaires des lichens présentent des propriétés antimicrobiennes, anti oxydantes, anti-inflammatoires, cytotoxiques, analgésiques, antipyrétiques et antivirales et pourraient constituer des sources potentielles de produits chimiques utiles sur le plan pharmaceutique.

Les depsidones, les acides physodique et physodalique, empêchent la formation de métabolites réactifs en bloquant les systèmes d'oxydation présents dans la fraction microsomale hépatique. L'acide ursolique inhibe la croissance des cellules de carcinome épidermoïde humain en influant sur l'activité de la tyrosine kinase.



L'acide usnique, métabolite secondaire des lichens le plus étudié, est une substance très active connue pour son effet analgésique, antimittotique sur des cellules tumorales humaines, et antimicrobien (Ozenda, 2000).



**Figure 20.** Produits de lichens comestibles et médicinaux. **A** : Commercialisation des lichens en Chine ; **B** : Collecteurs de lichens dans les zones minoritaires du Yunnan en Chine; **C** : produit pharmaceutique à base de lichen; **D** : Plat de lichen; **E** : produit nutritionnel de lichen.



# *Partie expérimentale*

### 1. Le matériel végétal

#### 1.1. Le lichen *Parmotrema hypotropa* (Nyl.) Hale

Le lichen a été collecté de région d'El kala (Algérie) en septembre 2019. Le spécimen a été identifié par Dr Philippe Clerc du Conservatoire et Jardin botanique de la ville de Genève, Chambésy, Suisse comme étant *Parmotrema hypotropa* (Nyl.) Hale. (Fig. 21)

*Parmotrema*, genre de lichen appartenant à la famille des *Parmeliaceae*, contient environ 300 espèces, parmi eux : *Parmotrema hypotropa* (Nyl.) Hale.

*Parmotrema hypotropa* se caractérise par un thalle foliacé avec une surface supérieure de couleur blanche à gris blanchâtre avec des macules disposées en réseau uniquement visible sous la loupe, ainsi que des lobes de 2 à 7mm de largeur. La face inférieure du thalle est noire ou brun foncé sur le bord des jeunes lobes, cette face se caractérise par la présence des rhizines longues, élancées, noires, le plus souvent simples, rarement peu ramifiées.



**Figure 21.** *Parmotrema hypotropa* (Nyl.) Hale

### **Classification systématique:**

Règne : Fungi

Division : Ascomycota

Classe : Ascomycetes

Ordre : Lecanorales

Famille : Parmeliaceae

Genre : *Parmotrema* (A.Massal. 1860)

Espèce: *Parmotrema hypotropa* (Nyl.) Hale

### **1.2. La préparation des extraits du lichen *Parmotrema hypotropa***

Le lichen *P. hypotropa* a été séché à l'abri de la lumière puis broyé en poudre fine qui sera utilisée pour la préparation de deux types d'extraits : un extrait de dichlorométhane et un extrait éthanolique.

L'extraction a été réalisée selon la méthode de Plaza *et al.* (2014), 10g de *P.hypotropa* en poudre ont été macérés dans 100 mL de dichlorométhane ou éthanol pendant 24 h à une température ambiante (22°C). Le surnageant est ensuite récupéré, filtré et placé dans un évaporateur rotatif à 40 °C.

- Le rendement d'extraction (RET%) a été calculé comme suit :

$$\text{RET}\% = \frac{\text{masse de lamatière sèche}}{\text{masse de la matière végétale}} * 100$$

## **2. La caractérisation phytochimique**

### **2.1. Le dosage des polyphénols totaux**

#### **2.1.1. Principe de la réaction**

Les composés phénoliques sont oxydés par le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes bleus de tungstène ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) et de molybdène ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). La coloration bleue produite



dont l'absorption maximale à 765 nm est proportionnelle à la quantité de phénols totaux présents dans les extraits (Müller *et al.*, 2010).

### **2.1.2. Méthode**

20 µL des extraits (éthanolique et dichlorométhanique) dilués dans du DMSO (1mg/mL) ont été ajoutés à 100 µL de réactif Folin-Ciocalteu et 75 µL de solution de carbonate de sodium (à 75%). Après 2 heures de réaction à l'obscurité ; l'absorbance est mesurée à 765 nm. La teneur totale en composés phénoliques est exprimée en µg d'équivalent acide gallique/mg d'extrait (µg GAE/mg).

## **2.2. La teneur totale en flavonoïdes**

### **2.2.1. Principe**

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe d'acide stable de couleur jaunâtre entre l'aluminium ( $Al^{+3}$ ) et les flavonoïdes.

### **2.2.2. Méthode**

Un volume de 50 µL d'extraits dilués dans le DMSO (1mg/mL) a été ajouté à 130µL de DMSO, 10µL de nitrate d'aluminium ( $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ) à 10% et 10µL d'acétate de potassium aqueux 1M( $CH_3COOK$ ). Après 40 min à température ambiante (22°C), l'absorbance est lue à 415 nm (Topçu *et al.*, 2007). La teneur totale en flavonoïdes est exprimée en µg d'équivalent de quercétine/mg (µg QE/mg).

## **2.3. La détermination de la concentration de l'acide usnique dans les extraits de lichen *P. hypotropa***

L'acide usnique, dibenzofurane naturel de formule  $C_{18}H_{16}O_7$ , est l'un des métabolites secondaires le plus abondant et le plus étudié chez les lichens. Il est produit par le mycobionte et stocké dans le cortex. L'acide usnique est de couleur jaune, lipophile et chiral avec deux énantiomères où la forme +(-) acide usnique est la forme la plus répandue chez les espèces de lichens. Les vertus thérapeutiques des lichens (antimicrobiens, antioxydants, anticancéreux) sont en majorité attribuées à l'acide usnique (Molnár et Farkas, 2010).

Dans cette investigation, sera qualifiée la concentration de l'acide usnique pour les deux extraits.



### **2.3.1. Principe**

La concentration de l'acide usnique est déterminée par la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou plusieurs composés d'un mélange dans le but de les identifier ou les quantifier. La chromatographie en phase liquide à haute performance a deux phases :

- a. la phase mobile**, est le vecteur, qui déplace le soluté (les composés à séparer)
  
- b. la phase stationnaire**, est un support sous forme de tube appelé colonne chromatographique, recouvert d'un gel qui a la capacité de retenir les molécules de la phase mobile (solutés). Le résultat sera illustré sous forme de pics.

### **2.3.2. Méthode**

#### **2.3.2.1. Préparation des échantillons**

Une quantité de 0,05 g de chaque extrait (dichlorométhane et éthanol) ont été ajoutés à 10 mL de DMSO, (la solution a été filtrée avant l'analyse par un filtre de 0,45  $\mu\text{m}$ ) ensuite 20  $\mu\text{L}$  de chaque extrait sont injectés dans le système HPLC.

#### **2.3.2.2. Préparation de l'acide usnique (standard), et les échantillons**

La solution d'acide (+/-) usnique (1mg/mL) a été préparée avec de l'acétone, puis sept (7) différentes dilutions de la solution mère ont été utilisées pour obtenir des courbes d'étalonnage par analyse de régression linéaire.

0.05 g de chaque extrait de *P.hypotropa* a été ajouté à 10 mL de DMSO, la solution est récupérée après une filtration à 0.45  $\mu\text{m}$ , ensuite 20  $\mu\text{L}$  de cette solution a été injecté pour l'analyser par HPLC.

### 2.3.2.3. Les conditions analytiques :

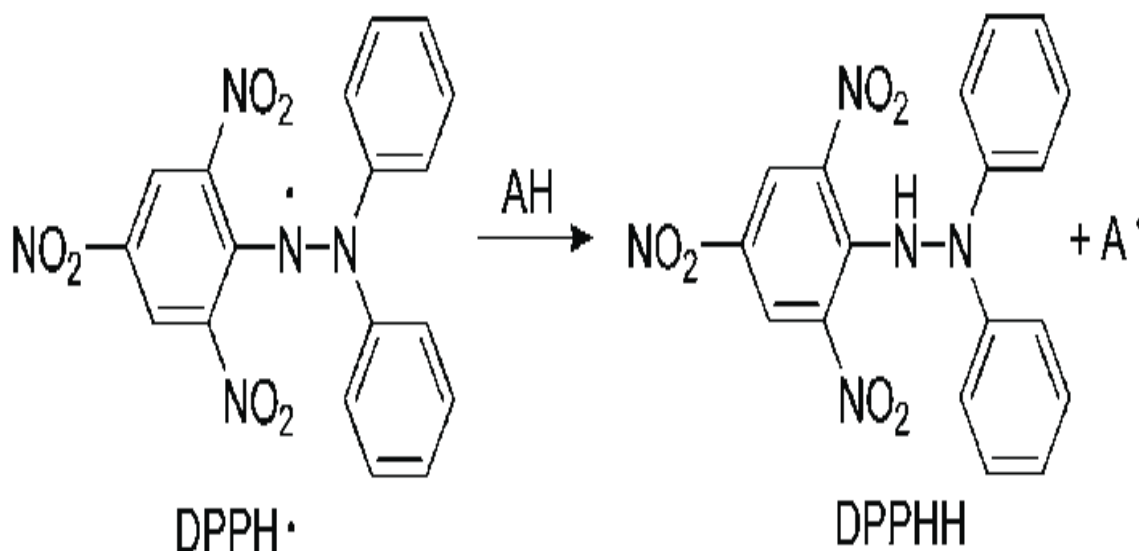
L'analyse a été effectuée sur un système Agilent 1220 Infinity Lc équipé d'un détecteur de matrice de diodes, une colonne C 18 en phase inverse. La phase mobile A est composée d'un mélange de méthanol et de tampon phosphate pH 7,4 (70:30 v/v) avec un débit de 0,8 mL/min pour détecter l'acide usnique à 245 nm. 20 µl de chaque extrait est ensuite injecté (dans les mêmes conditions) afin de détecter la présence d'acide usnique par une comparaison des temps de rétention avec le standard pur ; chaque analyse a été effectuée en 3 répétitions (Cansaran *et al.*, 2007).

## 3. L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits

### 3.1. Le test de piégeage de DPPH

#### 3.1.1. Principe

Le DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe la lumière à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le DPPH· est réduit en un composé de couleur jaune (Musa *et al.*, 2013).



**Figure 22.** La réaction du DPPH avec un anti oxydant (A) (Musa *et al.*, 2013)

### 3.1.2. Méthode

L'activité antioxydante DPPH (6 mg /100 mL de méthanol) est déterminée selon la méthode de Gali et Bedjou (2019) qui consiste à mélanger dans une microplaque de 96 puits, un volume de 160  $\mu\text{L}$  de la solution DPPH avec 40  $\mu\text{L}$  d'extrait de dichlorométhane ou d'éthanol (4 mg/mL) à différentes dilutions (12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu\text{g/mL}$ ). Après une incubation de 30 min à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée à 517 nm.

Le pourcentage d'inhibition est calculé par l'équation suivante :

$$A(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A% : le pourcentage d'inhibition,  $A_0$  : l'absorbance du control négatif.  $A_1$  : l'absorbance d'extrait ou du standard.

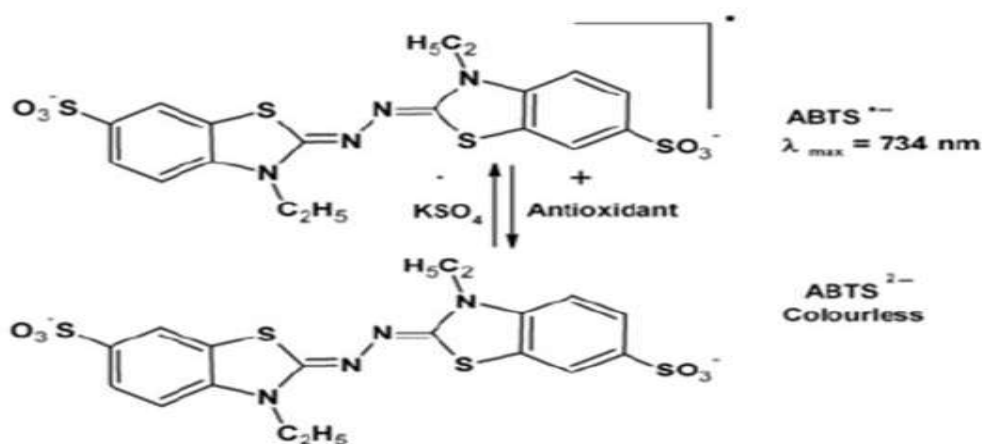
La valeur  $\text{IC}_{50}$  correspond au résultat de la concentration d'extrait à 50% d'inhibition.

Les résultats ont été comparés aux standards antioxydants BHA (butylatedhydroxyanisole), BHT (butylatedhydroxytoluene) et l'acide ascorbique.

## 3.2. Le test de piégeage d'ABTS

### 3.2.1. Principe

ABTS<sup>•+</sup> est un cation radicalaire formé par oxydation en présence de potassium pour donner une solution en vert bleu. Ce test est basé sur la neutralisation d'ABTS<sup>•+</sup>.



**Figure 23.** Principe de neutralisation d'ABTS<sup>•+</sup> par les antioxydants (Hillemane et al, 2012)

### **3.2.2. Préparation de la solution ABTS**

La solution ABTS est préparée par le mélange de 7 Mm d'ABTS dans l'eau distillée avec une solution de persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ , 2.45 Mm). Le mélange réactionnel est incubé à une température ambiante (22°C) et à l'abri de la lumière, pendant 16 heures.

La solution ABTS est obtenue en diluant la solution mère jusqu'à obtention d'une absorbance de  $0.700 \pm 0.025$  à 734 nm.

### **3.2.3. Méthode**

160µL de la solution préparée sont rajoutés à 40 µL d'extrait (dichlorométhane ou éthanol) à différentes concentrations (12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/mL). Après 10 min d'incubation, la lecture des absorbances se fait à 734 nm (Mazouz *et al.*, 2020).

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$A(\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A% : le pourcentage d'inhibition,  $A_0$  : l'absorbance du control négatif.  $A_1$  : l'absorbance d'extrait ou du standard.

La valeur  $IC_{50}$  correspond au résultat de la concentration d'extrait à 50% d'inhibition. Les résultats ont été comparés aux standards antioxydants BHA (butylatedhydroxyanisole), BHT (butylatedhydroxytoluene) et l'acide ascorbique.

## **3.3. L'inhibition de blanchiment de la $\beta$ -carotène**

### **3.3.1. Principe de la réaction**

Dans ce test l'activité antioxydante des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de dégradation oxydatif du  $\beta$ -carotène par l'auto-oxydation de l'acide linoléique.

### **3.3.2. Méthode**

L'inhibition de blanchiment de  $\beta$ -carotène par les extraits de *P. hypotropa* est mesurée selon la méthode de (Boussadia *et al.*, 2020).

0,5 mg de  $\beta$ -carotène est dissout dans 1 mL de chloroforme, puis 25  $\mu$ L d'acide linoléique et 200 mg de tween-40 sont rajoutés afin d'obtenir un mélange émulsionnant. Après évaporation sous vide du chloroforme, 50 mL de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) sont ajoutés sous agitation vigoureuse et l'absorbance de la solution est ajustée par du peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  à 0,8-0,9 à 470 nm. Un volume de 160  $\mu$ L de solution de  $\beta$ -carotène est ajouté à 40  $\mu$ L des échantillons testés ou des standards.

L'absorbance est mesurée immédiatement à 470 nm ( $t = 0$  min) puis après incubation pendant 120 min à 45 °C. Le BHA et le BHT sont utilisés comme standards.

Le pourcentage d'inhibition (A%) est calculé selon la formule suivante :

$$A (\%) = [1 - (A(t=0) - A(t=120)) / (AC(t=0) - AC(t=120))] \times 100$$

A (%) : le pourcentage d'inhibition.

A (t=0) : la valeur d'absorbance des échantillons testés à 0 min.

A (t=120) : la valeur d'absorbance des échantillons après 120 min d'incubation.

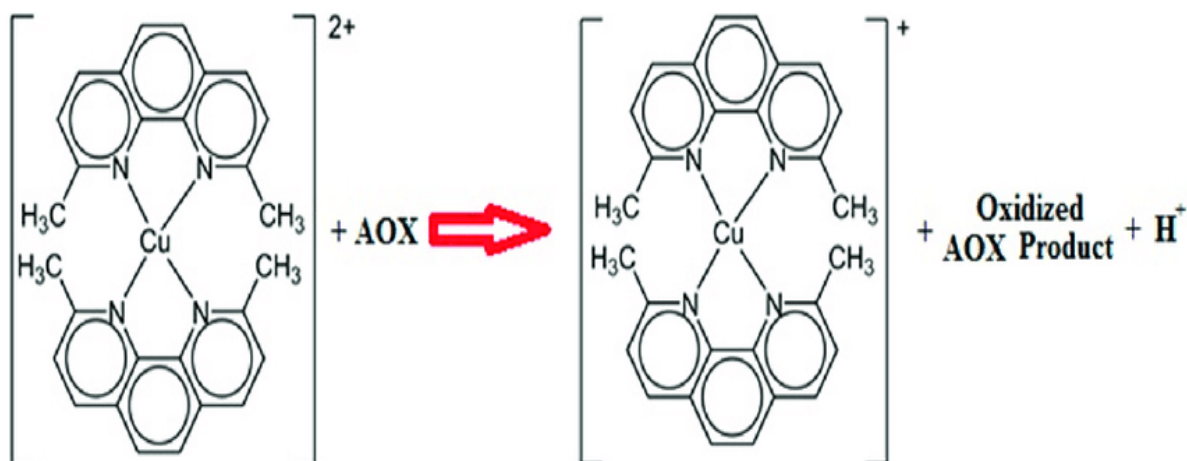
AC (t=0) : la valeur d'absorbance du contrôle négatif (DMSO sans échantillon) à 0 min.

AC (t=120) : la valeur d'absorbance du contrôle négatif à 120 min.

### 3.4. Le test de la réduction du complexe cuivre-neocuproine (CUPRAC)

#### 3.4.1. Principe

La méthode est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance accrue du complexe néocuproine (NC), cuivre ( $CU^{+2}$ ) «  $NC^2-CU^{+2}$  ». En présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-neocuproine de couleur bleu est réduit générant une couleur jaune orangé mesurable à une longueur d'onde de 450 nm.



**Figure 24.** Principe de réduction du complexe cuivre-neocuproïne (CUPRAC) (Apak et al, 2014).

### 3.4.2. Méthode

Dans une microplaque de 96 puits, 40  $\mu\text{L}$  d'extraits (4mg/mL) à différentes dilutions ont été additionnés a 10 mM de  $\text{CuCl}_2$  (50  $\mu\text{L}$ ), 50  $\mu\text{l}$  de néocuproïne (7,5 mM dans de l'éthanol) et 60 $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  1M. Après 1 heure d'incubation à température ambiante (22°C), l'absorbance est mesurée à 450 nm (Apak *et al.*, 2008).

BHA, BHT et l'acide ascorbique sont utilisés comme standards. Les valeurs  $A_{0.5}$  sont calculées à partir des courbes d'absorbance, où  $A_{0.5}$  est la concentration de l'antioxydant pour laquelle l'absorbance vaut 0,5. L'indice  $A_{0.5}$  est donné en  $\mu\text{g/mL}$ .

## 4. Le test de cytotoxicité aiguë sur les larves d'*Artemia salina*

### 4.1. Principe

L'évaluation de la cytotoxicité sur les larves d'*Artemia salina* est un outil utile pour évaluer la toxicité préliminaire des extraits de plantes. Ce test est un moyen efficace, peu coûteux et rapide pour la détection des composés toxiques. L'*Artémia salina* est une espèce de petits crustacés vivant dans les lacs salés et dans les environnements hypersalins, elle est utilisée pour tester l'activité cytotoxique de divers extraits végétaux ainsi que pour évaluer l'activité toxique des mycotoxines.



**Figure 25.** Larve *Artemia salina* (Arulvasu et al, 2014)

#### **4.2. Méthode**

La cytotoxicité de l'extrait de dichlorométhane et l'extrait éthanolique de *P.hypotropa* a été évaluée à l'aide d'un essai de létalité sur les larves d'*Artemia salina* (Mouffouk *et al.*, 2020). Les œufs d'*Artemia salina* sont incubés dans l'eau de mer (70%) jusqu'à l'éclosion des jeunes larves (48 heures), ensuite 100 µL de l'extrait à différentes concentrations (1000, 500, 250, 125 µg/mL) sont ajoutés aux tubes contenant 10 larves d'*A.salina* et le volume total est ajusté jusqu'à 5 mL avec l'eau de mer à 70% (trois tubes ont été préparés pour chaque concentration d'extrait). Les larves témoins ont été placées dans du DMSO avec les mêmes concentrations de l'extrait. Après 24 h d'incubation sous éclairage les tubes ont été examinés sur un fond éclairé et le nombre moyen de larves ayant survécu dans chaque tube a été déterminé.

Le pourcentage de mortalité a été calculé à chaque concentration selon l'équation suivante :

$$\text{Mortalité}\% = \frac{\text{nombre de décé de larves}}{\text{nombre totale de larves}} \times 100$$

Le test est considéré valide si le pourcentage de mortalité des témoins est inférieur à 5 jusqu'à 20%. La concentration létale à 50% (CL<sub>50</sub>) a été déterminée à partir de la courbe de régression tracée par les taux de mortalité à différentes concentrations.

## 5. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits

### 5.1. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro*

#### 5.1.1. L'Inhibition de la dénaturation de BSA par la chaleur

##### 5.1.1.1. Principe

Le test repose sur l'évaluation de la capacité des extraits à inhiber la dénaturation de l'albumine de sérum bovin (BSA) provoquée par la chaleur (72°C) (Kandikattu *et al.*,2013).

##### 5.1.1.2. Méthode

0.5mL de chaque concentration des extraits (150, 250, 500, 1000µg/mL) ou du standard (diclofénac sodique) ont été mis dans un tube stérile avec 0.5 mL de solution de BSA 0.2% préparée dans le Tris HCl (pH : 6,6 ; 1,2144g/ 200 mL de l'eau bi distillée).

La solution est ensuite chauffée au bain marie, à 37 °C pendant 15 min, puis à 72°C pendant 5 min. Un volume similaire de BSA et méthanol est utilisé comme témoin.

Après refroidissement la turbidité est mesurée à 660 nm.

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ Inhibition de denaturation} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Echantillon}}}{A_{\text{Control}}} \times 100$$

**Dont :**

**A contrôle**, est l'absorbance de blanc

**A échantillon**, est l'absorbance du contrôle positif ou de l'échantillon à 660 nm



### 5.1.2. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire des extraits sur les kératinocytes de la lignée HaCaT

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de pharmacie à l'Université de Salerno en Italie.

#### 5.1.2.1. La culture cellulaire

Les cellules de la lignée de kératinocytes humaines HaCaT ont été utilisées comme modèle pour évaluer l'effet antioxydant et anti-inflammatoire de l'extrait *in vitro*.

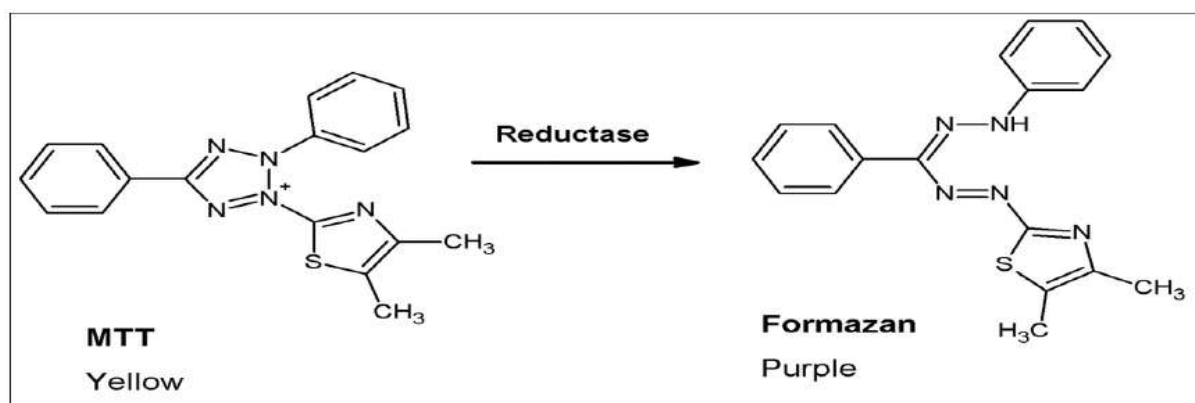
Les cellules sont cultivées dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) à haute teneur en glucose, 10 % de sérum bovin fœtal (FBS), 1 % d'un mélange pénicilline (100 U/mL)/streptomycine (100 mg/mL) à 37°C et une humidité relative 5%.

#### 5.1.2.2. Le test de viabilité (MTT)

##### 5.1.2.2.1. Principe

L'effet des extraits sur la viabilité des kératinocytes de la lignée HaCaT a été évalué par le test MTT. Ce dernier est basé sur la mesure de la réduction des sels de tetrazolium, 3-(4,5-diméthylthiazoly-2)-2,5-diphényltetrazolium bromide (MTT), de couleur jaune en cristaux violet de formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale, uniquement active dans les cellules vivantes.

La formation des cristaux de formazan est donc proportionnelle au nombre de mitochondries fonctionnelles.



**Figure 26.** Principe de réduction de tetrazolium en formazan par la succinate déshydrogénase mitochondriale

#### 5.1.2.2.2. Méthode

Les kératinocytes ont été cultivées dans des plaques 96 puits ( $5.10^3$  cellules/puits) en présence de différentes concentrations des extraits (5,25, 50,250 $\mu$ g/mL). Après 24, 48 et 72 heures, 25 $\mu$ L de la solution MTT (5mg/mL) ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque est de nouveau et incubée pendant 3 heures pour la formation des cristaux de formazan. Finalement, les cellules sont incubées pendant 18 heures avec 100  $\mu$ L de tampon de lyse (50 % de N,N-diméthylformamide et 20 % (w: v) SDS à pH = 4,5) (Alilou *et al.*, 2020).

La densité optique (DO) est mesurée à 620 nm dans un lecteur de microplaques.

Le pourcentage des cellules vivantes est calculé par l'équation suivante :

$$V\% = OD / (OD \times DMSO) \times 100$$

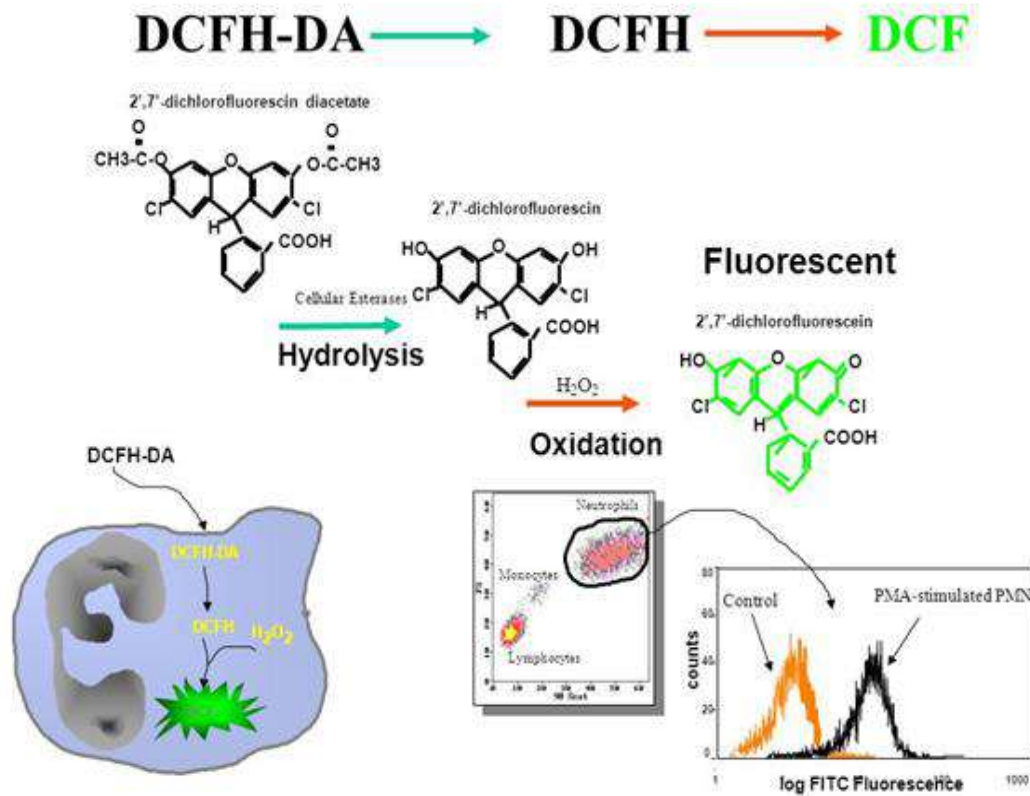
OD = absorbance de l'extrait à chaque concentration

DMSO= moyenne des absorbances de DMSO dans les différentes concentrations.

#### 5.1.2.3. Le dosage des espèces réactives d'oxygène intracellulaires (ROS)

##### 5.1.2.3.1. Principe

La quantité de ROS intercellulaires est mesurée par la technique de fluorescence à l'aide de la sonde H2DCF-DA (2', 7'-dichlorofluorescéine-diacétate), une sonde non fluorescente, après sa modification par les estérases cellulaires et son oxydation par les ROS, elle se transforme en une molécule hautement fluorescente la 2', 7'-dichlorofluorescéine (DCF). La fluorescence est ensuite mesurée par cytométrie en flux.



**Figure 27.** Principe de dosage des ROS intracellulaire par cytométrie en flux en utilisant la sonde H2DCF-DA (2', 7'-dichlorofluorescéine-diacétate) (Rapa et al, 2020).

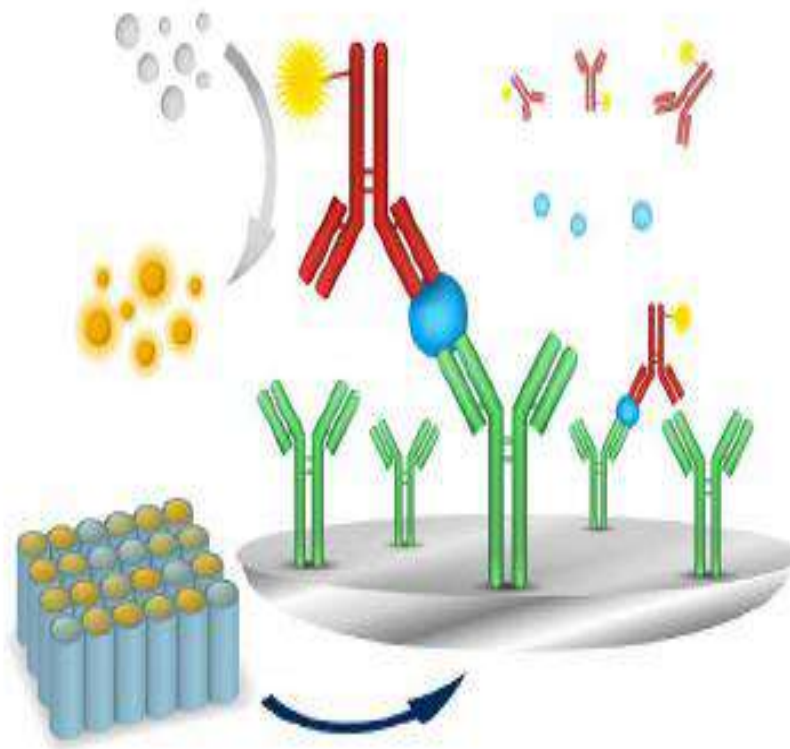
#### 5.1.2.3.2. Méthode

Les taux de ROS intracellulaires ont été mesurés selon la méthode de Rapa *et al.* (2020). Les cellules Hacat ont été cultivées dans des plaques à 24 puits ( $5 \times 10^3$  cellules / puits) en présence de différentes concentrations des extraits (50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ ) puis stimulées par des lipopolysaccharides (LPS) d'*E.coli* ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Après 24 heures, les surnageants de culture sont prélevés et conservés à  $-18^\circ\text{C}$  pour d'autres usages, alors que les cellules sont collectées, lavées (avec du PBS) et incubées pendant 15 min avec le H2DCF-DA ( $10 \mu\text{M}$ ). La fluorescence intracellulaire est finalement évaluée par cytométrie en flux (scan FACS; Becton Dickinson, NJ, USA) et élaborée avec le logiciel Cell Quest (San Diego, CA, USA).

#### 5.1.2.4. Le dosage du TNF- $\alpha$

##### 5.1.2.4.1. Principe

C'est une technique immuno-enzymatique spécifique qui permet de détecter une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme fixée à l'anticorps. Dans l'ELISA sandwich l'antigène à doser se trouve entre l'anticorps de capture et un deuxième anticorps conjugué enzymatique mais reconnaissant des épitopes différents sur l'antigène; l'intensité de la coloration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.



**Figure 28.** Principe de la technique ELISA sandwich

##### 5.1.2.4.2. Méthode

La production de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  par les kératinocytes a été mesurée dans les surnageant de culture de l'expérience précédente (ROS). La production du TNF- $\alpha$  est déterminée par la méthode ELISA sandwich utilisant le kit (Diacclone human TNF- $\alpha$  Elisa kit) prêt à l'emploi et suivant les instructions du fabricant. Les résultats ont exprimés en pg/mL.

### **5.2. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vivo***

- **L'élevage des souris**

L'étude a été effectuée sur un groupe des souris mâles BALB/c provenant de l'institut Pasteur d'Alger, âgées de 6 semaines, ayant un poids entre 22 et 28g. L'étude *in vivo* a été réalisée dans une batterie avec des cages en plastique à une température ambiante, un régime alimentaire standard et un cycle de 12 h de lumière/12 h d'obscurité au niveau de l'animalerie de l'Université Frères Mentouri Constantine 1.

#### **5.2.1. Le test de toxicité cutanée sur les souris BALB/c**

L'extrait qui a montré une forte activité antioxydante et anti- inflammatoire *in vitro* a été choisi pour le test *in vivo*.

Un test de toxicité cutanée avec la pommade à base d'extrait de dichlorométhane à 5% a été réalisé sur des souris BALB/c (6 souris par lot) avant de commencer le test de la dermatite. La pommade est appliquée (une petite noisette, deux fois par jour) sur le dos des souris (la partie rasée) pendant 14 jours. Une étude macroscopique et microscopique a été réalisée sur la peau de souris en comparaison avec des témoins.

#### **5.2.2. Le test de l'effet anti-inflammatoire de l'extrait de dichlorométhane sur la dermatite atopique induite chez les souris**

##### **Développement de dermatite chez les souris**

La dermatite atopique chez les souris est induite par le 2,4-dinitrochlorobenzène (DNCB) selon la méthode de Ku *et al.* (2018) avec quelques modifications (Fig. 29). Les souris sont traitées avec le DNCB (2%) : 200 µL du DNCB ont été appliqués sur la peau dorsale des souris pendant 5 jours. 2 jours après la dernière application 100 µL du DNCB 2% ont été appliqués 2 fois par semaine pendant la deuxième, troisième et la quatrième semaine (lot 2).

- **Traitement de la dermatite**

- a. **Traitement avec l'extrait**

- **Préparation de pommades à base d'extrait de dichlorométhane de *P.hypotropa***

L'extrait de lichen a été administré par application topique sous forme de pommade. Cette dernière a été préparée selon un protocole ordinaire en mélangeant l'extrait avec un excipient. La gelée de pétrole (excipient) a été fondue dans un récipient stérile au bain-marie, l'extrait est ensuite ajouté en remuant doucement et régulièrement. La pommade obtenue a été conservée à une température ambiante (22°C) et à l'abri de la lumière.

Deux doses ont été préparées : 0.76% équivalente à 0.05% d'acide usnique, et 0.45% équivalente à 0.03% d'acide usnique.

La pommade à base de l'extrait de dichlorométhane : 0.76% (acide usnique à 0.05%) (3<sup>ème</sup> lot), 0.45% (acide usnique à 0.03%) (4<sup>ème</sup> lot) ont été administrées pendant 14 jours sur le dos des souris par application topique (une petite noisette, deux fois par jour).

Les souris sont traitées avec le DNCB et les pommades à base d'extrait dichlorométhanique (à 0.76% et 0.45%,.). Le DNCB est appliqué en premier pendant 15 jours pour la sensibilisation (même protocole que le 2<sup>ème</sup> lot). La pommade d'extrait de lichen (0.76%, 0.45%; 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> lot respectivement) est ensuite appliquée sur la peau (2 fois par jour) après les premiers 14 jours en respectant le même processus du protocole (application du DNCB 2 fois par semaine) au cours des deux dernières semaines.

- b. **Traitement avec l'acide usnique (molécule référence)**

L'acide usnique a été utilisé comme molécule de référence de lichen, une pommade à 0.05% de cette molécule a été préparée (même préparation des pommades avec l'extrait) ; la dose 0.05% a été choisie par rapport à la dose du traitement de référence de la Bétaméthasone 0.05%.

La pommade à base d'acide usnique à 0.05% a été appliquée pendant 14 jours sur le dos des souris par application topique (une petite noisette, deux fois par jour) (7<sup>ème</sup> lot).

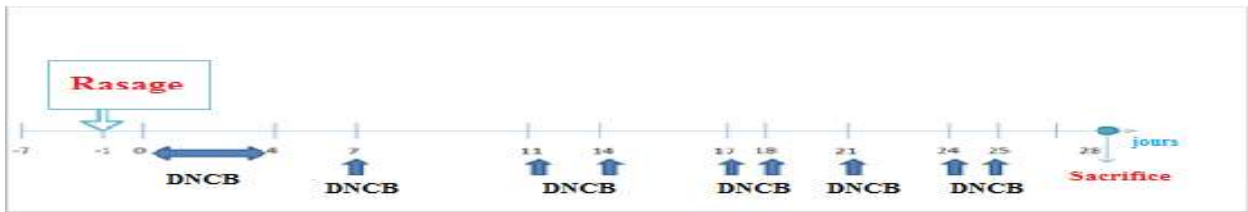
Les souris sont traitées avec le DNCB et de la pommade à base d'acide usnique 0.05%. Le DNCB est appliqué en premier pendant 15 jours pour la sensibilisation (même

protocole que le 2<sup>ème</sup> lot). La pommade à base d'acide usnique 0.05% est ensuite appliqué sur la peau (2 fois par jour) après les premiers 14 jours en respectant le même processus du protocole (application du DNCB 2 fois par semaine) au cours des deux dernières semaines. (8<sup>ème</sup> lot)

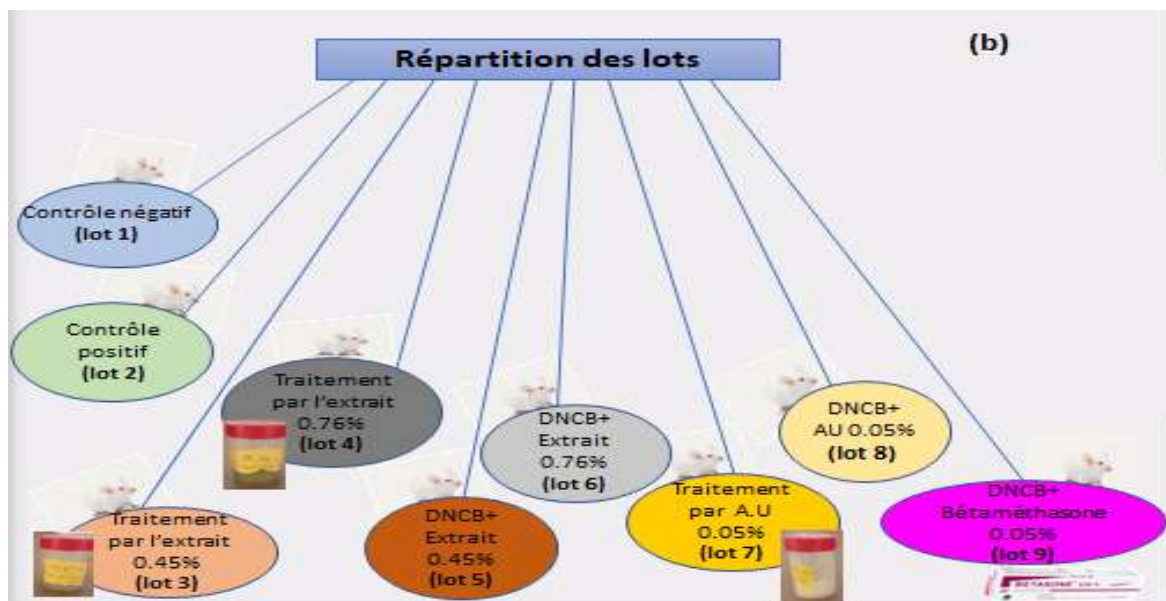
**c. Traitement contrôle avec la Bétaméthasone 0.05% (traitement de référence)**

Les souris traitées avec le DNCB (même protocole du deuxième lot) plus une application topique de pommade pharmaceutique (Bétaméthasone 0.05%) pendant les 14 jours derniers (2 fois par jours). (9<sup>ème</sup> lot).

- **Remarque :** Tous les lots sont comparés avec un lot contrôle (**lot 1** : lot contrôle négatif ne recevant aucun traitement).



(a)



(b)

**Figure 29.** Schéma général du protocole de la dermatite atopique induite par le DNCB (a) et de la répartition des lots (b)



### ○ Prélèvement des organes

Les souris sont disséquées après 28 jours de traitement. Des fragments de la peau prélevés ont été fixés dans du formol 10%.

Une étude macroscopique et microscopique ont été réalisées sur la peau dorsale de souris afin de détecter d'éventuels changements morphologiques.

### ○ L'étude macroscopique

L'étude macroscopique concerne deux paramètres le score de lésion et l'épaisseur de la peau. Les lésions cutanées induites par les différents traitements sont évaluées selon la méthode de Roßbach *et al.* (2017) qui classe le degré de lésions sur une échelle de 4 scores en tenant compte de la moyenne de sécheresse cutanée, les érosions, l'œdème et l'érythème.

Après la dissection des souris l'épaisseur de la peau dorsale a été mesurée par un pied à coulisse digital.

### ○ L'étude microscopique

#### **L'étude histologique des organes**

La peau dorsale de souris a été l'objet d'une étude microscopique. La réalisation des lames histologiques se réalise en plusieurs étapes :

#### **1<sup>ère</sup> étape : préparation des blocs,**

Une fois les échantillons prélevés, découpés et placés dans des cassettes, le formol est utilisé en y immergeant les échantillons pour les fixer. L'échantillon en cassette est imprégné de paraffine. Pour cela, il subit trois sous-étapes successives en raison du caractère hydrophobe de la paraffine :

- la déshydratation : les échantillons sont déshydratés dans 6 bains d'éthanol d'une concentration croissante (50, 60, 70, 80, 90 et 100%) avec une durée de 1 h et 30 minutes pour chaque bain ;
- l'éclaircissement : dans cette étape les échantillons sont passés dans 3 bains de xylène, la durée de chaque bain est 1h30min ;

- l'inclusion dans la paraffine chaude : cette étape correspond à l'imprégnation de l'échantillon dans deux bains successifs de la paraffine chaude pendant 3h pour chacun.

Les blocs sont ensuite refroidis dans un congélateur à -60°C.

**2<sup>ème</sup> étape** : la réalisation des coupes à l'aide d'un microtome (épaisseur de 3µm).

**3<sup>ème</sup> étape** : la coloration double à hématoxyline-éosine HE. Cette coloration se fait dans un automate selon le protocole suivant :

- bain de xylène : 18min (afin de réhydrater les coupes)
- bain d'éthanol : 18min
  
- rinçage avec de l'eau distillée
- bain d'hématoxyline : 6min
- rinçage
- bain d'éosine : 3min
- rinçage
- bain d'éthanol : 8min (afin de déshydrater les coupes)
- bain de xylène : 10min.

**4<sup>ème</sup> étape** : montage et lecture.

### 6. L'étude statistique

Les données sont représentées par la moyenne d'au moins trois essais. L'analyse statistique des résultats est effectuée avec l'application « ANOVA » à l'aide d'un logiciel Graph Pad Prism 5 et le seuil de signification est fixé à  $P < 0,05$ .

## 1. LA CARACTERISATION PHYTOCHIMIQUE

### 1.1 Le rendement total de l'extraction

Le rendement total d'extraction du lichen *P.hypotropa* pour 10 g d'extrait est de l'ordre de 4% pour l'extrait dichlorométhanique et de 6.4% pour l'extrait éthanolique (Tab. 1).

**Tableau 1.** Rendement total d'extractions (RET%) du lichen *P.hypotropa* par le dichlorométhane et par l'éthanol

	Extrait dichlorométhanique	Extrait éthanolique
Poids sec (g)	10	10
RET%	4	6,4

### 1.2 La teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux des deux extraits de *P.hypotropa*

Les résultats montrent que l'extrait de dichlorométhane contient des taux élevés de polyphénols  $238.26 \pm 6.86 \mu\text{g GAE/ml}$  et de flavonoïdes  $57.70 \pm 7.57 \mu\text{g QE/ml}$  comparativement à l'extrait éthanolique qui renferme  $159.3 \pm 3.74 \mu\text{g GAE/ml}$  de polyphénols et  $4.10 \pm 0.12 \mu\text{g QE/ml}$  de flavonoïdes (Tab. 2).

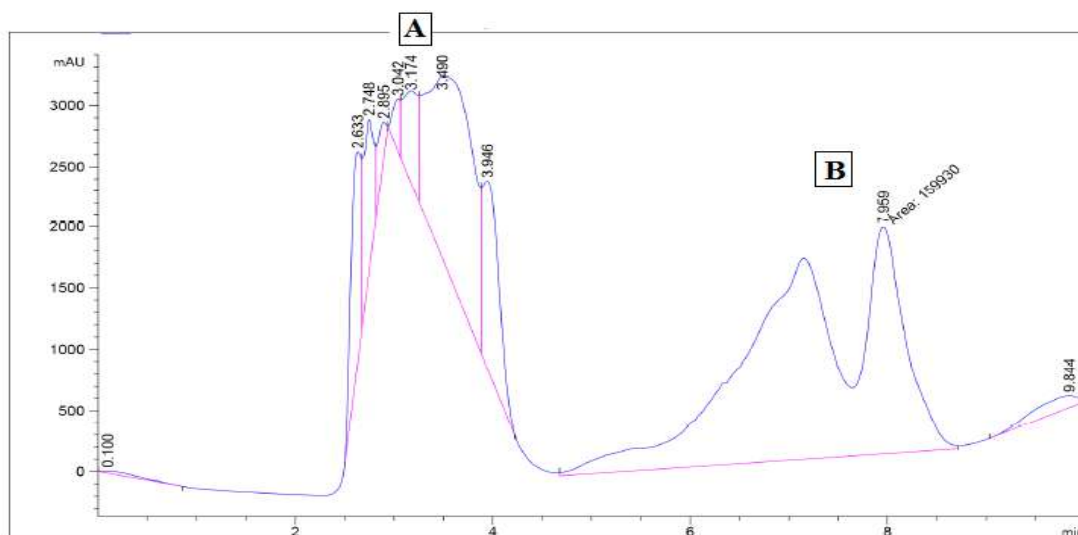
**Tableau 2.** Teneur totale en phénols (exprimé en  $\mu\text{g}$  de GAE/ml) et en flavonoïdes (exprimé en  $\mu\text{g}$  QE/ml) d'extraits de dichlorométhane et d'éthanol de *P.hypotropa*.

Extrait de <i>P.hypotropa</i>	Teneur en phénols totaux ( $\mu\text{g GAE/ml}$ )	Teneur en Flavonoïdes ( $\mu\text{g QE/ml}$ )
Dichloromethane	$238.26 \pm 6.86^a$	$57.70 \pm 7.57^a$
Ethanol	$159 \pm 3.74^b$	$4.10 \pm 0.12^b$

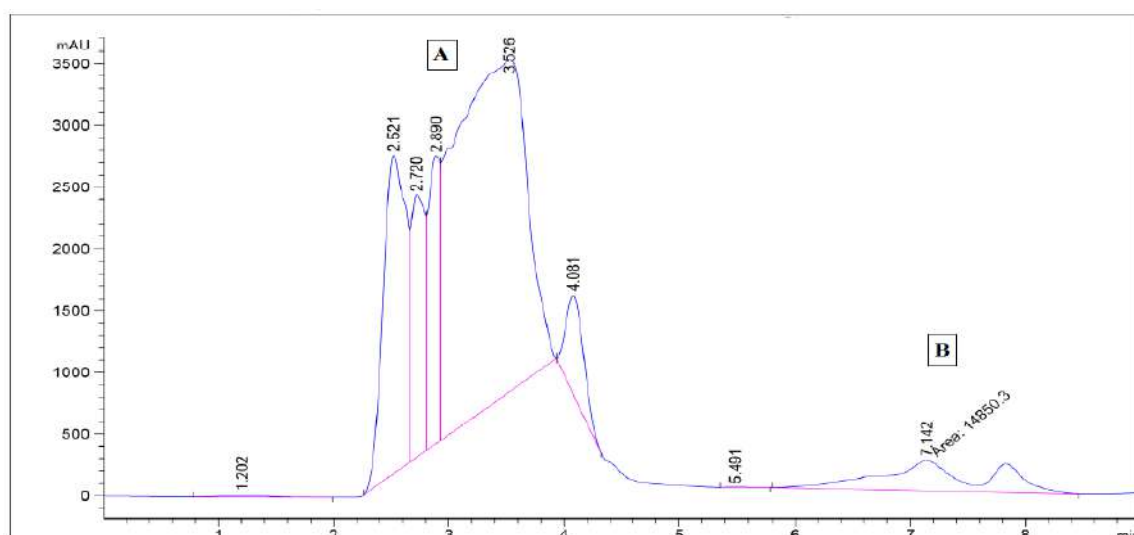
(n=3, a, b significativement différent  $p < 0,05$ )

### 1.3 La détermination de la teneur en acide usnique dans les deux extraits de *P.hypotropa*

La teneur en acide usnique dans 5mg d'extrait est de 0.295 mg pour l'extrait dichlorométhanique (Fig. 30), et 0.032 mg pour l'extrait éthanolique (Fig. 31). L'extrait de dichlorométhane est plus riche en acide usnique en comparaison à l'extrait d'éthanol. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 3.



**Figure 30.** Détermination de l'acide usnique dans l'extrait de dichlorométhane du lichen *P.hypotropa* par l'HPLC en comparant les pics de temps de rétention au standard. (A : solvant, B : acide usnique).



**Figure 31.** Détermination de l'acide usnique dans l'extrait éthanolique du lichen *P.hypotropa* par HPLC en comparant les pics de temps de rétention au standard. (A : solvant, B : acide usnique).

**Tableau 3.** Teneur en acide usnique des deux extraits de lichen *P.hypotropa* (exprimé en mg) et temps de rétention (exprimé en minutes).

Extraits de <i>P.hyporopa</i>	Teneur en acide usnique (mg)	Temps de rétention (min)
Extrait dichlorométhanique	0.295±0.049 <sup>a</sup>	7,886±0.210
Extrait éthanolique	0.032±0.001 <sup>b</sup>	7,143±0.001

(n = 3, les valeurs avec les lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes p< 0,05).

## 2. LES PROPRIETES ANTIOXYDANTES DES DEUX EXTRAITS

### 2.1. Le test DPPH

Les extraits de dichlorométhane et d'éthanol de *P.hypotropa* montrent une capacité de piégeage des radicaux libres modérée avec une IC<sub>50</sub>>800 µg/mL. (Tab. 4)

### 2.2. Le test ABTS

Les deux extraits exercent une activité de piégeage élevée du radical ABTS ; l'extrait du dichlorométhane a enregistré une meilleure activité (IC<sub>50</sub>= 80,37 ± 4,26 µg/mL) comparativement à l'extrait éthanolique (IC<sub>50</sub>=96.18±1.0). (Tab. 4)

### 2.3. Le test Beta-carotène

Dans le dosage du β-carotène, est mesuré le potentiel des deux extraits de *P.hypotropa* à inhiber la formation d'hydroperoxyde de diène conjugué (LOOH) via l'oxydation de l'acide linoléique. L'extrait de dicholoromèthane a rapporté la plus forte activité d'inhibition du blanchiment du β-carotène (205.51±17.54 µg/mL) comparativement à l'extrait éthanolique (268.62±2.44 µg/mL). (Tab. 4)

## 2.4. Le test CUPRAC

Les résultats montrent que les deux extraits ont un pouvoir réducteur des ions de cuivre de l'ordre de  $A_{0.5} = 39,06 \pm 3,37 \mu\text{g/mL}$  pour l'extrait de dichlorométhane et de  $39,37 \pm 1,46 \mu\text{g/mL}$  pour l'extrait éthanolique. (Tab. 4).

- **Remarque :**

Les résultats des tests antioxydant révèlent que les deux extraits ont une activité antioxydante modérée comparativement aux standards (Tab. 4).

**Tableau 4.** Activité antioxydante des deux extraits de *P.hypotropa*.

	<b>DPPH</b> <b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>ABTS</b> <b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>β-Carotène</b> <b>IC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>CUPRAC</b> <b>A<sub>0.50</sub> (µg/mL)</b>
Dichloromethane	> 800	80.37±4.26 <sup>a</sup>	205.51±17.54 <sup>a</sup>	39.06±3.37 <sup>a</sup>
Ethanol	> 800	96.18±1.0 <sup>b</sup>	268.62±2.44 <sup>b</sup>	39.37±1.46 <sup>b</sup>
BHA	6.14±0.41	1.81±0.10	1.05±0.03	5.35±0.71
BHT	12.99±0.41	1.29±0.30	0.91±0.01	8.97±3.94
Acide ascorbique	4.39±0.01	3.04±0.05	NT	8.69±0.14

Valeur IC<sub>50</sub> et A<sub>0.50</sub> sont des moyennes ± écart-type de trois mesures parallèles. Les valeurs avec les lettres différentes dans la même colonne sont significativement différentes p< 0,05.

*Standards: BHA :hydroxyanisolebutylé; BHT: hydroxytoluènebutylé ; NT : non testé.*

### 3. LE TEST DE TOXICITE AIGUE

#### 3.1. L'effet des deux extraits de *P.hypotropa* sur la viabilité des larves d'*Artémia salina*

Les résultats indiquent que les deux extraits de dichlorométhane et d'éthanol à différentes concentrations ne sont pas toxiques aux larves d'*Artémia salina*, où le pourcentage de mortalité le plus élevé est à 20% (Tab.5)

**Tableau 5.** Effet toxique de l'extrait de dichlorométhane et d'éthanol du lichen *P.hypotropa* sur les larves d'*A.salina* (exprimé en pourcentage de mortalité).

Concentrations (µg/mL)	Mortalité %	
	Dichlorométhane	Ethanol
0 (témoin)	0%	0%
125	0%	5%
250	10%	13.3%
500	13,4%	15%
1000	20%	20%



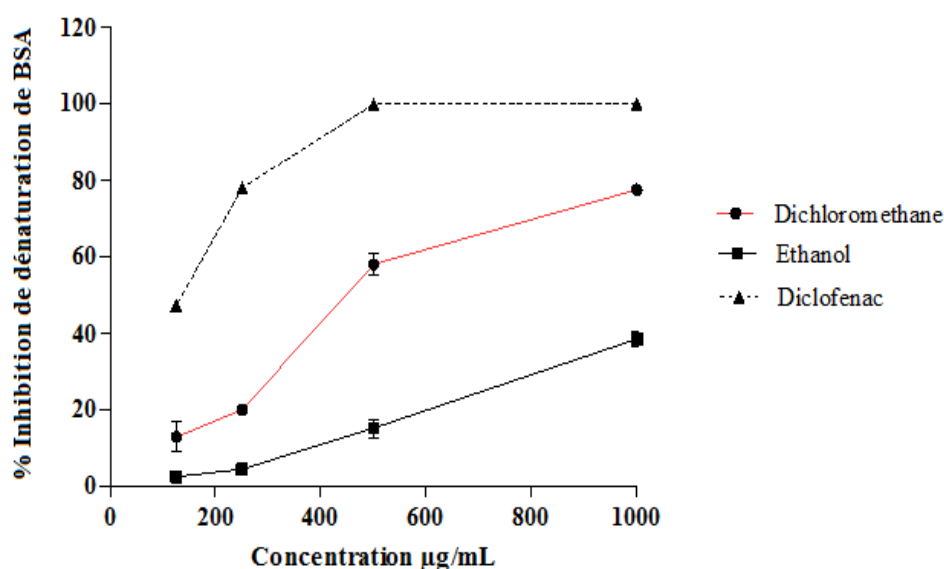
## 4. L'EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DES DEUX EXTRAITS

### 4.1. L'EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DES DEUX EXTRAITS *IN VITRO*

#### 4.1.1. L'effet des extraits sur la dénaturation du BSA

Les résultats sur la figure (32) indiquent que les deux extraits possèdent un effet protecteur dose-dépendant contre la dénaturation de la protéine BSA induite par la chaleur.

L'extrait de dichlorométhane a montré une forte capacité d'inhibition avec un pourcentage de 77.55% à 1000 µg/mL. Le deuxième extrait d'éthanol a atteint une inhibition maximale de 38.39% à la même concentration (1000 µg/mL).



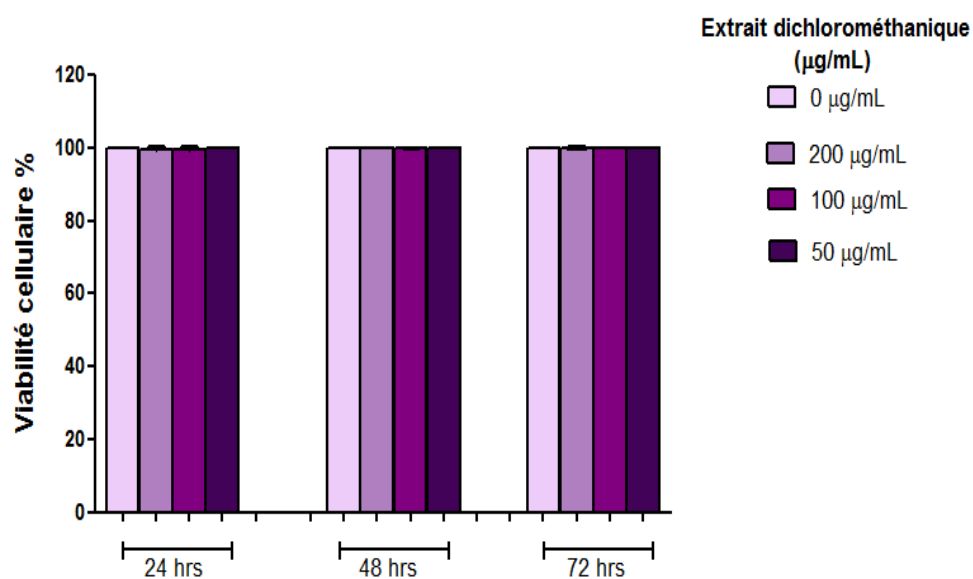
**Figure 32.** Effet inhibiteur contre la dénaturation de BSA des extraits de dichlorométhane et d'éthanol du lichen *P.hypotropia* (exprimé en pourcentage).

#### 4.1.2. L'effet des deux extraits sur l'activité anti inflammatoire des kératinocytes:

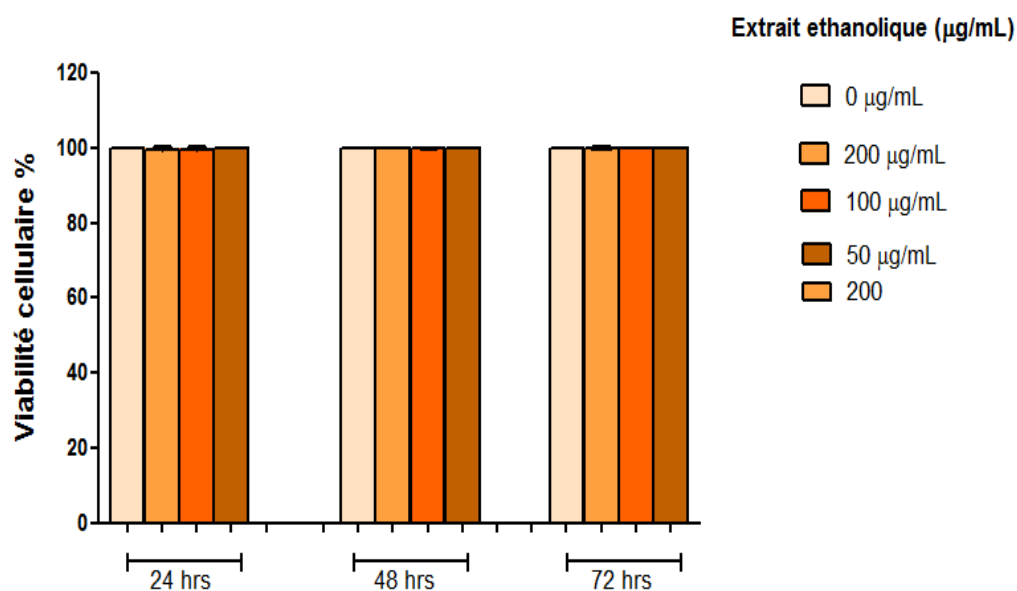
##### 4.1.2.1. L'effet des deux extraits sur la viabilité des cellules HaCaT

Les résultats exprimés en pourcentages de viabilité des cellules HaCaT après leur traitement avec différentes concentrations (50, 100, 200 µg/mL) des extraits examinés à 24, 48 et 72 heures, montrent que la présence de l'extrait de dichlorométhane (Fig.33) ou de

l'extrait éthanolique (Fig.34) n'ont pas un effet sur la viabilité des cellules, et le pourcentage de viabilité dans les deux extraits avec toutes les concentrations est supérieur à 99,5 %.



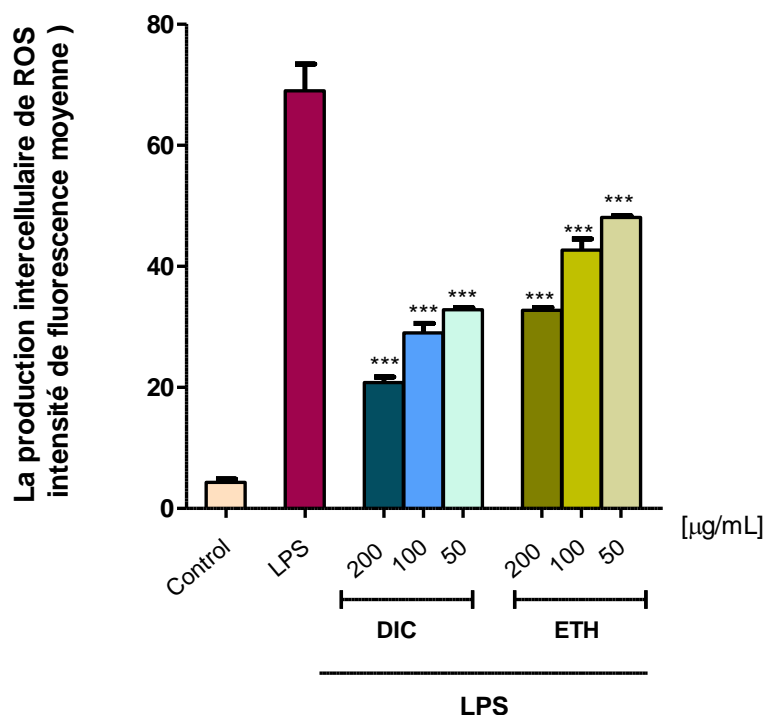
**Figure 33.** Effet de l'extrait de dichlorométhane à différentes concentrations (50-200 µg/mL) sur la viabilité des cellules HaCaT après 24, 48 et 72 heures.



**Figure 34.** Effet d'extrait éthanolique à différentes concentrations (50-200 µg/mL) sur la viabilité des cellules HaCaT après 24, 48 et 72 heures.

#### 4.1.2.2. L'effet des deux extraits de *P.hypotropa* sur la production des ROS intercellulaires

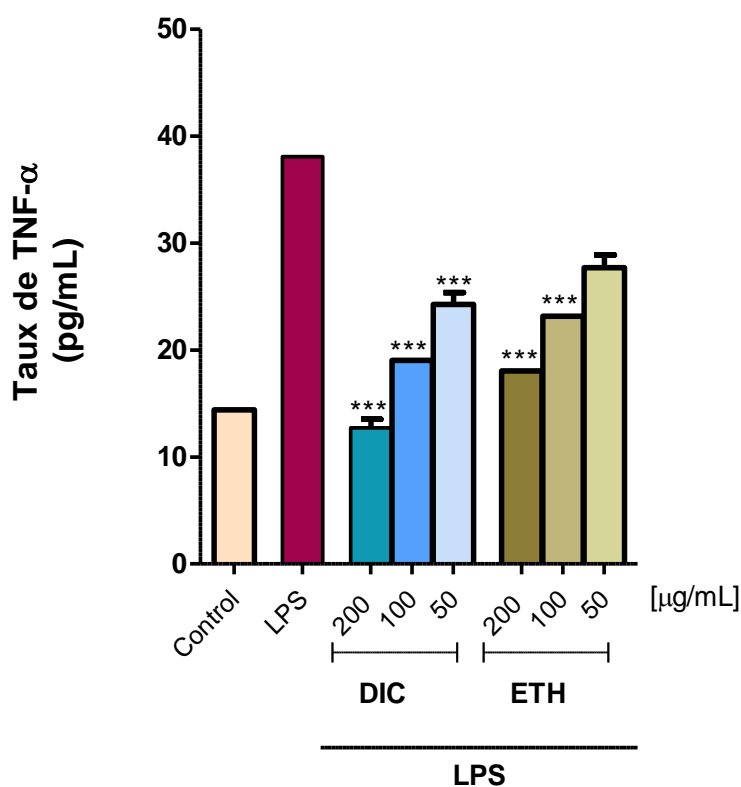
Le dosage des ROS intercellulaires dans les cellules HaCaT stimulées par LPS montre que les deux extraits inhibent significativement ( $p < 0,001$ ) la formation de ROS intercellulaires à toutes les concentrations testées. L'extrait de dichlorométhane induit une diminution significative ( $p < 0,001$ ) des ROS intracellulaires avec un pourcentage d'inhibition de l'ordre de  $52,41 \pm 0,76\%$ ,  $58,00 \pm 3,93\%$  et  $69,83 \pm 2,23 \%$  pour les concentrations 50, 100 et 200  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement. De même, l'extrait éthanolique provoque une réduction significative des ROS avec des taux d'inhibition  $30,35 \pm 0,69$ ,  $38,17 \pm 4,67$  et  $52,54 \pm 1,16 \%$  correspondant aux concentrations de 50, 100 et 200  $\mu\text{g/mL}$ , respectivement (Fig. 35). On note que l'inhibition des ROS par les deux extraits est dose-dépendante.



**Figure 35.** Effets des extraits de dichlorométhane et d'éthanol du lichen *P. hypotropa* aux concentrations 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$  sur les taux de ROS intracellulaires dans les cellules HaCaT stimulées par LPS. \*\*\*  $P < 0,001$  significatif comparativement aux cellules stimulées par LPS. (LPS : cellules stimulées par LPS; DIC : extrait dichlorométhanique; ETH : extrait éthanolique).

#### 4.1.2.3. L'effet des deux extraits sur la production du TNF- $\alpha$

Les données indiquent que les deux extraits diminuent significativement ( $p < 0,001$ ) la production du TNF- $\alpha$  (Fig. 36). L'extrait de dichlorométhane réduit la production de la cytokine à toutes les concentrations (50, 100 et 200  $\mu\text{g/mL}$ ) alors que l'effet de l'extrait d'éthanol n'est observé qu'à 100 et 200  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figure 36.** Effet d'extraits de dichlorométhane et d'éthanol du lichen *P. hypotropa* à différentes concentrations 50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$  sur la production du TNF- $\alpha$  (exprimé en  $\text{pg/mL}$ ) par les cellules HaCaT stimulées par LPS. (\*\*\*) significatif  $P < 0,0001$  par rapport aux cellules stimulées par LPS. LPS : cellules stimulées par LPS, DIC: extrait dichlorométhanique, ETH : extrait éthanolique).

## 4.2. L'ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE *IN VIVO*

D'après les résultats, des différentes expérimentations, reportés précédemment nous avons observé que l'extrait de dichlorométhane possède un effet plus important que l'extrait éthanolique, sur cette base nous allons le tester *in vivo* sur le modèle de dermatite.

### 4.2.1. L'évaluation de la dermatotoxicité *in vivo* de l'extrait dichlorométhanique

L'application de la pommade à base d'extrait de dichlorométhane, à la concentration la plus élevée (5%), sur les souris n'a entraîné aucune irritation ; rougeur ou autres modifications sur la structure de la peau de souris comparativement au témoin.

### 4.2.2. L'effet de l'extrait de dichlorométhane sur la dermatite atopique chez les souris

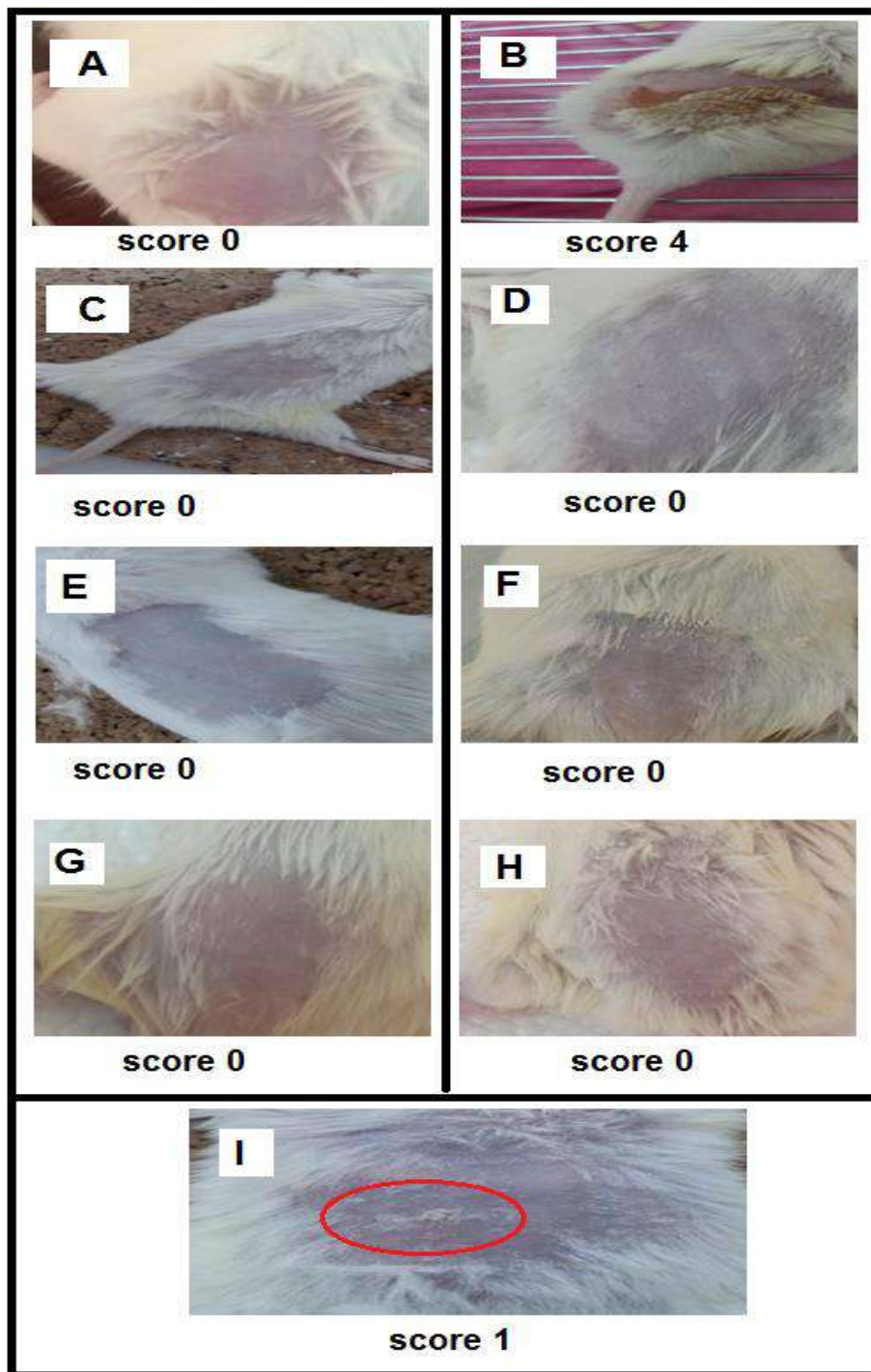
#### 4.2.2.1. L'étude macroscopique

- **L'évaluation des scores de lésions**

Afin d'étudier l'effet thérapeutique du lichen *P.hypotropa* sur la dermatite, nous avons choisi un modèle de dermatite atopique, induit par le DNCB chez les souris BALB/c. Des érythèmes, des œdèmes, des lichénifications et des excoriations étaient apparentes sur la peau dorsale des souris sensibilisées au DNCB (Fig. 37), évoquant un score de lésion de l'ordre 4.

Le traitement des souris avec la pommade à base d'extrait de dichlorométhane de *P.hypotropa* entraîne une amélioration de scores de lésions cutanées (score 0), aux concentrations 0.76% et 0.45%, chez les souris sensibilisées au DNCB.

Le traitement des souris sensibilisées au DNCB avec la pommade à base d'acide usnique (0.05%) provoque une réparation complète de la peau avec un score de lésion 0. L'extrait de dichlorométhane du lichen *P.hypotropa* et l'acide usnique ont un meilleur effet comparativement à la pommade de référence la Bétaméthasone (0,05%) révélant une réparation avec score de lésion 1.



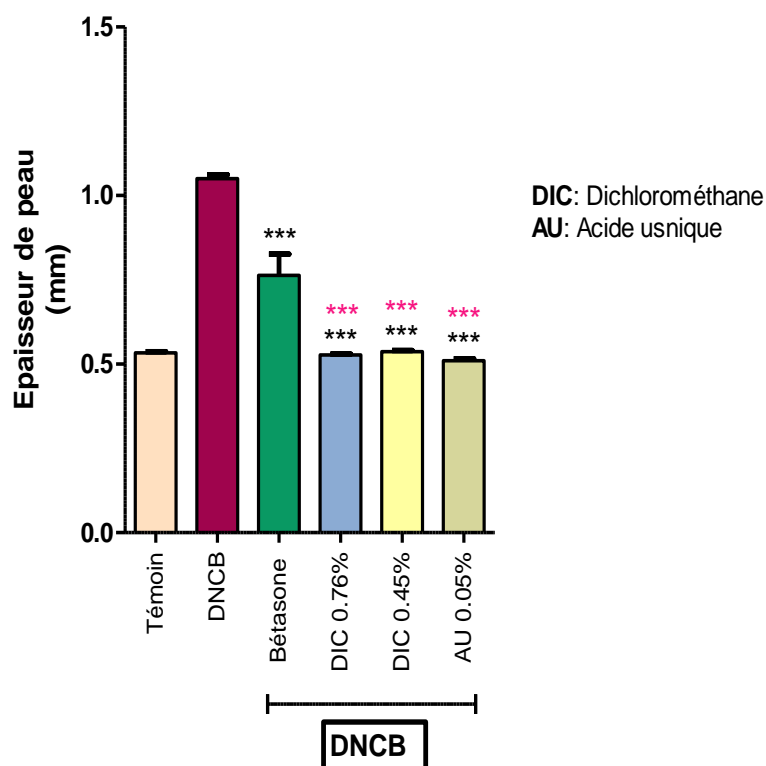
**Figure 37.** Score de lésions cutanées. **A:** témoin, **B:** traitement avec DNCB, **C- E :** traitement avec la pommade à base de l'extrait dichlorométhanique à 0.45% et 0.76% respectivement. **D :** DNCB+traitement avec la pommade à base de l'extrait dichlorométhanique à 0.45%. **F :** DNCB+traitement avec la pommade à base de l'extrait dichlorométhanique à 0.46%. **G :** traitement avec la pommade à base d'acide usnique à 0.05%. **H :** DNCB+ traitement avec la pommade à base d'acide usnique à 0.05%. **I :** DNCB+traitement avec la pommade Bétaméthasone 0.05%.

- L'effet sur l'épaisseur de la peau

La mesure de l'épaisseur de la peau montre une augmentation après l'application du DNCB ( $1,05 \pm 0,02$  mm) par rapport aux souris contrôles ( $0,53 \pm 0,01$  mm). L'épaisseur est significativement réduite à la fois par l'application du Bétasone ( $0,76 \pm 0,11$  mm), mais aussi par l'acide usnique à 0.05% ( $0,51 \pm 0,01$  mm) et par le dichlorométhane à 0.76% ou 0.45% ( $0,53 \pm 0,01$ ;  $0,54 \pm 0,01$ , respectivement) (Fig. 38).

D'autre part, l'épaisseur de la peau a été significativement réduite ( $P < 0,001$ ) lors du traitement des souris présentant une dermatite par l'extrait (à 0.76% et 0.45%), ou avec l'acide usnique (0.05%) comparativement aux souris traitées par la Bétasone (Fig. 38).

Les groupes de souris traitées par l'extrait du dichlorométhane (à 0.76%; 0.45%), et par l'acide usnique (0,05%) indiquent aucune augmentation d'épaisseur de peau par rapport au groupe témoin.



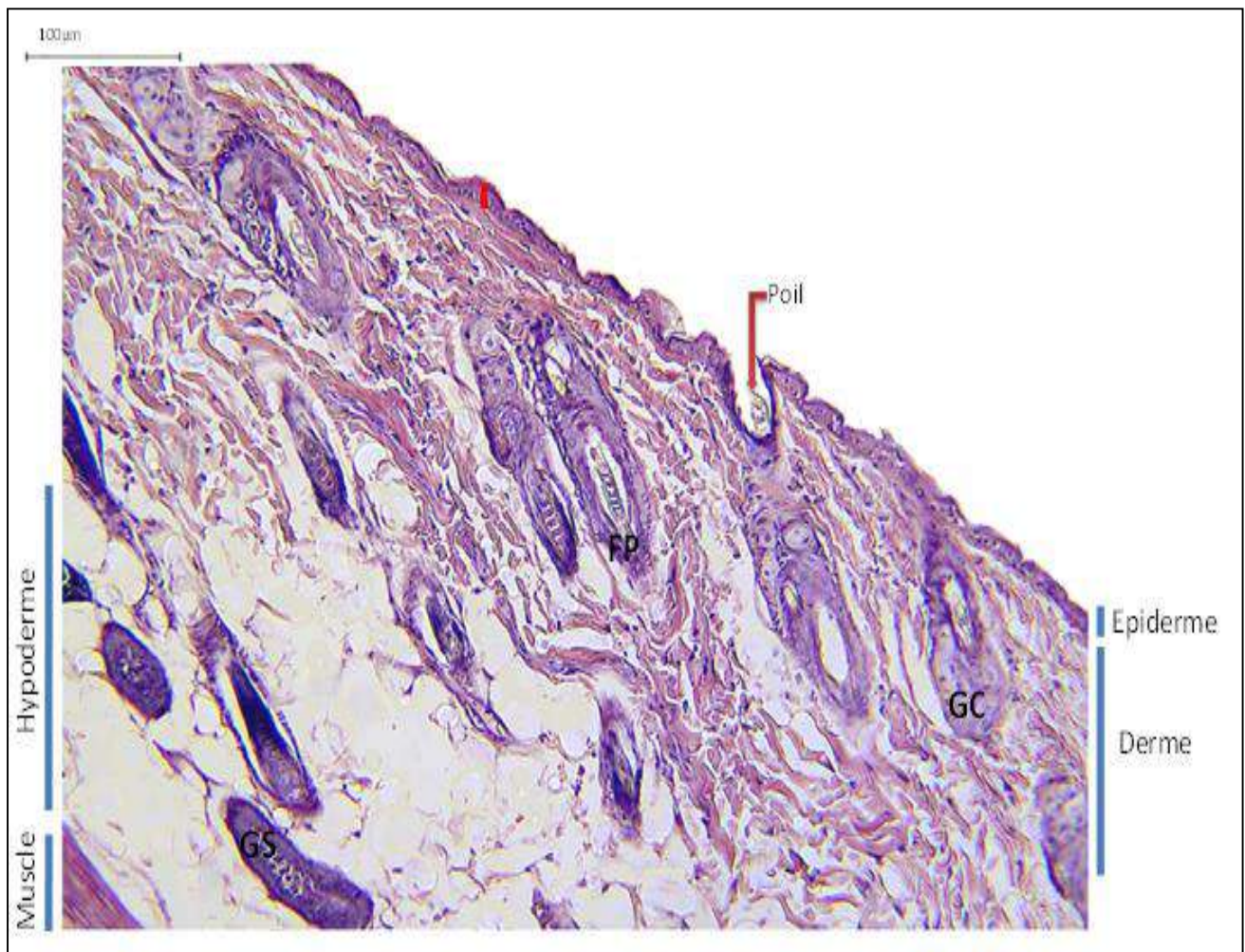
**Figure 38.** Effet des différents traitements topiques sur l'épaisseur de peau. (\*\*\*)  $P < 0,001$  significatif comparativement aux souris sensibilisées par le DNCB). (\*\*\*)  $P < 0,001$  significatif comparativement aux souris sensibilisées par le DNCB et traités par la Bétasone (0.05%).



#### 4.2.2.2. L'étude microscopique

- La structure histologique de la peau chez les souris contrôles

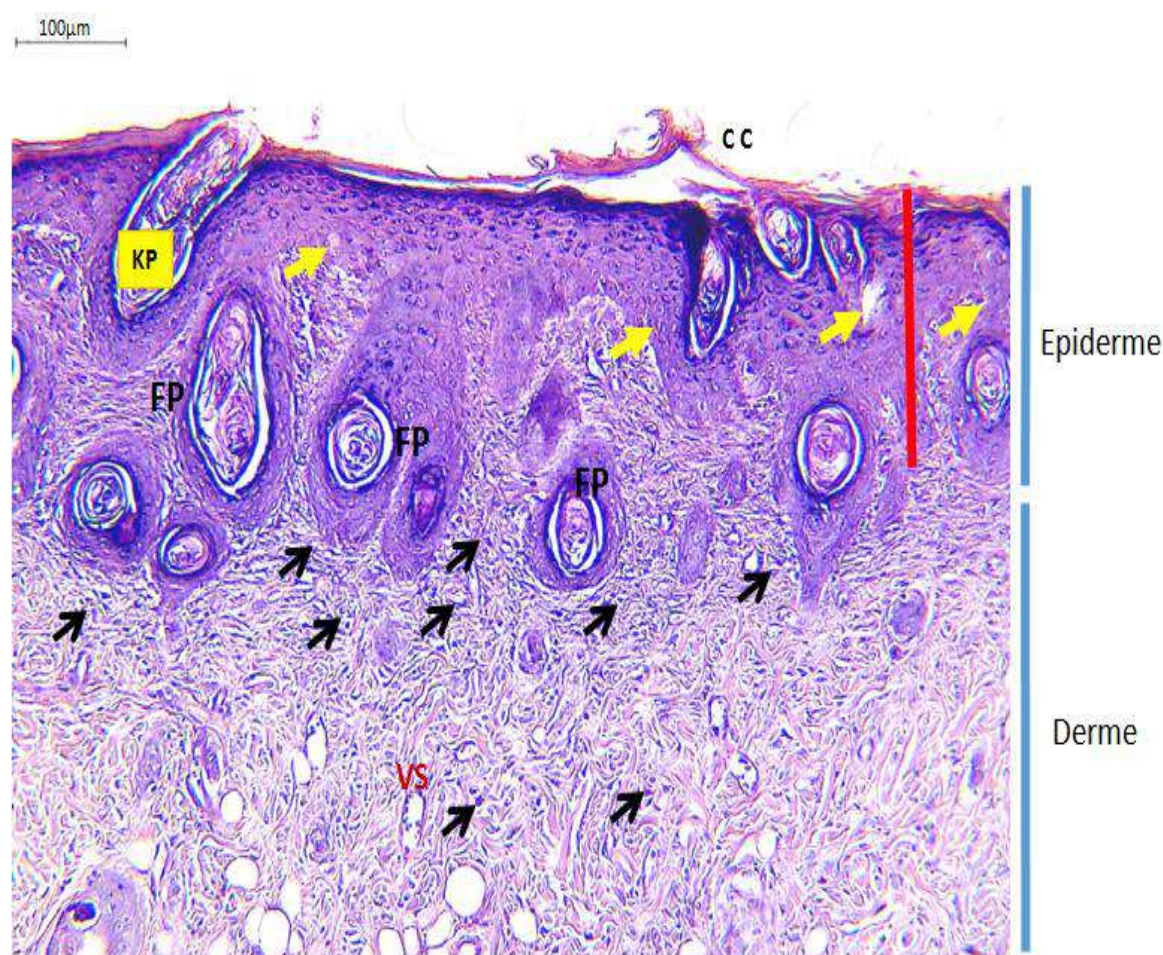
La figure 39 illustre la structure histologique d'une peau dorsale de souris contrôle : une structure normale de la peau avec les différentes couches épidermiques (présentant une épaisseur de l'ordre de 19,022  $\mu\text{m}$ , trait en rouge), un derme et un hypoderme, des follicules pileux, des glandes sébacées et des glandes sudoripares.



**Figure 39.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris contrôle. (Gx100), (Barre d'échelle 100  $\mu\text{m}$ ).FP: follicule pileux ; GC: glande sébacée ; GS : glande sudoripare.

- L'effet de la sensibilisation au DNCB sur la structure histologique de la peau

Les souris sensibilisées au DNCB présentent une altération de l'architecture de peau (Fig.40). On observe un accroissement de la kératinisation de la couche cornée (une hyperkératose), avec une augmentation significative de l'épaisseur de l'épiderme (217,125µm, trait en rouge), une infiltration importante de cellules inflammatoires (Fig.40, flèches noires), une apparition des aires claires entre les kératinocytes résultant d'un œdème et indiquant le développement de spongiose (Fig.40, flèches jaunes). On observe également une dilatation des follicules pileux avec une condensation de kératine à l'intérieur (kératose pileaire).

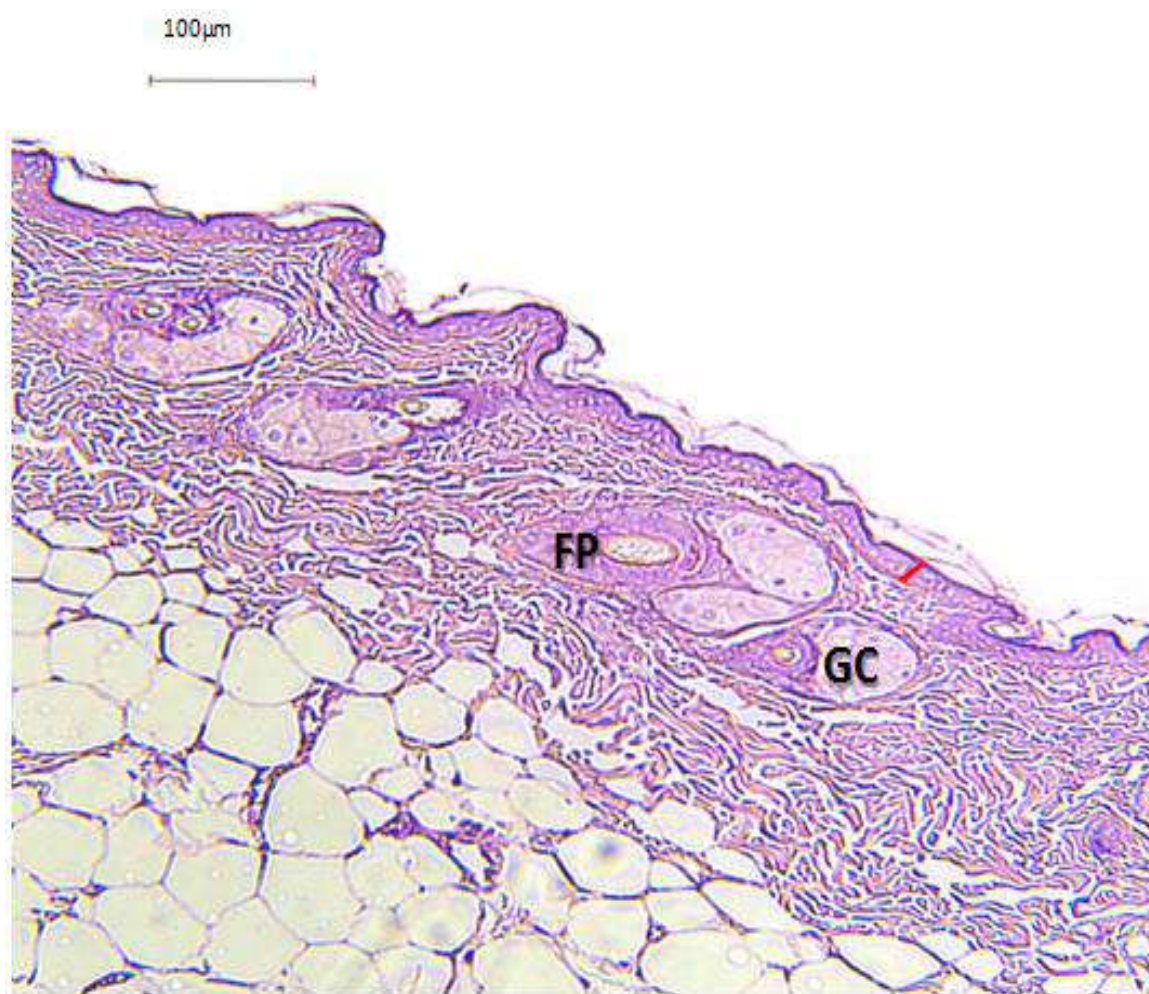


**Figure 40.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris sensibilisée avec le DNCB. (Gx100) (Barre d'échelle 100 µm). **FP**: follicule pileux ; **CC** : couche cornée ; **KP** : kératose pileaire ; **VS** : vaisseau sanguin.



- L'effet de l'extrait de dichlorométhane à 0.45% sur la structure histologique de la peau

L'application topique de la pommade à base de l'extrait à 0.45% (l'équivalent de 0.03% de l'acide usnique) n'a pas eu d'effet sur la structure histologique de la peau. L'épaisseur de la peau est de l'ordre de 19,199 $\mu$ m, ce qui est similaire au témoin (Fig. 41; trait en rouge).

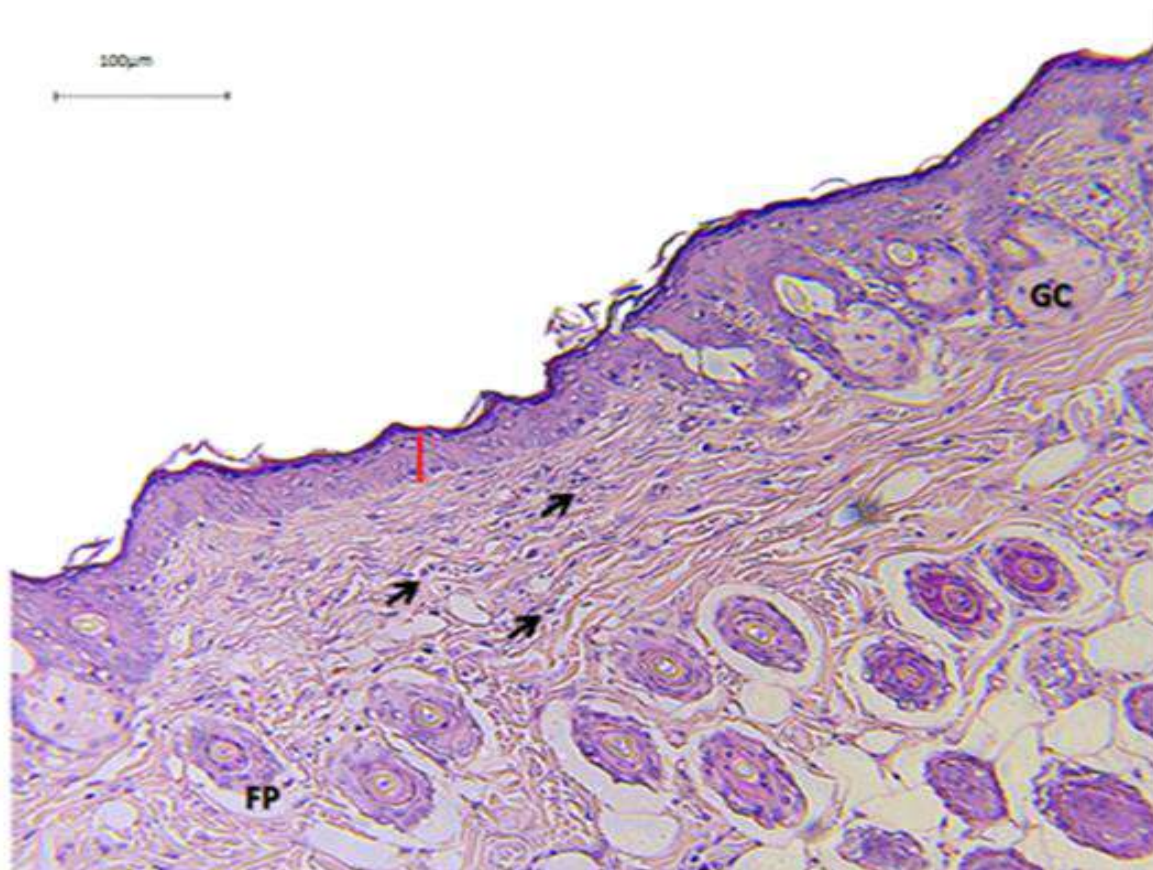


**Figure 41.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris traitée avec la pommade à base de l'extrait dichlorométhanique du lichen *P.hypotropa* à 0.45 % pendant 14 jours. (Gx100) (Barre d'échelle 100  $\mu$ m). **FP**: follicule pileux ; **GC**: glande sébacée.

- **L'effet de l'extrait de dichlorométhane (0.45%) sur la structure histologique de la peau des souris sensibilisées au DNCB**

L'analyse histologique des coupes de la peau des souris sensibilisées par le DNCB et traitées avec l'extrait de dichlorométhane à 0.45% ne montre aucune altération des tissus de peau. On note une structure normale de la couche cornée, des glandes sébacées et une absence de la kératose pilaire des follicules pileux témoignant l'existence d'un effet réparateur.

On constate également une diminution d'infiltration des cellules inflammatoires, et une réduction de l'épaisseur d'épiderme dorsal de l'ordre de  $38,878\mu\text{m}$  (Fig.42, trait en rouge) ce qui nettement inférieure à celle enregistrée chez les souris sensibilisées par le DNCB ( $217,125\mu\text{m}$ ). (Fig.42)



**Figure 42.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris sensibilisée avec le DNCB et traitées avec la pommade à base de l'extrait dichlorométhanique de *P.hypotropa* 0.45%. (Gx100) (Barre d'échelle 100  $\mu\text{m}$ ). **FP:** follicule pileux pileux; **GC:** glande sébacée.



- **L'effet de l'extrait de dichlorométhane 0.76% sur la structure histologique de la peau**

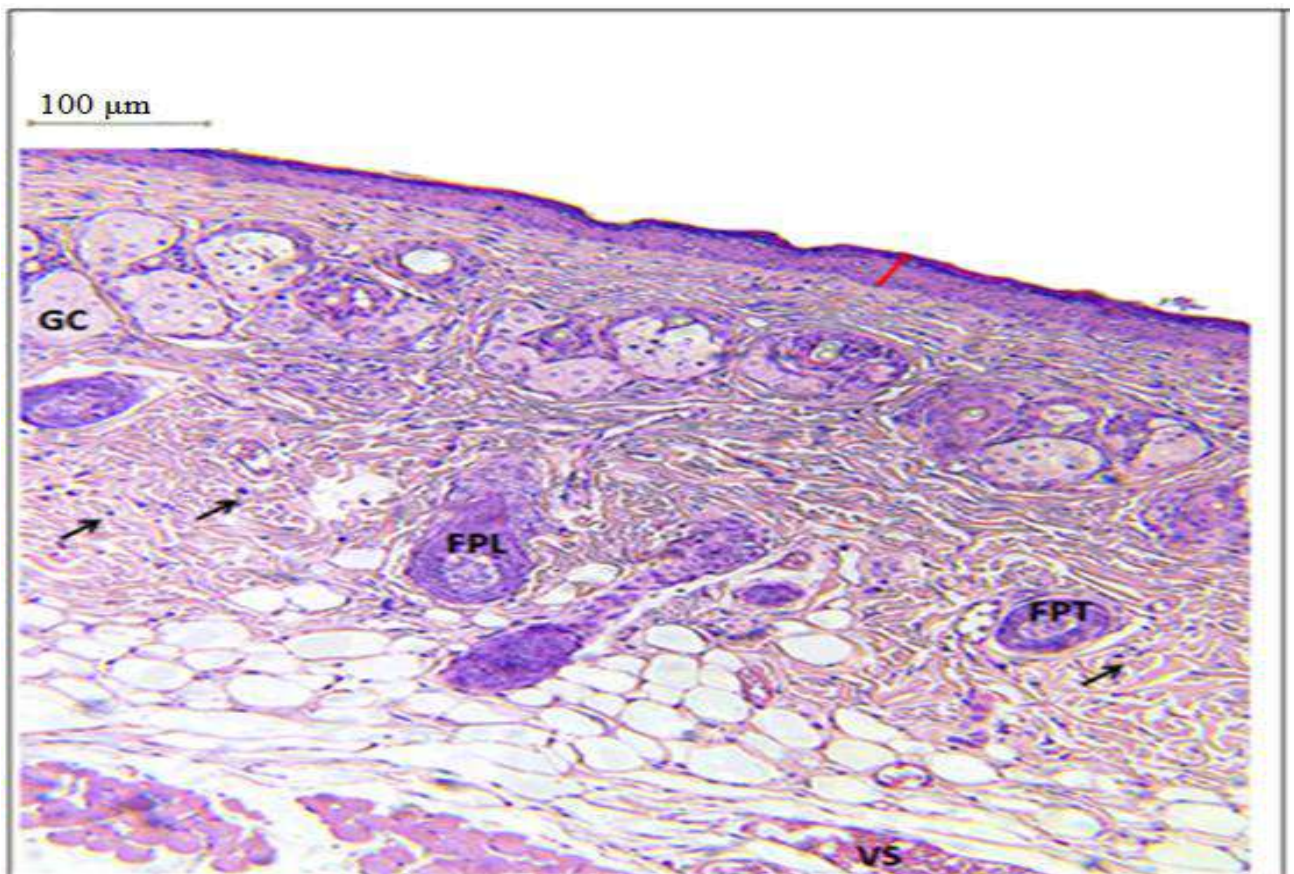
L'application topique de la pommade à base de l'extrait à 0.76% (l'équivalent de 0.05% de l'acide usnique) n'a pas eu d'effet sur la structure histologique de la peau. L'épaisseur épidermique est de l'ordre de 20,543µm, ce qui est similaire à celui des souris contrôles (Fig. 43; trait en rouge).



**Figure 43.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris traitée avec la pommade à base de l'extrait dichlorométhanique du lichen *P.hypotropa* à 0.76% pendant 14 jours. (Gx100) (Barre d'échelle 100 µm). **FP**: follicule pileux ; **GC**: glande sébacée.

- **L'effet de l'extrait de dichlorométhane 0.76% sur la structure histologique de la peau des souris sensibilisées au DNCB**

L'analyse histologique des coupes de la peau des souris sensibilisées par le DNCB et traitées avec l'extrait de dichlorométhane à 0.76% ne rapporte aucune altération du tissu épidermique. On note une structure normale de la couche cornée, des follicules pileux et des glandes sébacées témoignant l'existence d'un effet réparateur. L'application de l'extrait sur des souris sensibilisées entraîne une diminution d'infiltration des cellules inflammatoires, et une réduction des lésions de kératose pilaire. On constate également une réduction de l'épaisseur de peau dorsale. L'épaisseur épidermique est de l'ordre 38,889  $\mu\text{m}$  (Fig.44, trait en rouge) ce qui nettement inférieure à celle enregistrée chez les souris sensibilisées par le DNCB (217,125  $\mu\text{m}$ ). (Fig.44)

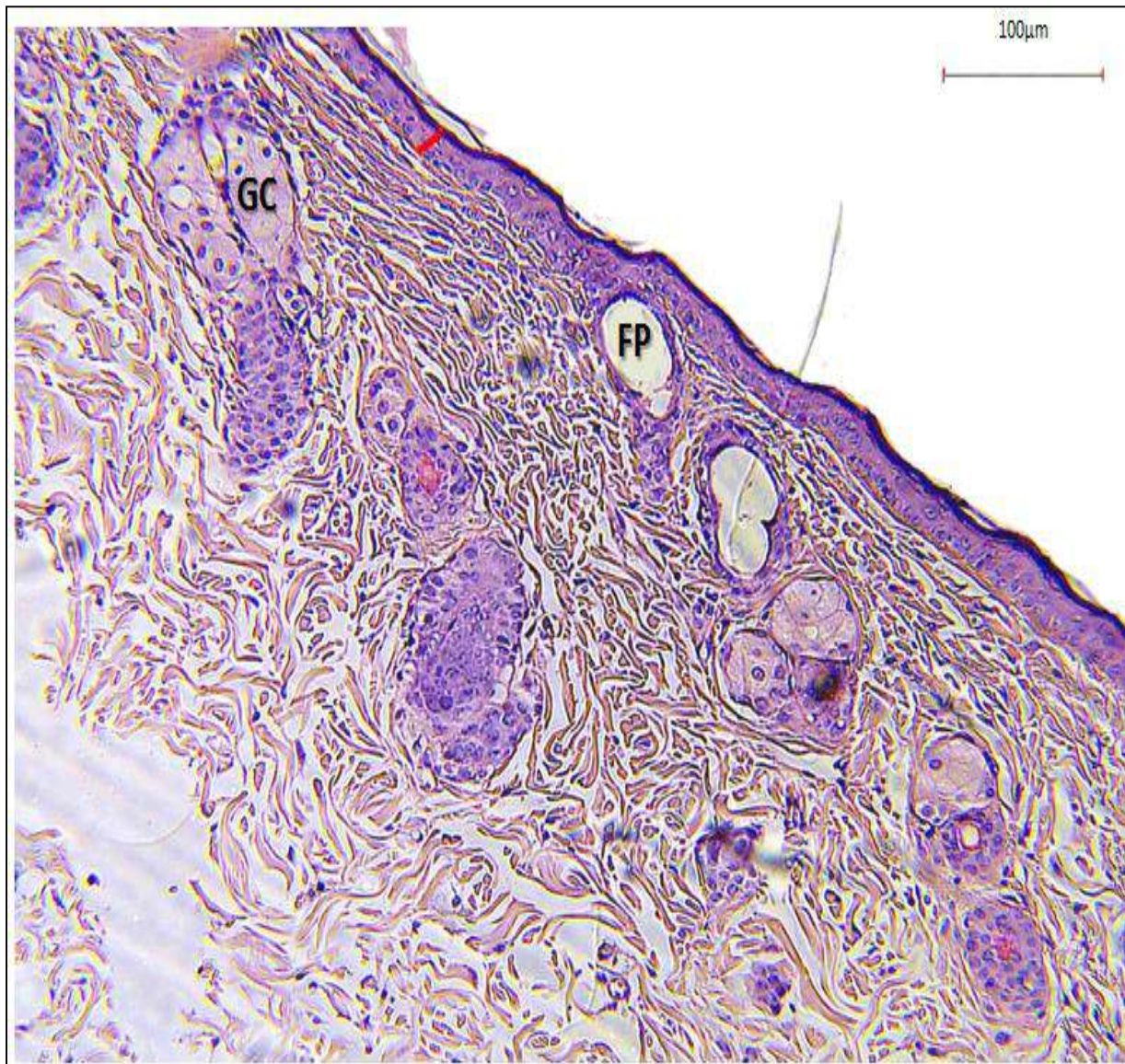


**Figure 44.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris sensibilisée avec le DNCB et traitée avec la pommade à base de l'extrait dichlorométhanique de *P.hypotropa* 0.76 %. (Gx100) (Barre d'échelle 100  $\mu\text{m}$ ). **FPL**: follicule pileux longitudinal; **FPT**: follicule pileux transversal; **GC**: glande sébacée; **VS** : vaisseau sanguin.



- **L'effet d'acide usnique sur la structure histologique de la peau des souris**

L'application de l'acide usnique à 0.05% n'a mis en évidence aucune modification structurale sur la peau, l'épaisseur épidermique est d'environ 19,476 $\mu$ m (Fig.45, trait en rouge) ce qui est comparable à celle du contrôle (Fig. 45).

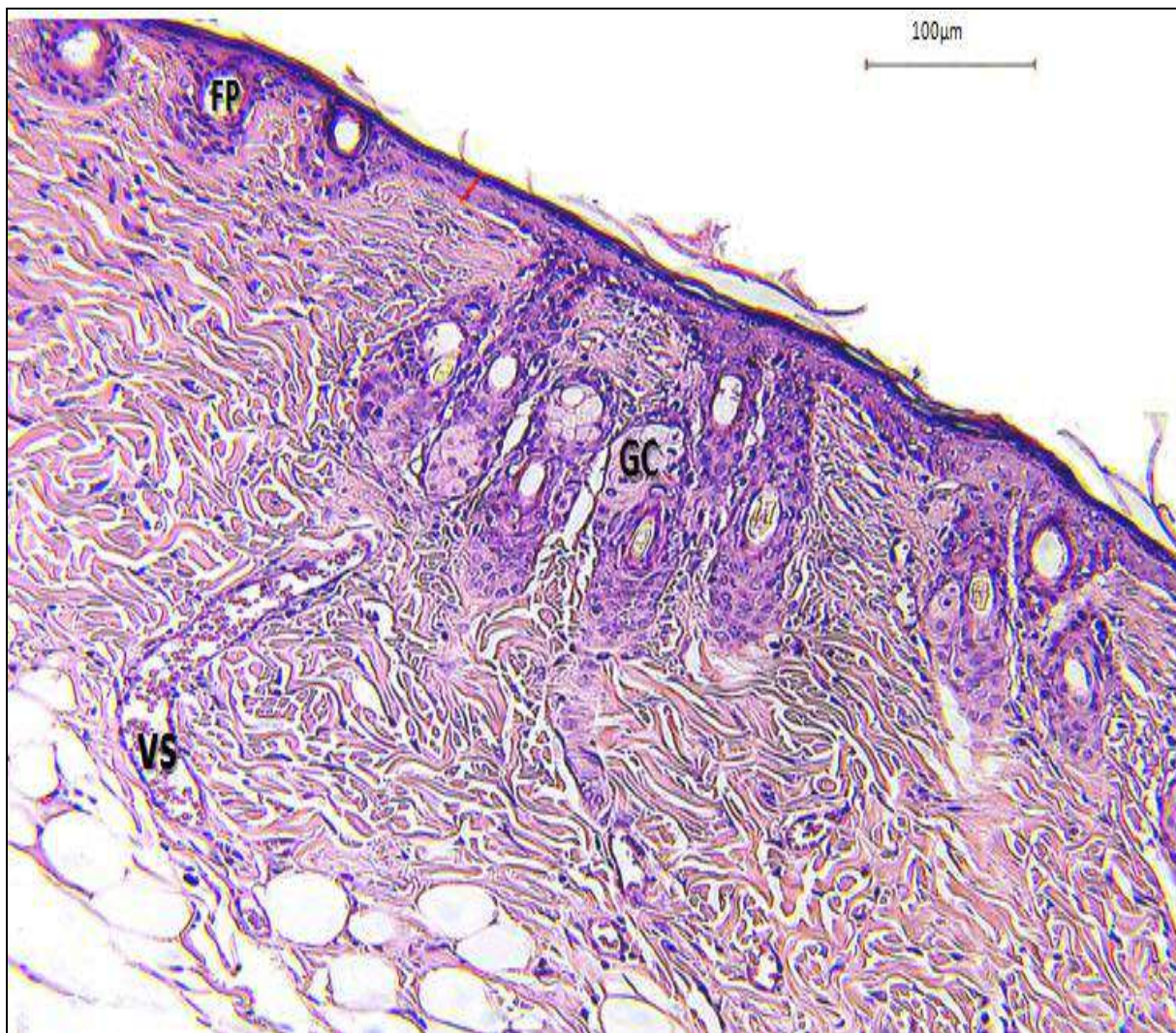


**Figure 45.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris traitée avec la pommade à base d'acide usnique 0.05% pendant 14 jours. (Gx100) (Barre d'échelle 100 $\mu$ m). **FP:** follicule pileux ; **GC:** glande sébacée.



- **L'effet d'acide usnique sur la structure histologique de la peau des souris sensibilisées par le DNCB**

L'application de la pommade à base d'acide usnique (0.05%) révèle une réparation du tissu épidermique significative (21,322  $\mu\text{m}$ ) comparativement aux souris traitées par le DNCB ((217,125  $\mu\text{m}$ ). On constate des aires claires sous forme circulaire, qui sont des follicules pileux après résolution de la kératose pilaire, une absence d'œdème (spongieuse) et des cellules inflammatoires (Fig. 46).

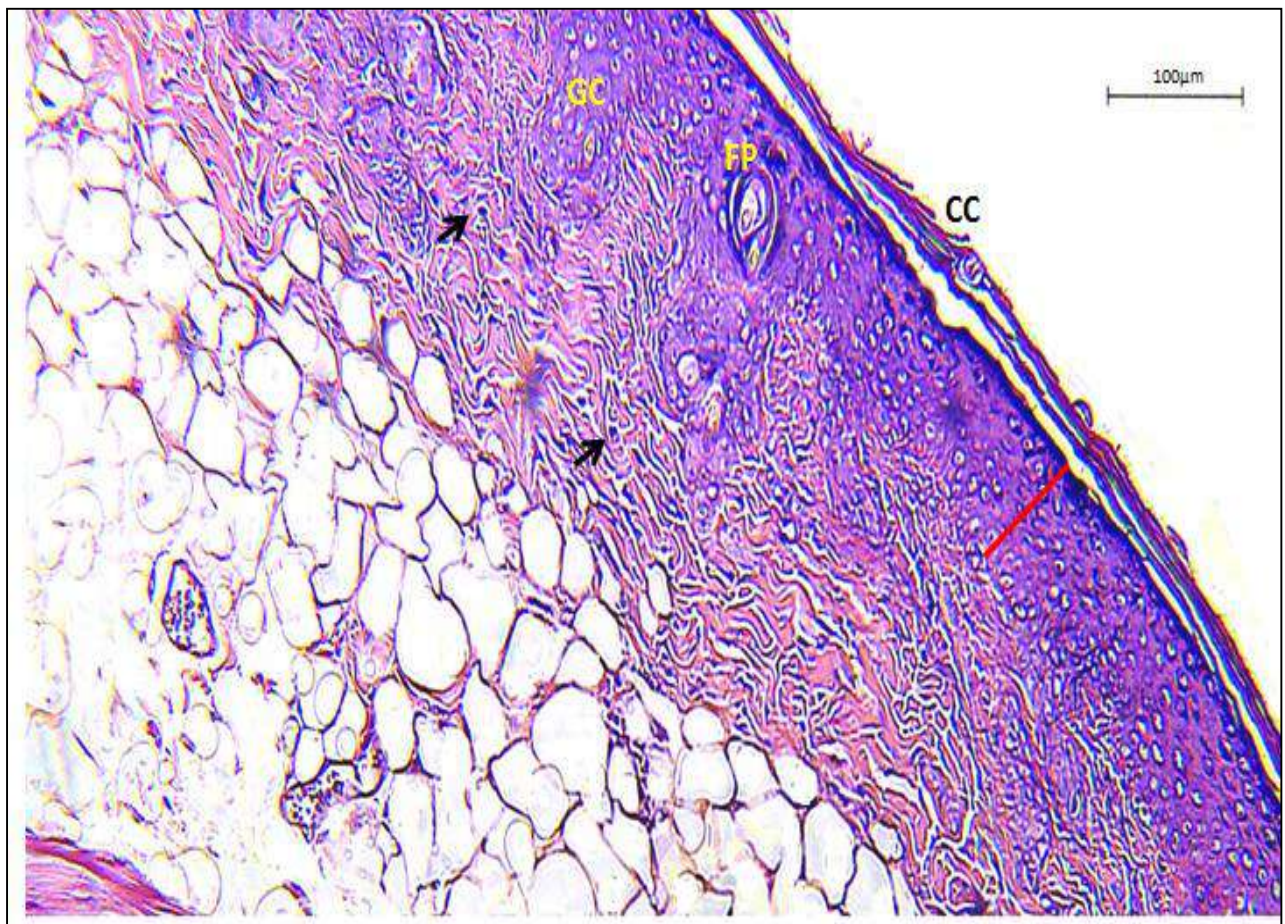


**Figure 46.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris sensibilisée au DNCB et traitée avec la pommade à base d'acide usnique (0.05%). (Gx100) (Barre d'échelle 100 $\mu\text{m}$ ). **FP**: follicule pileux ; **GC**: glande sébacée ; **VS** : vaisseau sanguin.



- **L'effet de Bétaméthasone (0.05%) sur la structure histologique de la peau des souris sensibilisées par le DNCB**

La figure 47 indique que l'application topique de la Bétasone (0.05%) sur des souris sensibilisées au DNCB diminue significativement l'épaisseur de l'épiderme à 66,911µm, l'hyperkératose et l'infiltration des cellules inflammatoires (Fig.47, flèche noire) par rapport aux souris sensibilisées au DNCB. On note également la disparition des spongioles et une structure normale des follicules pileux (Fig. 47).



**Figure 47.** Coupe histologique de peau dorsale colorée avec l'HE, d'une souris sensibilisée avec le DNCB et traitée avec la Bétaméthasone 0.05%. (Gx100) (Barre d'échelle 100µm). **FP:** follicule pileux ; **GC:** glande sébacée; **CC :** couche cornée.

## 1. Caractérisation phytochimique

L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet antioxydant et anti-inflammatoire de l'extrait de dichlorométhane et d'éthanol de lichen *P.hypotropa* sur la dermatite atopique.

Les lichens sont utilisés en médecine traditionnelle pour soigner plusieurs maladies telles que les infections, la fièvre, la diarrhée, les convulsions et les plaies (Shukla *et al.*, 2010).

La première partie de cette étude a pour but de déterminer le taux des métabolites secondaires dans les deux extraits de lichen. Nos résultats montrent que l'extrait éthanolique a enregistré le meilleur rendement d'extraction total (RET%) par rapport au dichlorométhane. Les solvants utilisés dans l'extraction ont un grand effet sur le rendement de l'extraction, selon leurs polarités et leurs capacités à solubiliser les substances actives présentes dans l'échantillon (Dai et Mumper, 2010).

Les deux extraits de *P.hypotropa* indiquent la présence des polyphénols et des flavonoïdes. Plusieurs études ont montré la présence des polyphénols et des flavonoïdes chez différents lichens du genre *Parmotrema* tels que *Parmotrema cetratum*, *Parmotrema reticulatum*, *Parmotrema rampoddense* et *Parmotrema praesorediosum* (Rajan *et al.*, 2016). Bouchenak *et al.* (2020) ont confirmé la richesse des lichens en polyphénols notamment l'acide thiophanique, la sterpséline, la ventosine, la pariétine, l'acide barbatique et l'acide diffractique. L'étude de Ghate *et al.* (2013) a révélé la présence de l'acide tannique, l'un des polyphénols, dans l'espèce *Parmotrema reticulatum* par une HPLC. Le criblage phytochimique de l'extrait éthanolique issu de l'espèce *P. reticulatum* a mis en évidence la présence des flavonoïdes (Jain *et al.*, 2016), la catéchine (flavonoïde) a été identifiée par HPLC dans l'espèce *Parmotrema reticulatum* (Ghate *et al.*, 2013). En revanche, notre extrait de dichlorométhane était plus riche en polyphénols et en flavonoïdes que l'extrait éthanolique. Le même résultat a été trouvé par Plaza *et al.* (2014) sur l'espèce du lichen *Thamnolia vermicularis*.

Les composés phénoliques représentent les métabolites secondaires majoritaires dans les lichens et jouent un rôle important dans les différentes fonctions biologiques. Ils sont composés de deux phénols monocycliques reliés soit par une liaison ester comme dans les depsides (comme l'acide evernique, squamatique et l'atranorine) soit par des liaisons ester et éther dans les depsidones ou une liaison hétérocycle furane comme dans les dibenzofuranes

tel que l'acide usnique qui est le métabolite secondaire caractéristique des lichens appartenant à différents genres des lichens (Kosanić et Ranković, 2019).

Dans cette étude les deux extraits de *P.hypotropa* ont montré la présence d'acide usnique où l'extrait de dichlorométhane était plus riche en acide usnique que l'extrait éthanolique. Rajan *et al.* (2016) ont confirmé la présence d'acide usnique chez *Parmotrema sp*, plusieurs études confirment la production d'acide usnique dans différents espèces de lichens (Saha *et al.*, 2021).

La différence des taux de métabolites secondaires entre nos deux extraits peut-être à cause du choix de solvants et les différents niveaux de solubilité dans chaque extrait, où le dichlorométhane semble être meilleur que l'éthanol, comme par exemple, cette différence peut être expliquée par les conditions environnementales durant la récolte. L'étude d'Aoussar *et al.* (2020) au Maroc sur l'effet de la saison de récolte de différentes espèces de lichens sur la teneur en phénols a montré que le choix de la saison a un effet significatif sur le taux des polyphénols et des flavonoïdes et que la meilleure saison pour un bon rendement pour ces lichens est le printemps.

## **2. L'activité antioxydante de *P.hypotropa***

A l'heure actuelle, il existe différentes méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante et du stress oxydant, mais elles ne sont pas standardisées et aucune d'elles n'est adoptée afin de tester l'effet antioxydant de manière précise. Pour cette raison, l'utilisation de différentes méthodes complémentaires telles que DPPH, ABTS, CUPRAC et blanchiment de  $\beta$ -carotène a été nécessaire lors de l'étude de nos extraits de *P.hypotropa*.

Nos résultats révèlent que les deux extraits possèdent une activité antioxydante modérée par rapport aux standards, au même temps l'activité d'extrait dichlorométhane est plus élevée que l'extrait éthanolique. Plusieurs études ont confirmé l'activité antioxydante de différents lichens (Mitrović *et al.*, 2014; Jha *et al.*, 2017); Raj *et al.* (2014) ont montré que l'espèce *Parmotrema tinctorum* a exercé une activité antioxydante modérée contre le DPPH ( $IC_{50} = 396.83 \pm 2.98 \mu\text{g/mL}$ ) et l'ABTS ( $IC_{50} = 30.29 \pm 1.17 \mu\text{g/mL}$ ).

Dans un autre côté, plusieurs études ont constaté une activité antioxydante significative par les lichens (Zambare et Christopher, 2012), cette différence de capacité antioxydante entre les lichens peut être expliquée par les effets synergiques ou antagonistes entre les composés présents dans les extraits (Ravaglia *et al.*, 2014).

Les extraits de lichens ont été connus pour leurs propriétés antioxydantes en raison de leur contenu phénolique (Fernández *et al.*, 2016). Plusieurs études ont prouvé l'effet antioxydant des différents composés phénoliques de lichens du genre *Parmotrema sp* tels que l'atranorine, l'acide orsénillique, l'orsénillate de méthyle, l'acide lécanorique et l'acide usnique (Jayaprakasha et Rao, 2000; Rajan *et al.*, 2016). L'acide usnique bloque la formation des radicaux superoxydes  $O_2^-$ , il est capable de capturer les ions de fer ( $Fe^{2+}$ ); il a montré une très bonne activité antioxydante via les tests DPPH, ABTS et CUPRAC (Cakmak et Gülçin, 2019). De même, Maulidiyah *et al.* (2021) ont rapporté une forte activité de piégeage des radicaux libres par l'acide usnique isolé de lichen *Usnea sp* avec une valeur  $IC_{50}$  de 7,12  $\mu\text{g/ml}$ .

L'acide usnique est l'un des antioxydants importants des lichens en raison de sa richesse en phénols et sa capacité à piéger les radicaux libres par le don des électrons ou des atomes d'hydrogène de leurs groupes hydroxyle (Cakmak et Gülçin, 2019).

En fait, une relation étroite entre le contenu phénolique total et l'activité antioxydante a été confirmée par multiples études (Hodzic *et al.*, 2005 ; Poornima *et al.*, 2017). Nos résultats sont en corrélation avec ces données, où le dichlorométhane a une activité antioxydante plus élevée et il est plus riche en acide usnique, en polyphénols totaux et en flavonoïdes que l'extrait éthanolique.

### **3. L'activité anti-inflammatoire de *P.hypotropa***

Dans la deuxième partie de ce travail, l'effet anti-inflammatoire des deux extraits a été évalué par le test de dénaturation de la protéine BSA induite par la chaleur. Le processus de dénaturation des protéines est l'une des multiples causes induisant une réponse inflammatoire à travers la dégénérescence, la perte de fonctionnalité des tissus et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (Anyasor *et al.*, 2019). Nos résultats montrent que les deux extraits exercent un effet anti-inflammatoire de manière dose dépendante, en prévenant l'altération de la structure tridimensionnelle de protéine. Le même résultat a été constaté par Poornima *et al.* (2019) sur *Parmotrema austrosinense*.

Cette activité de nos extraits serait d'un grand intérêt thérapeutique pour les maladies inflammatoires de la peau notamment l'eczéma vu que les protéines comme la fillagrine, la loricrine, l'involucrine, la cornéodesmosine et la caspase sont impliquées dans le fonctionnement de la couche cornée et la protection de la peau. Ces protéines sont souvent exposées à des conditions externes (comme les rayons UV) ou internes (comme les



mutations génétiques) provoquant leur dénaturation. L'altération de la structure des protéines épidermiques entraîne une perte de fonction et une fragilité de la barrière physico-chimique de la peau générant une augmentation du pH cutané et une perte d'eau (Ait idir et Aissani, 2021).

D'autre part, l'activité anti-inflammatoire a été testée en mesurant l'effet des deux extraits sur l'inhibition des médiateurs inflammatoires (ROS, TNF- $\alpha$ ) sécrétés par les cellules HaCaT stimulées par LPS.

Les cellules de la lignée HaCaT stimulées par les LPS d'*E. coli* constitue un modèle commun pour l'évaluation des nouveaux traitements anti-inflammatoire contre plusieurs maladies telles que les maladies cutanées comme l'eczéma et le psoriasis (Bocheńska *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020). Lors des inflammations cutanées, les espèces réactives oxygénées (ERO) sont produites en excès par les kératinocytes et peuvent devenir toxiques pour les composants majeurs de la cellule (lipides, protéines et ADN) et entraîner plusieurs troubles (Albanesi *et al.*, 2005; Hussain *et al.*, 2016).

Nos résultats révèlent que la viabilité des cellules HaCaT n'a pas été affectée par les deux extraits testés, ce qui est en accord avec l'étude de Lohéziec-Le *et al.* (2013) qui a rapporté une faible cytotoxicité sur la même lignée par l'espèce *Lasallia pustulata* de lichen.

De plus, nos extraits de *P.hypotropa* ont montré une réduction significative des ROS intercellulaires produits par les cellules HaCaT stimulées. L'inhibition des ROS intracellulaires par des extraits de lichen a été rapportée dans des neuroblastomes (SH-SY5Y) traitées par *Parmotrema perlatum* (Sieteiglesias *et al.*, 2019).

D'autre part, le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire produite excessivement par plusieurs cellules cutanées, y compris les kératinocytes, après leur exposition à des agents extérieurs comme le LPS (Cheng *et al.*, 2008). Nos résultats ont montré une inhibition significative du TNF- $\alpha$  par les deux extraits de manière dose-dépendante. Des résultats similaires ont été trouvés sur des macrophages d'origine murine de la lignée cellulaire (RAW264.7) stimulées par le LPS et traitées par différents extraits de lichen (Kim *et al.*, 2020; Hong *et al.*, 2021).

La toxicité aiguë des deux extraits a été testée sur les larves d'*Artemia salina*. Les deux extraits ne révèlent aucune toxicité. Des résultats similaires ont été déclarés sur le lichen *Parmotrema wainioi* par Ravaglia *et al.* (2014).

Afin d'étudier l'effet thérapeutique du lichen sur la dermatite atopique nous avons choisi l'extrait du dichlorométhane vu qu'il présente les meilleures propriétés antioxydantes et anti inflammatoires.

La toxicité de cet extrait a été testée *in vivo* sur la peau des souris. Les résultats ont confirmé la non-toxicité de l'extrait du *P.hypotropa*.

Les souris traitées uniquement soit par la pommade à base d'extrait dichlorométhanique de *P.hypotropa* (à 0.76%, 0.45%) ou à base d'acide usnique (0.05%) pendant 15 jours n'ont montré aucune réaction allergique avec un score de lésion égale à zéro, sans aucune modification de structure de peau sur le plan histologique. Galanty *et al.* (2021) ont confirmé la non- toxicité d'acide usnique sur les cellules HaCaT et la possibilité de son application topique en toute sécurité. Une autre étude a montré que l'acide usnique n'avait pas un effet sur la viabilité des macrophages d'origine murine de la lignée cellulaire (RAW264.7) (Huang *et al.*, 2011).

L'observation macroscopique a montré que le traitement des souris avec le DNCB a entraîné des lésions épidermiques de score allergique 4 caractérisées par des démangeaisons, un épaissement de la peau, une rougeur, et des zones sèches et lésées. La sécheresse et la lésion de peau lors d'eczéma est due à la dégradation de la barrière cutanée en endommageant son organisation lipidique avec une baisse d'expression des jonctions serrées et donc l'altération du film protecteur de la couche cornée et l'augmentation de la perte d'eau qui s'accompagne d'une augmentation de la pénétration des antigènes qui provoque par la suite une surproduction des cytokines telles que les TSLP par les kératinocytes qui stimulent de manière directe ou indirectes les nerfs et provoquer le prurit (Langan *et al.*, 2020).

L'étude microscopique a illustré que le DNCB a provoqué une hyperkératose et une acanthose épidermique, une hyperkératose des follicules pileux, une spongiose épidermique et une infiltration des cellules inflammatoires. Lorsque l'épiderme est exposé à des agressions et des lésions répétitives, il provoque généralement une hyper-prolifération des kératinocytes et accélère leur maturation. Les kératinocytes ont également tendance à produire plus de kératine ce qui provoque une hyper-kératinisation des follicules pileux et une augmentation de l'épaisseur de la couche cornée (hyperkératose), l'épiderme devient hyperplasique appelé acanthose. Des œdèmes peuvent se manifester dans la phase aiguë de l'eczéma, également appelé spongiose sous forme d'un espace clair entre les kératinocytes, dans le cas d'un œdème sévère une formation des vésicules intra-épidermiques peuvent se former; contrairement à la

phase chronique où l'œdème se régresse (Novak-Bilić *et al.*, 2018). Aussi, la dermatite atopique se caractérise par une infiltration des éosinophiles, des mastocytes et des lymphocytes via les cytokines et les chimiokines sécrétées lors de l'eczéma tels que les TARC et le TNF- $\alpha$  qui stimule l'apparition des molécules d'adhésions sur la paroi interne des vaisseaux sanguins et aide à la migration des lymphocytes et granulocytes vers le site d'inflammation (Huang *et al.*, 2019; Bajgai *et al.*, 2021).

L'application topique des pommades à base de l'extrait de dichlorométhane (à 0.76% et 0.45%) sur les souris atteintes de dermatite atopique a révélé que l'extrait a réparé les lésions induites par le DNCB avec un score allergique égale à zéro, du point de vue histologique l'extrait de dichlorométhane a également diminué l'épaisseur de la peau et diminué l'infiltration des cellules, réparé l'hyperkératose des follicules pileux et éliminé la spongiose par rapport au contrôle négatif (DNCB) et même par rapport au traitement de référence (Bétaméthasone 0.05%).

Les mêmes résultats ont été observés chez les souris immunisées par le DNCB et traitées par l'acide usnique.

L'effet réparateur de notre pommade à base d'extrait de dichlorométhane ou même à base d'acide usnique peut s'expliquer par la formation d'un film protecteur sur l'épiderme en empêchant la perte d'eau (réhydratation de la peau) et l'entrée du DNCB ce qui a inhibé le processus de prolifération excessive des kératinocytes et donc la diminution de l'épaisseur de la peau et la production excessive de kératine au niveau des follicules pileux. Au même temps, la pommade a inhibé la production des cytokines et des médiateurs inflammatoires (effet prouvé précédemment; infiltration des cellules inflammatoires diminuée) ce qui a diminué l'afflux sanguin (diminution de la rougeur et absence de spongiose) et la compression des terminaisons nerveuses (absence de prurit).

En outre, nos résultats ont déjà montré que notre extrait de dichlorométhane a un effet antioxydant et une activité inhibitrice des ROS et TNF- $\alpha$  libérées par les kératinocytes, ce qui explique l'effet thérapeutique de notre extrait sur la dermatite atopique. Les kératinocytes jouent un rôle très important dans la dermatite atopique vu qu'elles sont les cellules majoritaires de la couche superficielle de la peau et qui peuvent répondre à divers facteurs environnementaux en activant la réponse immunitaire. Les kératinocytes peuvent activer la réponse immunitaire innée et adaptative par l'activation des différentes cellules telles que les mastocytes, les éosinophiles, les macrophages et les lymphocytes par le biais des cytokines



libérées au cours d'une réponse inflammatoire (Choi *et al.*, 2021). Le TNF- $\alpha$  produit par les kératinocytes dans le cas de la dermatite atopique joue un rôle très important dans l'infiltration des cellules inflammatoires au derme et dans l'aggravation de cette pathologie (Yang *et al.*, 2021). En outre, le stress oxydatif est l'un des facteurs induisant les conditions inflammatoires de la dermatite atopique, y compris le dysfonctionnement de la barrière cutanée en modulant les gènes qui codent les cytokines pro-inflammatoires et les protéines structurelles de la peau. Les ROS dérivés de kératinocytes sont impliqués dans la pathogenèse de l'inflammation de type 2 dans la peau avec l'eczéma atopique, ils peuvent aussi activer la phosphorylation des voies de signalisation ERK et de P38 MAPK des cellules immunitaires comme les basophiles (Choi *et al.*, 2021).

Les propriétés anti-inflammatoires de l'extrait de *P.hypotropa* peuvent être attribuées à la présence d'acide usnique. Il a été rapporté que l'acide usnique inhibe les voies de signalisation TNF- $\alpha$  et NF- $\kappa$ B dans les cellules RAW264.7 stimulées par LPS. De même, ils modulent la fonction des macrophages en inhibant la production de cyclooxygénase-2 (COX-2), d'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et de TNF- $\alpha$  (Huang *et al.*, 2011). Les flavonoïdes sont également capables d'inhiber l'expression des cytokines et des chimiokines comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-8 dans plusieurs types de cellules comme les macrophages primaires de souris activés par le LPS et les cellules mononucléaires du sang périphérique humain (Sharma *et al.*, 2007).

### Conclusion et perspectives

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de l'effet antioxydant et anti-inflammatoire d'extraits de lichen Algérien sur la dermatite atopique, l'étude a commencé par une caractérisation phytochimique de l'extrait de dichlorométhane et d'éthanol de lichen *Parmotrema hypotropa*, puis nous avons testé leurs effets antioxydants et anti-inflammatoires via différentes méthodes *in vitro* (DPPH, ABTS, CUPRAC, inhibition de blanchiment de  $\beta$ -carotène, inhibition de dénaturation de l'albumine de sérum bovin « BSA », inhibition des ROS et TNF- $\alpha$  produits par les kératinocytes humains stimulés par les LPS), ensuite l'effet thérapeutique de *P.hypotropa* a été évalué *in vivo* sur un modèle de la dermatite atopique induite par le DNCB chez les souris BALB/c. Le lichen est utilisé en médecine traditionnelle pour traiter différentes maladies telles que les maladies respiratoires et cutanées.

L'étude phytochimique a montré que l'extrait de dichlorométhane de *P.hypotropa* est plus riche en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en acide usnique que l'extrait éthanolique de la même espèce.

Plusieurs techniques *in vitro* ont révélé que les deux extraits de dichlorométhane et d'éthanol présentent un intérêt potentiel par leurs activités antioxydantes. Dans un autre côté, l'extrait de dichlorométhane a exercé une meilleure activité antioxydante que l'extrait éthanolique.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* nous a permis de conclure que les deux extraits ont une activité anti-inflammatoire importante. Ils empêchent la dénaturation de la protéine BSA, et inhibent significativement la production des ROS et TNF- $\alpha$  libérés par les kératinocytes (HaCaT) stimulés par les LPS.

Les deux extraits n'ont entraîné aucun effet toxique, soit sur la viabilité des cellules HaCaT ou sur les larves d'*Artemia salina*.

L'étude de la dermatotoxicité de l'extrait dichlorométhanique de *P.hypotropa* a permis de conclure que l'application topique de pommade à base d'extrait dichlorométhanique à 0.76% et 0.45% ne présentent aucun effet indésirable sur la peau des souris.

## Conclusion et Perspectives

---

Les résultats des scores de lésions et l'étude des coupes histologiques de l'effet de l'extrait dichlorométhanique de *P.hypotropa* sur la dermatite atopique induite par le DNCB ont montré que cet extrait a un effet thérapeutique contre la dermatite atopique. Il a diminué l'hyperkératose, l'acanthose, la kératose pilaire, la spongiose et l'infiltration des cellules inflammatoires par rapport aux souris sensibilisées avec le DNCB. Les deux pommades à base d'extrait dichlorométhanique à 0.76% et à 0.45% ont montré une activité similaire à la pommade à base de notre molécule de référence l'acide usnique à 0.05% ; et une bonne activité par rapport au traitement de référence la pommade Bétaméthasone 0.05%.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude nous permettons de conclure que notre lichen *P.hypotropa* peut constituer une nouvelle source naturelle avec un potentiel antioxydant et anti-inflammatoire pour atténuer les lésions cutanées de la dermatite atopique sans effets secondaires. Donc le lichen pourrait être exploité comme une nouvelle approche thérapeutique pour la dermatite atopique.

Ce travail, constitue une première étape dans la recherche des nouvelles substances biologiquement actives de source naturelle. A l'avenir il serait intéressant de compléter l'étude par des tests de l'effet du lichen étudié sur l'infiltration et l'activation des mastocytes, des éosinophiles et la production des IgE, IL-33, TLPS, et d'autres cytokines et cellules responsable de l'activité immunologique et allergique de la peau. Par ailleurs, d'étudier l'effet de l'acide usnique et d'autres composés de *P. hypotropa* sur les différentes activités biologiques *in vitro* et *in vivo* telles que l'activité antimicrobienne, antifongique, anti-inflammatoire et anti-tumorale.

# *Références*

## REFERENCES



- Abraham, J., & Mathew, S. (2019). Merkel cells: a collective review of current concepts. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 9(1), 9.
- Abramovits, W. (2005). Overview of inflammatory skin diseases-the latest findings in cellular biology. *Atopic dermatitis*, 53(1), 86-93.
- Agrawal, R., & Woodfolk, J. A. (2014). Skin barrier defects in atopic dermatitis. *Current allergy and asthma reports*, 14(5), 433.
- Ait idir, K & Aissani, S. (2021). Facteurs Influençant la physiopathologie de la dermatite atopique. *Revue algerienne d'allergologie*, 6 (1), 3-9.
- Albanesi, C., Scarponi, C., Giustizieri, M. L., & Girolomoni, G. (2005). Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 4(3), 329-334.
- Al-Shobaili, H. A., Ahmed, A. A., Alnomair, N., Alobead, Z. A., & Rasheed, Z. (2016). Molecular genetic of atopic dermatitis: an update. *International journal of health sciences*, 10(1), 96.
- Anyasor, G. N., Okanlawon, A. A., & Ogunbiyi, B. (2019). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Justicia secunda* Vahl leaf extract using in vitro and in vivo inflammation models. *Clinical Phytoscience*, 5(1), 1-13.
- Aoussar, N., Rhallabi, N., Mhand, R. A., Manzali, R., Bouksaim, M., Douira, A., & Mellouki, F. (2020). Seasonal variation of antioxidant activity and phenolic content of *Pseudevernia furfuracea*, *Evernia prunastri* and *Ramalina farinacea* from Morocco. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 19(1), 1-6.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Bekdeşer, B., & Bener, M. (2014). The CUPRAC methods of antioxidant measurement for beverages. In *Processing and impact on antioxidants in beverages* Ed.1, (235-244).

- 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*, Ed.1, (227-244).
- Arulvasu, C., Jennifer, S. M., Prabhu, D., & Chandhirasekar, D. (2014). Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp *Artemia*. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-10.

## B

- Bajgai, J., Fadriqela, A., Ara, J., Begum, R., Ahmed, M. F., Kim, C. S., ...& Lee, K. J. (2017). Balneotherapeutic effects of high mineral spring water on the atopic dermatitis-like inflammation in hairless mice via immunomodulation and redox balance. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1-9.
- Bajgai, J., Xingyu, J., Fadriqela, A., Begum, R., Kim, D. H., Kim, C. S., ... & Lee, K. J. (2021). Effects of mineral complex material treatment on 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis like-skin lesions in mice model. *BMC complementary medicine and therapies*, 21(1), 1-13.
- Bertino, L., Guarneri, F., Cannavò, S. P., Casciaro, M., Pioggia, G., & Gangemi, S. (2020). Oxidative stress and atopic dermatitis. *Antioxidants*, 9(3), 196.
- Bocheńska, K., Smolińska, E., Moskot, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., & Gabig-Cimińska, M. (2017). Models in the research process of psoriasis. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2514.
- Boguniewicz, M., & Leung, D. Y. (2010). Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(1), 4-13.
- Bouchenak, O., Boumaza, S., Yahiaoui, K., Benhabyles, N., Laoufi, R., Toubal, S., ... & Karim, A. R. A. B. (2020). Evaluation de l'activité antioxydante et l'effet antimicrobien des composés phénoliques extraits du lichen «*Xanthoria parietina*» de la région de Boumerdes. *Revue des bio ressources*, 10(1), 13-13.
- Boussadia, A., Beghidja, A., Gali, L., Beghidja, C., Elhabiri, M., Rabu, P., & Rogez, G. (2020). Coordination properties of two new Schiff-base phenoxy-carboxylates and

comparative study of their antioxidant activities. *Inorganica Chimica Acta*, 508, 119656.

- Brown, S. J., & McLean, W. I. (2009). Eczema genetics: current state of knowledge and future goals. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(3), 543-552.

## C

- Cakmak, K. C., & Gülçin, İ. (2019). Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid-An activity-structure insight. *Toxicology reports*, 6, 1273-1280.
- 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.
- Cheng, H. M., Hsiang, C. Y., Chen, G. W., Wu, S. L., Chen, J. C., Huang, C. Y., ... & Ho, T.Y. (2008). Inhibition of lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha production by menthone through nuclear factor-kappaB signaling pathway in HaCat cells. *Chinese Journal of Physiology*, 51(3), 160-166.
- Choi, D. I., Park, J. H., Choi, J. Y., Piao, M., Suh, M. S., Lee, J. B., ... & Lee, S. C. (2021). Keratinocytes-Derived Reactive Oxygen Species Play an Active Role to Induce Type 2 Inflammation of the Skin: A Pathogenic Role of Reactive Oxygen Species at the Early Phase of Atopic Dermatitis. *Annals of Dermatology*, 33(1), 26.
- Chu, D.H. (2008). Overview of biology, development, and structure of skin. In K. Wolff, L.A. Goldsmith, S.I. Katz, B.A. Gilchrest, A.S. Paller, & D.J. Leffell (Eds.), *Fitzpatrick's dermatology in general medicine* (7th ed., pp. 57–73). New York: McGraw-Hill.

## D

- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Darvesh, A. S., Carroll, R. T., Bishayee, A., Geldenhuys, W. J., & Van der Schyf, C. J. (2010). Oxidative stress and Alzheimer's disease: dietary polyphenols as potential therapeutic agents. *Expert review of neurotherapeutics*, 10(5), 729-745.
- De La Torre Noetzel, R., Miller, A. Z., de la Rosa, J. M., Pacelli, C., Onofri, S., Garcia Sancho, L., ... & De Vera, J. P. (2018). Cellular responses of the lichen *Circinaria gyrosa* in Mars-like conditions. *Frontiers in Microbiology*, 9, 308.

## E

- Emmert, H., Fonfara, M., Rodriguez, E., & Weidinger, S. (2020). NADPH oxidase inhibition rescues keratinocytes from elevated oxidative stress in a 2D atopic dermatitis and psoriasis model. *Experimental Dermatology*, 29(8), 749-758.
- Esche, C., de Benedetto, A., & Beck, L. A. (2004). Keratinocytes in atopic dermatitis: inflammatory signals. *Current allergy and asthma reports*, 4(4), 276-284.

## F

- Fahad, D., & Mohammed, M. T. (2020). Oxidative stress: implications on skin diseases. *Plant Archives*, 20(2), 4150-4157
- Fernández-Moriano, C., Gómez-Serranillos, M. P., & Crespo, A. (2016). Antioxidant potential of lichen species and their secondary metabolites. A systematic review. *Pharmaceutical Biology*, 54(1), 1-17.

## G

- Galanty, A., Popiół, J., Paczkowska-Walendowska, M., Studzińska-Sroka, E., Paško, P., Cielecka-Piontek, J., ... & Podolak, I. (2021). (+)-Usnic Acid as a Promising Candidate for a Safe and Stable Topical Photoprotective Agent. *Molecules*, 26(17), 5224.
- Gali, L., & Bedjou, F. (2019). Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *South African Journal of Botany*, 120, 163-169.
- Garneau de L'Isle-Adam, M. C. (2020). Petite ou grosse vérole?-Le Curé de village, un roman balzacien ambigu. *Revue Balzac*, 2020(3), 131-147.
- Ghate, N. B., Chaudhuri, D., Sarkar, R., Sajem, A. L., Panja, S., Rout, J., & Mandal, N. (2013). An antioxidant extract of tropical lichen, *Parmotrema reticulatum*, induces cell cycle arrest and apoptosis in breast carcinoma cell line MCF-7. *PloS one*, 8(12), e82293.
- Gilaberte, Y., Prieto-Torres, L., Pastushenko, I., & Juarranz, Á. (2016). Anatomy and Function of the Skin. *Nanoscience in Dermatology* (pp. 1-14). Academic Press.



- Goga, M., Elečko, J., Marcinčinová, M., Ručová, D., Bačkorová, M., & Bačkor, M. (2020). Lichen metabolites: an overview of some secondary metabolites and their biological potential. *Co-evolution of secondary metabolites*, Ed.1, (175-209).
- Gómez-Serranillos, M. P., Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E., Divakar, P. K., & Crespo, A. (2014). Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential and phylogenetic features. *RSC Advances*, 4(103), 59017-59047.
- Gould, J. (2018). Superpowered skin. *Nature*, 563(7732), 84-84.
- Guo, L. (2009). Understanding the cellular basis of skin growth. *Biomaterials for treating skin loss*. Woodhead Publishing, Ed.1, (pp. 80-86).

## H

- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P. (2007). Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.
- Hebert, A. A. (2020). Oxidative stress as a treatment target in atopic dermatitis: The role of furfuryl palmitate in mild-to-moderate atopic dermatitis. *International Journal of Women's Dermatology*, 6(4), 331.
- Hendricks, A. J., Eichenfield, L. F., & Shi, V. Y. (2020). The impact of airborne pollution on atopic dermatitis: a literature review. *British Journal of Dermatology*, 183(1), 16-23.
- Hodzic, Z., Pasalic, H., Memisevic, A., Srabovic, M., Saletovic, M., & Poljakovic, M. (2009). The influence of total phenols content on antioxidant capacity in the whole grain extracts. *European Journal of Scientific Research*, 28(3), 471-477.
- Hong, J. M., Kim, J. E., Min, S. K., Kim, K. H., Han, S. J., Yim, J. H., ... & Kim, I. C. (2021). Anti-Inflammatory Effects of Antarctic Lichen Umbilicaria antarctica Methanol Extract in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophage Cells and Zebrafish Model. *BioMed research international*, 2021(2), 1-12.
- Hsu, J. I., Pflugfelder, S. C., & Kim, S. J. (2019). Ocular complications of atopic dermatitis. *Cutis*, 104(3), 189-193.
- Huang, W. C., Huang, C. H., Hu, S., Peng, H. L., & Wu, S. J. (2019). Topical spilanthol inhibits MAPK signaling and ameliorates allergic inflammation in DNCB-induced atopic dermatitis in mice. *International journal of molecular sciences*, 20(10), 2490.

- Huang, Z., Zheng, G., Tao, J., & Ruan, J. (2011). Anti-inflammatory effects and mechanisms of usnic acid. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.*, 26(5), 955-959.
- Hussain, T., Tan, B., Yin, Y., Blachier, F., Tossou, M. C., & Rahu, N. (2016). Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016 (9),1-9.

## I

- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.

## J

- Jain, A. P., Bhandarkar, S., Rai, G., Yadav, A. K., & Lodhi, S. (2016). Evaluation of Parmotrema reticulatum taylor for antibacterial and antiinflammatory activities. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(1), 94.
- James, W.D., Berger, T.G., & Elston, D.M. (2006). Andrews' diseases of the skin: *clinical dermatology*. Ed.10,(465-472).
- Jayaprakasha, G. K., & Rao, L. J. (2000). Phenolic constituents from the lichen Parmotrema stippeum (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(11-12), 1018-1022.
- Jha, B. N., Shrestha, M., Pandey, D. P., Bhattarai, T., Bhattarai, H. D., & Paudel, B. (2017). Investigation of antioxidant, antimicrobial and toxicity activities of lichens from high altitude regions of Nepal. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 1-8.
- Ji, H., & Li, X. K. (2016). Oxidative stress in atopic dermatitis. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016(2), 1-8.
- Johansen, C. (2017). Generation and culturing of primary human keratinocytes from adult skin. *Journal of Visualized Experiments*, (130), 56863.

## K

- Kabashima, K., Honda, T., Ginhoux, F., & Egawa, G. (2019). The immunological anatomy of the skin. *Nature Reviews Immunology*, 19(1), 19-30.
- Kandikattu, K, Bharath Rathna Kumar P, Venu Priya R, Sunil Kumar k, RanjithSingh B Rathore. (2013). Evaluation of anti-inflammatory activity of canthium parviflorum by in-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*. 1(5): 729-730.
- Kim, J. E., Min, S. K., Hong, J. M., Kim, K. H., Han, S. J., Yim, J. H., ... & Kim, I. C. (2020). Anti-inflammatory effects of methanol extracts from the Antarctic lichen, *Amandinea* sp. in LPS-stimulated raw 264.7 macrophages and zebrafish. *Fish & Shellfish Immunology*, 107, 301-308.
- Kolarsick, P. A., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and physiology of the skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203-213.
- Kosanić, M., & Ranković, B. (2019). Studies on antioxidant properties of lichen secondary metabolites. In *Lichen Secondary Metabolites*, 2,129-153.
- Ku, J. M., Hong, S. H., Kim, S. R., Choi, H. S., Kim, H. I., Kim, D. U., ... & Ko, S. G. (2018). The prevention of 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced inflammation in atopic dermatitis-like skin lesions in BALB/c mice by Jawoongo. *BMC complementary and alternative medicine*, 18(1), 1-15.

## L

- Lahouel, M., Lahouel, I., Belhadjali, H., Ben Hammouda, M., Youssef, M., & Zili, J. (2020). A comparative case-control study of diagnostic criteria for atopic dermatitis and proposal of new diagnostic criteria from Tunisia. *International Journal of Dermatology*, 59(8), 962-968.
- Lang, C., Kypriotou, M., & Christen-Zaech, S. (2010). Pathogenèse de la dermatite atopique. *Rev Med Suisse*, 6, 860-865.
- Langan, S. M., Irvine, A. D., & Weidinger, S. (2020). Atopic dermatitis. *Lancet (London, England)*, 396(10247), 345–360.
- Lawton, S. (2019). Skin 1: the structure and functions of the skin. *Nurs. Times*, 115, 30-33.

- Le Pogam-Alluard, P. (2016). *Analyses de lichens par spectrométrie de masse: dérégulation et histolocalisation* (Thèse de doctorat, Université Rennes 1).
- Lee, Y., Choi, H. K., N'deh, K. P. U., Choi, Y. J., Fan, M., Kim, E. K., ... & An, J. H. (2020). Inhibitory effect of *Centella asiatica* extract on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice. *Nutrients*, *12*(2), 411.
- Lohézic-Le Dévéhat, F., Legouin, B., Couteau, C., Boustie, J., & Coiffard, L. (2013). Lichenic extracts and metabolites as UV filters. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *120*, 17-28.
- Lü, L., Joshi, Y., Elix, J., Lumbsch, H., Wang, H., Koh, Y., & Hur, J. (2011). New and noteworthy species of the lichen genus *Lecanora* (Ascomycota; Lecanoraceae) from South Korea. *The Lichenologist*, *43*(4), 321-329.
- Lutzoni, F., & Miadlikowska, J. (2009). Lichens. *Current Biology*, *19*(13), 502-503.

## M

- Maulidiyah, M., Darmawan, A., Ahmad, E., Musdalifah, A., Wibowo, D., Arham, Z., ... & Nurdin, M. (2021). Antioxidant activity-guided isolation of usnic acid and diffractaic acid compounds from lichen genus *Usnea* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *11*(2), 075-083.
- Mazouz, W., Haouli, N. E. H., Gali, L., Vezza, T., Bensouici, C., Mebrek, S., ... & Djeddi, S. (2020). Antioxidant, anti-alzheimer, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities of the endemic halophyte *Limonium spathulatum* (Desf.) kuntze on LPS-stimulated RAW264 macrophages. *South African Journal of Botany*, *135*, 101-108.
- Mitrović, T., Stamenkovic, S., Cvetkovic, V., Radulovic, N., Mladenovic, M., Stankovic, M., ... & Comic, L. (2014). *Platismatia glauca* and *Pseudevernia furfuracea* lichens as sources of antioxidant, antimicrobial and antibiofilm agents. *EXCLI journal*, *13*, 938.
- 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.
- Mouffouk, S., Mouffouk, C., Bensouici, C., & Haba, H. (2020). In vitro Cytotoxic Effect, Hemolytic, and Antioxidant Activities of the Algerian Species *Nonea vesicaria* Rchb. *Current Bioactive Compounds*, *16*(8), 1197-1204.
- Mouillère-gonnet, D. (2008). Le monde original des Lichens. *Bulletin d'informations-Association française de lichénologie*, *33*(1), 55-61.
- Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A. M., & Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and

related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 992-999.

- Musa, K. H., Abdullah, A., Kuswandi, B., & Hidayat, M. A. (2013). A novel high throughput method based on the DPPH dry reagent array for determination of antioxidant activity. *Food chemistry*, 141(4), 4102-4106.

## N

- Novak-Bilić, G., Vučić, M., Japundžić, I., Meštrović-Štefekov, J., Stanić-Duktaj, S., & Lugović-Mihić, L. (2018). Irritant and allergic contact dermatitis–skin lesion characteristics. *Acta Clinica Croatica*, 57(4.), 713-719.
- Nutten, S. (2015). Atopic dermatitis: global epidemiology and risk factors. *Annals of nutrition and metabolism*, 66(1), 8-16.

## O

- Ozenda, P. (2000). *Les végétaux: organisation et diversité biologique*. Ed :Dunod. P.528

## P

- Peng, W., & Novak, N. (2015). Pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Allergy*, 45(3), 566-574.
- Pitocco, D., Zaccardi, F., Di Stasio, E., Romitelli, F., Santini, S. A., Zuppi, C., & Ghirlanda, G. (2010). Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *The review of diabetic studies: RDS*, 7(1), 15.
- Plaza, C. M., de Torres, L. E. D., Lücking, R. K., Vizcaya, M., & Medina, G. E. (2014). Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan Andes. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 2(5), 138-147.
- Poornima, S., Nagarjun, N., Ponmurugan, P., Gnanamangai, B. M., & Narasimman, S. (2019). Toxicity and anti-inflammatory study of Parmotrema austrosinense extract against oxozalone induced intestinal inflammation in zebrafish (Danio rerio) model. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101278.
- Poornima,S., Ponmurugan ,P., Gnanamangai, B. M., Nagarjun N. (2017). Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Activities of Few Macrolichens Collected From Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. *Int Res J Pharm*,8, 39-43.

## Q

- Qin, Y. (2016). *A brief description of the human body. Medical Textile Materials*, Ed. Woodhead1, (1–12).

## R

- Raj, P. S., Prathapan, A., Sebastian, J., Antony, A. K., Riya, M. P., Rani, M. P., ... & Raghu, K. G. (2014). Parmotrema tinctorum exhibits antioxidant, antiglycation and inhibitory activities against aldose reductase and carbohydrate digestive enzymes: an in vitro study. *Natural Product Research*, 28(18), 1480-1484.
- Rajan, V. P., Gunasekaran, S., Ramanathan, S., Murugaiyah, V., Samsudin, M. W., & Din, L. B. (2016). Biological activities of four Parmotrema species of Malaysian origin and their chemical constituents. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(8), 36-43.
- Ranković, B., & Kosanić, M. (2015). Lichen secondary metabolites. 2, 1-260.
- Rapa, S. F., Waltenberger, B., Di Paola, R., Adesso, S., Siracusa, R., Peritore, A. F., ... & Marzocco, S. (2020). Plumericin prevents intestinal inflammation and oxidative stress in vitro and in vivo. *The FASEB Journal*, 34(1), 1576-1590.
- Ravaglia, L. M., Gonçalves, K., Oyama, N. M., Coelho, R. G., Spielmann, A. A., & Honda, N. K. (2014). In vitro radical-scavenging activity, toxicity against *A. salina*, and nmr profiles of extracts of lichens collected from Brazil and Antarctica. *Química Nova*, 37(6), 1015-1021.
- Roßbach, K., Köchling, H., Fukuyama, T., Wilzopolski, J., Kietzmann, M., & Bäumer, W. (2017). Assessment of the Efficacy of Histamine Receptor Antagonists in Murine Models of Atopic Dermatitis. In *Histamine Receptors as Drug Targets* (pp. 233-262). Humana Press, New York, NY.

## S

- Saha, S., Pal, A., & Paul, S. (2021). *A Review on Pharmacological, Anti-oxidant Activities and Phytochemical Constituents of a Novel Lichen Parmotrema Species. Journal of Biologically Active Products from Nature*, 11(3), 190–203.



- Sánchez-Borges, M., Capriles-Hulett, A., Ortega-Martell, J. A., & Zubeldia, I. A. (2019). New and potential treatments for atopic dermatitis: biologicals and small molecules. *Current Allergy and Asthma Reports*, 19(3), 1-9.
- Santovito, G., Trentin, E., Gobbi, I., Bisaccia, P., Tallandini, L., & Irato, P. (2021). Non-enzymatic antioxidant responses of *Mytilus galloprovincialis*: Insights into the physiological role against metal-induced oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 240, 108909.
- Sharma, V., Mishra, M., Ghosh, S., Tewari, R., Basu, A., Seth, P., & Sen, E. (2007). Modulation of interleukin-1beta mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: implications in neuroprotection. *Brain research bulletin*, 73(1-3), 55-63.
- Shukla, V., Joshi, G. P., & Rawat, M. S. M. (2010). Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry reviews*, 9(2), 303-314.
- Sieteiglesias, V., González-Burgos, E., Bermejo-Bescós, P., Divakar, P. K., & Gómez Serranillos, M. P. (2019). Lichens of parmelioid clade as promising multitarget neuroprotective agents. *Chemical Research in Toxicology*, 32(6), 1165-1177.
- Simpson, C. L., Patel, D. M., & Green, K. J. (2011). Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(9), 565–580.
- Spribille, T., Resl, P., Stanton, D. E., & Tagirdzhanova, G. (2022). Evolutionary biology of lichen symbioses. *New Phytologist*, 234(5), 1566-1582.
- Stacey, S. K., & McEleney, M. (2021). Topical Corticosteroids: Choice and Application. *American family physician*, 103(6), 337–343.
- Suhaimi, H., & Rose, L. C. (2016). Skin and liquid crystal: a brief review on their similarities. *Orient J Chem*, 32, 2073-2078.

## T

- Tatipamula, V. B., Vedula, G. S., Rathod, B. B., Shetty, P. R., & Sastry, A. V. (2018). Study of phytochemical analysis, total flavonoid and phenolic content, antimicrobial properties and chemical constituents of two manglicolous lichens extracts. *Inventi Rapid: Planta Activa*, 2018(2), 1-6.

- Thell, A., Alstrup, V., Arup, U., Bendiksby, M., Czarnota, P., Feuerer, T., ... & Westberg, M. (2014). New or interesting lichens and lichenicolous fungi from the Vadstena area, Östergötland, Sweden. *Graphis Scripta*, 26(1-2), 15-33.
- Thomsen, S. F. (2014). Atopic dermatitis: natural history, diagnosis, and treatment. *International Scholarly Research Notices*, 2014(4), 1-7.
- Tiévant, P. (2001). *Guide des lichens: 350 espèces de lichens d'Europe*. Delachaux et Niestlé. Paris, Ed.1, 10 – 304.
- Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., & Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food chemistry*, 103(3), 816-822.
- Tsakok, T., Woolf, R., Smith, C. H., Weidinger, S., & Flohr, C. (2019). Atopic dermatitis: the skin barrier and beyond. *British Journal of Dermatology*, 180(3), 464-474.

## V

- Van-Haluwyn, C., Asta, J., & Boissière, J. C. (2014). *Guide des lichens de France. Lichens des sols: Lichens des sols*. Belin éditeur. 1<sup>ère</sup> Edition, 125-224.
- Venkatachalam, H., Nayak, Y., & Jayashree, B. S. (2012). Evaluation of the antioxidant activity of novel synthetic chalcones and flavonols. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 3(3), 216.
- Vogiatzi, G., Tousoulis, D., & Stefanadis, C. (2009). The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J cardiol*, 50(5), 402-9.

## W

- Weidinger, S., & Novak, N. (2016). *Atopic dermatitis*. *The Lancet*, 387(10023), 1109–1122.
- Weidinger, S., Beck, L. A., Bieber, T., Kabashima, K., & Irvine, A. D. (2018). Atopic dermatitis. *Nature reviews. Disease primers*, 4(1), 1.

## Y

- Yang, C. C., Hung, Y. L., Ko, W. C., Tsai, Y. J., Chang, J. F., Liang, C. W., ... & Hung, C. F. (2021). Effect of neferine on DNCB-induced atopic dermatitis in HaCaT cells and BALB/c mice. *International journal of molecular sciences*, 22(15), 8237.
- Yatagai, T., Shimauchi, T., Yamaguchi, H., Sakabe, J. I., Aoshima, M., Ikeya, S., ... & Tokura, Y. (2018). Sensitive skin is highly frequent in extrinsic atopic dermatitis and correlates with disease severity markers but not necessarily with skin barrier impairment. *Journal of Dermatological Science*, 89(1), 33-39.
- Yousef, H., Alhajj, M., & Sharma, S. (2019). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *Treasure Island (FL): statPearls Publishing*.

## Z

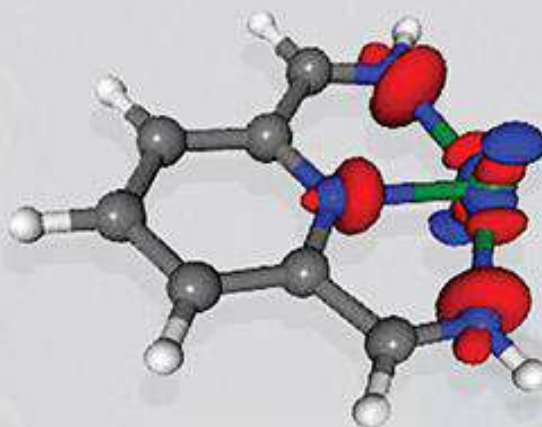
- Zachariah, S. A., & Varghese, S. K. (2018). The lichen symbiosis: A review. *International Journal of Scientific Research and Reviews*. 7(3), 1160-1169.
- Zambare, V. P., & Christopher, L. P. (2012). Biopharmaceutical potential of lichens. *Pharmaceutical Biology*, 50(6), 778-798.



**PUBLICATION**



# Egyptian Journal of Chemistry



**Indexed in Scopus**



Vol.      No

Online ISSN: 2357-0245  
Print ISSN : 0449-2285

**Edited by** : The Egyptian Chemical Society  
**Published by** : Academy of Scientific Research and Technology  
Informatics Sector and Scientific Services  
National Information and Documentation Centre (NIDOC)



## The evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activities of *Parmotrema hypotropa* lichen extract

Maya Abir TARTOUGA<sup>a\*</sup>, Ibtissem ELOUAR<sup>a</sup>, Ibtissem ZEGHINA<sup>a</sup>, Mohamed Badreddine MOKHTARI<sup>a</sup>, Lynda GALI<sup>b</sup>, Shara Francesca RAPA<sup>c</sup>, Nunziatina DE TOMMASI<sup>c</sup>, Stefania MARZOCCO<sup>c</sup>, Chawki BENSOUICI<sup>b</sup>.



<sup>a</sup> Department of Animal Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, University Frères Mentouri Constantine 1, route Ain el bey 25000, Constantine Algeria.

<sup>b</sup> National Center in Biotechnological Research (CRBT), 25 000 Constantine, Algeria.

<sup>c</sup> Department of Pharmacy, School of Pharmacy, University of Salerno, Via Giovanni Paolo II 132, I-84084 Fisciano, Italy.

### Abstract

Lichens are used since antiquity for multiple therapeutic purposes, treating infections, fever, convulsions, and wounds. This study was designed to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effects of the lichen *Parmotrema hypotropa* (NYL.) Hale. The total phenolics and flavonoids content were determined in ethanol extract; the antioxidant activity was assessed by different chemical assays DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)),  $\beta$ -carotene-linoleic acid, reducing power, and Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC). The lichen extract was further tested *in vitro*, for its anti-inflammatory effect through the bovine serum albumin denaturation assay; also the inflammatory response was investigated on the LPS-stimulated human keratinocyte cell line (HaCaT) by measuring intercellular ROS (Reactive Oxygen Species) and TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor-alpha) production; the amount of usnic acid in the extract was determined by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results showed that the tested extract contained high levels of total phenolics than flavonoids, and had an antioxidant effect; it prevented the protein denaturation in a dose-dependent manner, also reduced the intracellular ROS and TNF- $\alpha$  production by HaCaT cells. Furthermore, it did not affect the viability of HaCaT cells; the extract contained small amounts of usnic acid. Based on the different findings, *P. hypotropa* can constitute a potential source of bioactive compounds with antioxidant and anti-inflammatory effects.

Keywords: Lichen; *Parmotrema hypotropa*; antioxidant activity; anti-inflammatory effect; HaCaT cells; usnic acid.

### 1. Introduction

Lichens are symbiotic organisms associating fungi with algae or cyanobacteria. They are considered among the earliest settler of terrene habitats [1]. Lichens can grow on different types of surfaces including rocks, inside bark of woody plants, on soil, mosses, and other surfaces like plastics, glass, and metals [2]. Some lichens are edible and they are prepared in salads, dishes, soups, and used as food flavor enhancers [3]. They are also the source of many products used in cosmetics and perfumery industries [4,5]. The importance of these organisms and the great interest they have aroused in recent years is related to their ability to synthesize various secondary metabolites of medical interest; more than 1000 metabolites of extreme originality, exerting a wide variety of biological activities such as antimicrobial, anti-inflammatory, anti-tumor, anti-

haemolytic, antitussive have been determined [6,7]. Usnic acid is one of the most studied secondary metabolites which is produced by the mycobiont and stored in the cortex of lichens; usnic acid has been known for its multiple activities like antimicrobial, antioxidant, anticancer, and larvicidal effects, it was also known for its strong ability to absorb ultraviolet rays [7].

The skin is the first immune barrier against environmental aggressors and can be affected by many inflammatory agents. Keratinocytes represent the main epidermal cells; they play an important role in the skin's protection mechanisms against biological, chemical, and physical threats [8]. They also act as an immunomodulator in managing inflammation and wound healing through their ability to produce a large number of anti-microbial and inflammatory mediators [9,10]. However, any

\*Corresponding author e-mail: [tartouga.abirmaya@umc.edu.dz](mailto:tartouga.abirmaya@umc.edu.dz)

Received date 08 December 2021; revised date 17 February 2022; accepted date 07 March 2022

DOI: 10.21608/EJCHEM.2022.109501.5016

©2022 National Information and Documentation Center (NIDOC)



alteration in the expression and production of these mediators lead to the development of inflammatory skin disorders [11]. Furthermore, keratinocytes have a crucial role in initiating the early pathogenic events in chronic skin diseases such as psoriasis and dermatitis. High levels of TNF- $\alpha$ , cationic antimicrobial peptides, and chemokines CXCL1, CXCL2, CXCL8, CCL2 have been reported in psoriasis [12,13], whereas high levels of TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) were described in contact dermatitis [14]. Reactive oxygen species (ROS) are molecules involved in different signaling, inflammatory and metabolic processes. It is well established that the overproduction of these species leads to the loss of cellular redox and over time causes chronic diseases such as cancer, atopic dermatitis, and various metabolic disorders such as diabetes and cardiovascular disease [15]. ROS secreted during inflammation are essential for the signaling pathways of various inflammatory cytokines, NF- $\kappa$ B, nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2) [16,17]. Therefore, the inhibition of various overproduced inflammatory mediators (ROS and cytokines) through controlling their synthesis can be an important strategy to limit skin inflammations [18,19].

This study aims to investigate the antioxidant and anti-inflammatory effects of *Parmotrema hypotropa* lichen extract. Firstly, the antioxidant activity of the lichen extract is assessed by chemical methods. Then, the anti-inflammatory effect of the extract is tested through the protein denaturation assay and on ROS and TNF- $\alpha$  production by LPS-stimulated HaCaT cells.

## 2. Material and methods

### 2.1. Lichen extract

The lichen was collected from the region El kala in the extreme Northeast of Algeria, in September 2019. The specimen was identified by Dr. Philippe Clerc (Conservatory and Botanical Garden of the city of Geneva, Chambésy, Switzerland) as *Parmotrema hypotropa* (Nyl.) Hale. The lichen was dried and ground in a grinder. Then, the powdered sample (12g) was extracted with ethanol (250 mL) for 24 h at room temperature. After that, the supernatant was filtered and concentrated through a rotary evaporator [20]. The obtained extract was stored at -18 °C until the next use.

### 2.2. Total phenolic content (TPC)

Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu reagent according to the method of Müller *et al.* [21]. Briefly, in 96-well microplate 20  $\mu$ L of extract diluted in DMSO (1mg/mL) were added to 100  $\mu$ L of Folin-Ciocalteu reagent and 75  $\mu$ L of

Sodium carbonate solution (at 75%). After 2 hours of reaction in darkness at room temperature; the absorbance was measured at 765 nm by a microplate reader (Perkin Elmer, Enspire). The total phenolic content was expressed as  $\mu$ g gallic acid equivalent /mg of extract ( $\mu$ g GAE/mg).

### 2.3. Total flavonoid content (TFC)

Total flavonoid content was determined according to the method described by Topçu *et al.* [22] with some modifications. In a 96 well plate, a volume of 50  $\mu$ L of lichen extract diluted in DMSO (1mg/mL) was added to 10  $\mu$ L of aluminum nitrate (Al (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 9H<sub>2</sub>O at 10%), 10  $\mu$ L of aqueous potassium acetate 1M (CH<sub>3</sub>COOK) and 130  $\mu$ L of DMSO. After 40 min at room temperature, the absorbance was read at 415 nm. The total Flavonoid content was expressed as  $\mu$ g quercetin equivalent /mg ( $\mu$ g QE/mg).

### 2.4. Evaluation of the antioxidant activity of *P.hypotropa* extracts

#### 2.4.1. Scavenging activity of DPPH radicals

The scavenging potential of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical was determined according to the method of Gali and Bedjou [23]. Briefly, 160  $\mu$ L of DPPH solution (1mM) added to 40  $\mu$ L of the tested extract diluted in DMSO (4mg/mL) or standards at different concentrations (12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800  $\mu$ g/mL), after 30 min of incubation in darkness at room temperature, the absorbance was measured at 517 nm.

The scavenging capability of DPPH radical was calculated using the following equation:

$$\text{DPPH scavenging effect(\%)} = \frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \times 100 \quad (1)$$

The results were given as IC<sub>50</sub> value ( $\mu$ g/mL) corresponding the concentration of 50% inhibition. The results were compared to the standard antioxidants BHA (butylated hydroxyanisole), BHT (butylated hydroxytoluene), and ascorbic acid.

#### 2.4.2. ABTS scavenging activity

ABTS scavenging activity was measured following Mazouz *et al.* [24]. The ABTS•+ solution was prepared by mixing ABTS (7mM) with Potassium persulfate (2.45 mM). The solution was stored in the dark at room temperature for 16 hours. ABTS•+ solution was then diluted to get the absorbance of 0.700 at 734 nm. Thereafter, a volume of 160  $\mu$ L of this solution was added to 40  $\mu$ L of the standards and tested sample in DMSO (4mg/mL) at different concentrations (12.5, 25, 50, 100, 200, 400, and 800  $\mu$ g/mL). The absorbance was measured at 734 nm after 10 min of incubation at room temperature. The results were given as the IC<sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL), which was

calculated according to the formula (1). BHA, BHT, and ascorbic acid were used as standards.

#### 2.4.3. $\beta$ -carotene linoleic acid bleaching assay

The extract was assessed for its ability to protect the oxidation of the carotenoid  $\beta$ -carotene through hydrogen-based transfer mechanism [25]. Briefly,  $\beta$ -carotene/linoleic acid emulsion was prepared by dissolving 0.5mg of  $\beta$ -carotene in 1 mL of chloroform, then 25  $\mu$ L of linoleic acid and 200 mg of tween-40 were added. The chloroform was then evaporated using a rotary evaporator. Then, 50 mL of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) was added with vigorous shaking and the absorbance of the solution was adjusted by hydrogen peroxide  $H_2O_2$  to 0,8 - 0,9 at 470nm. A volume of 160  $\mu$ L of  $\beta$ -carotene solution was added to 40  $\mu$ L of the tested sample or standards (4mg/mL) at the concentrations 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, and 800  $\mu$ g/mL. The absorbance was measured immediately at 470 nm ( $t=0$  min) and after incubation for 120 min at 45 °C. BHA and BHT were used as standards.

The percentage of inhibition (A%) was calculated according to the following formula:

$$A (\%) = [1 - (A(t = 0) - A(t = 120)) / (AC(t = 0) - AC(t = 120))] \times 100$$

Where A (%) is the percentage of inhibition,  $A_{(t=0)}$ : the absorbance value of the tested sample at 0 min,  $A_{(t=120)}$ : the absorbance value of the tested sample after 120 min of incubation and  $AC_{(t=0)}$  is the absorbance value of the negative control (methanol without sample) at 0 min.  $AC_{(t=120)}$ : the absorbance value of the negative control at 120 min.

#### 2.4.4. Reducing power assay

The reducing power activity was determined by the reduction of  $Fe^{3+}(CN^-)_6$  to  $Fe^{2+}(CN^-)_6$  as described before [26]. Briefly, 10  $\mu$ L of extract or standards (4mg/mL) at the concentrations 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, and 800  $\mu$ g/mL were added to 40  $\mu$ L of 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 6,6) and 50  $\mu$ L of potassium ferricyanide (1%). The solution was incubated for 20 min at 50 °C. After cooling, 50  $\mu$ L of tri-chloroacetic acid (10%) was used to acidify the mixture, then 10  $\mu$ L of ferric chloride  $FeCl_3$  (0.1%) and 40  $\mu$ L of distilled water were added. The absorbance was immediately read at 700 nm.  $A_{0.5}$  values were calculated from the absorbance curves. The results were compared to BHA, BHT, and ascorbic as positive antioxidant standards.

#### 2.4.5. Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

$Cu^{2+}$  ion reduction antioxidant potential was evaluated using the modified CUPRAC method [27].

In 96-well microplate 50  $\mu$ L of  $CuCl_2$  (10 mM), 50  $\mu$ L of neocuproine (7.5 mM), and 1 M Acetate ammonium (60  $\mu$ L, pH 7.0) solutions were mixed with 40  $\mu$ L of the tested sample or standards at different concentrations (12.5, 25, 50, 100, 200, 400, and 800  $\mu$ g/mL). The absorbance was measured at 450 nm after 1 hour of incubation at room temperature. BHA, BHT, and ascorbic acid were used as standards.  $A_{0.5}$  values were calculated from the absorbance curves.

#### 2.5. Evaluation of the anti-inflammatory effect of *P.hypotropa* extract:

##### 2.5.1. Inhibition of denaturation of bovine serum albumin (BSA)

The anti-inflammatory effect of the *P.hypotropa* extract was evaluated in vitro by testing its effect on BSA denaturation following the method of Kandikattu *et al.* [28]. Briefly, 500  $\mu$ L of extract or standard (Diclofecan sodium) at different concentrations (1000.500.250.125  $\mu$ g/mL) were added in tubes to 500  $\mu$ L of the solution of BSA (0.2% prepared in Tris buffer saline pH 6.6). A tube with 500  $\mu$ L of BSA and 500  $\mu$ L of methanol was also prepared as control. Then, the mixture was incubated at 37 °C during 15 minutes, and heated at 72°C during 5 min. After cooling the absorbance was measured at 660 nm in a UV-visible spectrophotometer.

The percentage of inhibition of protein denaturation was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ Inhibition of denaturation} = \frac{A_{Control} - A_{Sample}}{A_{Control}} \times 100$$

A is the absorbance.

##### 2.5.2. Cell culture

HaCaT cell line (Human immortalized keratinocytes) was purchased from CLS Cell Lines Service GmbH, Germany. HaCaT cells were cultured, at 37 °C and 5%  $CO_2$  at atmosphere in the incubator (New Brunswick Scientific, CO-150  $CO_2$  incubator), in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose, 10% fetal bovine serum (FBS), 1% Penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 mg/mL).

##### 2.5.3. Cell viability assay

The effect of the extract on cell viability was assessed by the MTT assay as previously reported [29]. HaCaT cells ( $5 \times 10^3$  cells/well) were plated in 96 well microplate, and then treated for 24, 48, and 72 hours in the presence of different concentration of lichen extract (50, 100, 200  $\mu$ g/mL). Thereafter, 25  $\mu$ L of MTT (5mg/mL) were added to each well and incubated for 3 hours. After farmazon crystal

formation the cells were incubated for 18 hours with 100  $\mu\text{L}$  of cell lysate solution (50% N,N-dimethylformamide and 20% (w:v) SDS at pH= 4,5). The optical density (OD) was measured at 620 nm with the spectrophotometer (Titertek Multiskan MCC/340-DASIT, Cornaredo, Milan, Italy).

The cell viability percentage (V%) was calculated as the following equation:

$$V\% = \text{OD} / (\text{OD} \times \text{DMSO}) \times 100$$

OD = absorbance of the extract at each concentration  
DMSO = average of the absorbance of DMSO in the different concentrations

#### 2.5.4. Intracellular reactive oxygen release (ROS) production

Intercellular ROS formation was measured using the  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  probe (2',7'-dichlorofluorescein-diacetate) as depicted [30]. HaCaT cells were plated in 24-well plates and treated with different concentration of lichen extract (50, 100, 200  $\mu\text{g/mL}$ ), in the presence of the bacterial lipopolyscharride "LPS" (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). After 24 hours, the supernatants were separated and conserved at  $-18^\circ\text{C}$  for other uses, and the cells were collected, washed and incubated for 15 min at  $37^\circ\text{C}$  in the presence of  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (10 $\mu\text{M}$ ). The cell fluorescence was evaluated through the fluorescence-activated cell sorting (FACS scan; Becton Dickinson, NJ, USA) and elaborated with Cell Quest software (San Diego, CA, USA).

#### 2.5.5. TNF- $\alpha$ release

The supernatants from the previous experiment (ROS) were used to measure TNF- $\alpha$  levels in LPS-stimulated HaCaT cells (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). TNF- $\alpha$  levels were determined using the Diaclone human TNF- $\alpha$  Elisa kit following the manufacturer's instructions. Results were expressed as  $\text{pg/mL}$ .

#### 2.6. HPLC analysis for usnic acid content

A quantitative determination of +(-)usnic acid in the extract was done through a High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).

HPLC grade from Sigma-Aldrich, Germany were used as solvents and chemicals in this experiment.

##### 2.6.1. Preparation of sample

0.05 g of *P.hypotropa* extract was added to 10 ml of DMSO at room temperature, the solution was filtered before the analysis by 0.45  $\mu\text{m}$  filters, then 20  $\mu\text{L}$  of it was injected into the HPLC system.

##### 2.6.2. Preparation of samples and analytic condition

The solution of +(-)usnic acid (1mg/mL) was prepared with acetone then seven samples of different dilutions in acetone of the solution were used to obtain calibration curves using linear regression analysis.

The analysis was performed on Aglient 1220 infinity Lc system equipped with a diode array detector, a reverse phase C 18 column was used. For the mobile phase A, a mixture of methanol and pH 7.4 phosphate buffer (70:30 v/v) was used with a flow rate of 0.8 ml/min to detect usnic acid at 245 nm by the comparison of the retention times with pure standard [31].

Each analysis was carried out in triplicate.

#### 2.7. Statistical analysis

All experiment were performed in triplicate and expressed as means  $\pm$  SD. The difference between experimental conditions and controls were analyzed using Tukey and Bonferroni's tests ( $P < 0,05$  was considered significant). Statistical analyses were carried out by *GraphPad Prism 5* software.

### 3. Results

#### 3.1. Total phenolic and flavonoids contents of *P.hypotropa* extract

The ethanolic extract reported to contain both polyphenols and flavonoids, and it had high levels of phenolics than flavonoids. The values were shown in Table 1.

**Table 1. Total phenolic and flavonoids contents in ethanol extract of *P. hypotropa***

	TPC ( $\mu\text{g GAE/mg}$ )	TFC ( $\mu\text{g QE/mg}$ )
<b>Ethanol</b>	159 $\pm$ 3.74	4.10 $\pm$ 0.12

Values were expressed as means  $\pm$  SD (n=3). GAE: Gallic acid equivalent, QE: Quercetin equivalent.

#### 3.2. Antioxidant activities of *P.hypotropa* extract

The antioxidant and scavenging potential of the tested extract of *P. hypotropa* was evaluated through multiple methods (Table 2). *P.hypotropa* extract showed a weak ability to reduce DPPH radical and bleaching  $\beta$ -carotene. In contrast, it exerted a high scavenging activity of the radical ABTS ( $\text{IC}_{50} = 96.18 \pm 1.07 \mu\text{g/mL}$ ). The capacity of the sample to reduce metallic ions such as iron and copper was also assessed and the results demonstrated that it is more effective in reducing copper ions ( $A_{0.5} = 39.37 \pm 1.46 \mu\text{g/mL}$ ) than iron ions ( $A_{0.5} > 200 \mu\text{g/mL}$ ). Notably, the tested extract has low antioxidant activity compared to the standards.

**Table 2. Antioxidant activities of ethanol extract of *P.hypotropa***

	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)	ABTS IC <sub>50</sub> (µg/mL)	β-Carotene bleaching IC <sub>50</sub> (µg/mL)	Reducing power A <sub>0.50</sub> (µg/mL)	CUPRAC A <sub>0.50</sub> (µg/mL)
ETH	> 800	96.18±1.07	268.62±2.44	>200	39.37±1.46
BHA	6.14±0.41	1.81±0.10	1.05±0.03	9.29±0.22	5.35±0.71
BHT	12.99±0.41	1.29±0.30	0.91±0.01	8.41±1.46	8.97±3.94
AA	4.39±0.01	3.04±0.05	NT	5.45±0.15	8.69±0.14

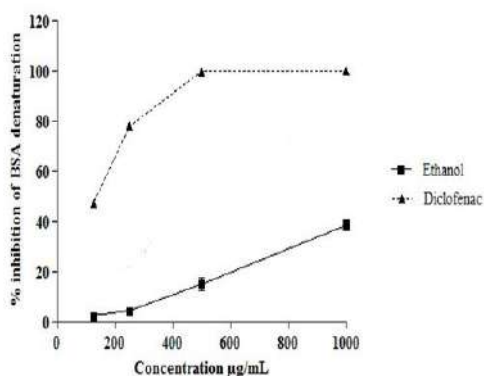
Values are means ± standard deviation of three parallel measurements. BHA: butylated hydroxyanisole; ETH: ethanol extract; BHT: butylated hydroxytoluene; AA: ascorbic acid; NT: not tested.

### 3.3. Anti-inflammatory effect of *P.hypotropa* extract

#### 3.3.1. Effect of the extract on BSA denaturation

##### assay

The tested extract exerted a protective effect against the heat-induced denaturation of BSA in a dose-dependent manner. The results showed that the extract inhibited the BSA denaturation at 38.39% at 1000 µg/mL. (Figure 1).



**Fig. 1. Effect of the *P.hypotropa* ethanol extract on BSA denaturation.**

#### Effect of *P.hypotropa* extract on Hacat cell line viability

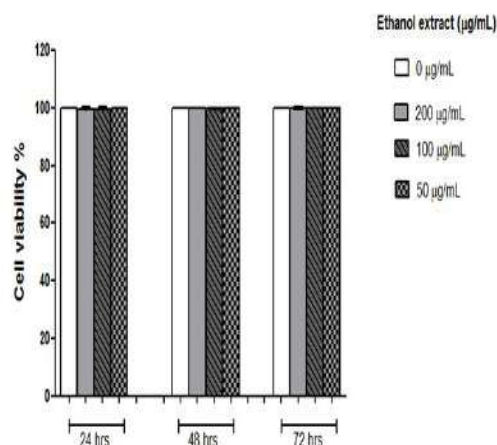
The cytotoxic effect of *P. hypotropa* extract was evaluated using the MTT assay. The results showed that the extract administered at different concentrations and different times (24, 48 and 72h) had no cytotoxic effect on the HaCaT cells (Figure 2).

#### 3.3.2. Effect of *P.hypotropa* extract on intercellular ROS release

Measurement of intercellular ROS level in LPS-stimulated HaCaT cells (Figure 3) demonstrated that the lichen extract significantly ( $p < 0.001$ ) inhibited intracellular ROS formation at all the tested

concentrations. The extract induced a significant ( $p < 0.001$ ) decrease of the ROS release by 30.35±0.69,

38.17±4.67, and 52.54±1.16 % compared to the LPS-stimulated HaCaT cells at the concentrations of 50, 100, and 200 µg/mL, respectively.



**Fig. 2. Effect of ethanol extract (50-200 µg/mL) on HaCaT cells viability after 24, 48 and 72 hours.**

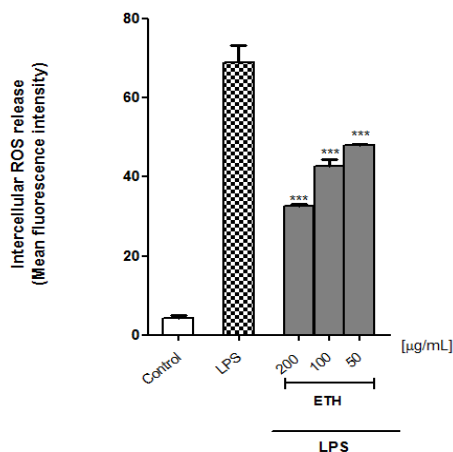


Fig. 3. Effect of *P. hypotropa* extract (50-200 µg/mL) on the intracellular ROS levels in LPS-stimulated HaCaT cells. \*\*\* Significant  $P < 0.001$  compared to LPS-stimulated cells. (LPS: LPS-stimulated cells, ETH: ethanol extract).

### 3.3.3 Effect of *P. hypotropa* extract on TNF- $\alpha$ secretion

The inhibitory effect of the tested extract on TNF- $\alpha$  secretion by LPS-stimulated HaCaT cells was evaluated using an ELISA assay. Data indicate that the extract decreased TNF- $\alpha$  production (Figure 4). The inhibitory effect of the extract was significant ( $p < 0.001$ ) at 100 and 200 µg/mL.

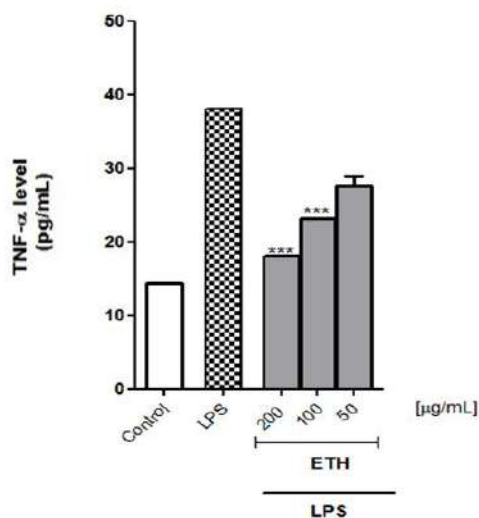


Fig. 4. Effect of *P. hypotropa* extract (50-200 µg/mL) on TNF- $\alpha$  levels (pg/mL) in LPS-stimulated HaCaT cells. \*\*\* Significant  $P < 0.001$  compared to LPS-stimulated cells. (LPS: LPS-stimulated cells, ETH: ethanol extract).

### 3.4. Determination of usnic acid in *P. hypotropa* by HPLC

The quantification of usnic acid in lichen extract was realized by the identification of peaks in chromatographs resulted from the HPLC analysis, through the comparison of retention times with the standard (Figure 5).

Our lichen extract contained 0.032 mg of usnic acid in 5mg/mL of ethanol extract. The result obtained is showed in (Table 3).

Table 3: Usnic acid content and retention time of *P. hypotropa* extract.

	Usnic acid content (mg)	Retention time (min)
ETH	0.032 ± 0.001	7,143±0.001

Values were expressed as means ± SD (n=3). ETH: ethanol extract of *P. hypotropa*.

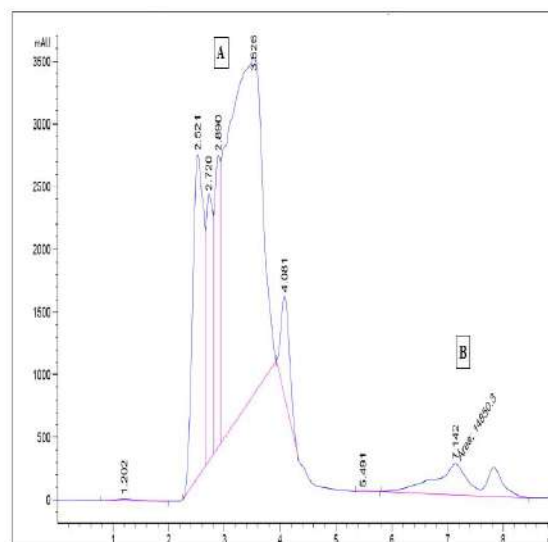


Fig. 5. HPLC analysis of usnic acid in *P. hypotropa* ethanol extract. A: solvent; B: usnic acid (retention time: 7.14 min).

## 4. DISCUSSION

Lichens were used in traditional medicine to cure infections, fever, diarrhea, convulsions, and skin diseases such as wounds [1]. In this work, we have tested the antioxidant and the anti-inflammatory activities of ethanol extract of lichen *P. hypotropa*. In our knowledge, the biological activity of this lichen has not already been documented. Firstly, the antioxidant activity of the extract has been evaluated using different tests. The utilization of different complementary methods is recommended when studying a crude extract composed of a mixture of bioactive compounds with diverse mode of action. Our results demonstrated the presence of total phenolic and flavonoids in *P. hypotropa* lichen

extract, similar findings on *Parmotrema* species have been reported by different works [32,33]. At the same time, the ethanolic extract exerted a moderate antioxidant activity. Similar results have been reported in the genus of *Parmotrema* with ethanol extract, while other extracts of the same genus showed a significant effect [34]. The moderate antioxidant activity of our extract could be related to the chosen solvent which can affect the concentration of secondary metabolites in lichens. Several studies confirmed the antioxidant properties of lichen [35,36] where the antioxidant effect was influenced by the extraction solvent.

In fact, a close relationship between total phenolic content and antioxidant activity has been confirmed by different studies [37–40]. The ability of phenolic compounds to scavenge the free radicals is due to their capacity to donate electrons or hydrogen atoms of their hydroxyl groups [41].

In the second part of this work, the anti-inflammatory effect of the extract was assessed by the test of protein denaturation using BSA. The protein denaturation process is one of the multiple causes inducing an inflammatory response through the degeneration, the loss of tissue functionality, and the secretion of pro-inflammatory mediators [42]. The test is based on measurement of the capacity of the extract to prevent the loss of protein structure induced by the heat. The results showed that the ethanolic extract had a protective effect against protein denaturation. A similar protective effect was reported in another extract of the lichen *Parmotrema austrosinense* [43].

Furthermore, the anti-inflammatory effect of *P.hypotropa* extract was assessed on HaCaT cells. The LPS-stimulated keratinocytes are a common model to discover new treatments for skin inflammation disorders such as atopic dermatitis and psoriasis [44,45]. The results showed that the viability of HaCaT cells was not affected by adding the extract of *P.hypotropa*. Further, the tested extract exhibited a significant reduction of intercellular ROS produced by the stimulated HaCaT cells. During skin inflammations, ROS are excessively produced by keratinocytes and can oxidize the biologic molecules (lipids, proteins, and DNA) and lead to several disorders [11,46]. The inhibition of intracellular ROS by lichen extracts was reported in SH-SY5Y neuroblastomas treated by *Parmotrema perlatum* [47], and by *Cetraria islandica* and *Vulpicida canadensis* on U373-MG cells (astrocytes) [48].

On the other hand, TNF- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine produced by several skin cells including

keratinocytes following their exposition to external agents such as LPS [49]. Our results showed the inhibition of TNF- $\alpha$  by the extract of *P.hypotropa*, similar findings on lichen were reported by on LPS-stimulated Raw 264.7 cells treated by *Amandinea sp* extract [50]. The anti-inflammatory properties of *P.hypotropa* extract can be ascribed to the presence of polyphenols and flavonoids content. It has been reported that polyphenols inhibit TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B signaling pathway in human keratinocytes [46,51,52]. Likewise, they modulate macrophages function by inhibiting cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and TNF- $\alpha$  production [53]. Flavonoids, as well, are found able to inhibit the expression cytokines and chemokines like TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 in multiple cell types such as LPS-activated mouse primary macrophages and human peripheral blood mononuclear cells [54].

In addition ethanol extract of *P.hypotropa* found to contain usnic acid. Many studies confirm the production of usnic acid in lichens[55], Rajan et al. [33] have confirmed the presence of usnic acid in *Parmotrema sp*. Usnic acid is a secondary metabolite produced only by lichens, it is a dibenzofurans derivatives of phenolic compounds composed of a furane retrocycle bonds. Among the isolated secondary metabolites of lichens usnic acid was the most widely studied for its biological activities; it is a very active substance which plays crucial role in human health [56]. Many biological activities of usnic acid have been reported [31]. Usnic acid has strong antioxidant activities [57], it could decrease the high levels of inflammatory mediators (TNF- $\alpha$ , IL-6) in LPS-stimulated cell lines [32]. Therefore, we suggest that the presence of usnic acid in the studied extract seemed to be responsible for its antioxidant and anti-inflammatory activities.

## 5. Conclusion

The present study revealed that the lichen *Parmotrema hypotropa* has a potent antioxidant effect as examined using *in vitro* assays and possesses a significant anti-inflammatory effect through its ability to inhibit the protein denaturation, and to reduce the production of the inflammatory mediators ROS and TNF- $\alpha$  by keratinocytes. These important actions allow considering the lichen *P.hypotropa* a good source of new bioactive molecules for the treatment of inflammatory disorders. Nevertheless, further studies are needed to identify and purify the principal bioactive compounds responsible for *P.hypotropa*'s biological activities and to confirm their effects both *in vitro* and *in vivo*.



## 6. Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## 7. Acknowledgements

We gratefully thank: Dr Philippe Clerc from Conservatory and Botanical Garden of the city of Geneva, Chambésy, Switzerland for his collaboration and contribution in this work.

## References:

- [1] Shukla V, Joshi GP, Rawat MSM. Lichens as a potential natural source of bioactive compounds: a review. *Phytochemistry Reviews* 2010;303–14. <https://doi.org/10.1007/s11101-010-9189-6>.
- [2] Lutzoni F and Miadlikowska J. Lichens *Current Biology* 2009;19:502–3.
- [3] Zhao Y, Wang M, Xu B. A comprehensive review on secondary metabolites and health-promoting effects of edible lichen. *J Funct Foods* 2021;80:104283. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104283>.
- [4] Joulain D. Lichen extracts as raw materials in perfumery. Part 1: *oakmoss* 2009;49–61. <https://doi.org/10.1002/fj.1916>.
- [5] Zambare VP, Christopher LP. Biopharmaceutical potential of lichens *Pharmaceutical Biology* 2012;0209. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.633089>.
- [6] Hong JM, Suh SS, Kim TK, Kim JE, Han SJ, Youn UJ, et al. Anti-cancer activity of lobaric acid and lobarstin extracted from the antarctic lichen stereocaulon alpnum. *Molecules* 2018;23:1–10. <https://doi.org/10.3390/molecules23030658>.
- [7] Molnár K, Farkas E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: A review. *Zeitschrift Fur Naturforsch - Sect C J Biosci* 2010;65:157–73. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-3-401>.
- [8] Johansen C, Rittig AH, Mose M, Bertelsen T, Weimar I, Nielsen J, et al. STAT2 is involved in the pathogenesis of psoriasis by promoting CXCL11 and CCL5 production by keratinocytes. *PLoS One* 2017;12:1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176994>.
- [9] Chessa C, Bodet C, Jousselin C, Wehbe M, Lévêque N, Garcia M. Antiviral and Immunomodulatory Properties of Antimicrobial Peptides Produced by Human Keratinocytes. *Front Microbiol* 2020;11:1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01155>.
- [10] Herman A, Herman AP. Antimicrobial peptides activity in the skin. *Ski Res Technol* 2019;25:111–7. <https://doi.org/10.1111/srt.12626>.
- [11] Albanesi C, Scarponi C, Giustizieri ML, Girolomoni G. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:329–34. <https://doi.org/10.2174/1568010054022033>.
- [12] Albanesi C, Madonna S, Gisondi P, Girolomoni G. The interplay between keratinocytes and immune cells in the pathogenesis of psoriasis. *Front Immunol* 2018;9:1–7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01549>.
- [13] Furue K, Ulzii D, Tanaka Y, Ito T, Tsuji G, Kido-Nakahara M, et al. Pathogenic implication of epidermal scratch injury in psoriasis and atopic dermatitis. *J Dermatol* 2020;47:979–88. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15507>.
- [14] Pastore S, Mascia F, Mariani V, Girolomoni G. Keratinocytes in skin inflammation. *Expert Rev Dermatol* 2006;1:279–91. <https://doi.org/10.1586/17469872.1.2.279>.
- [15] El Aanachi Soukaina, Gali Lynda, Rammali Said, Bensouici Chawki, Aassila Hinde & Dari Khadija. In vitro study of the antioxidant, photoprotective, anti-tyrosinase, and anti-urease effects of methanolic extracts from leaves of six Moroccan Lamiaceae. *J Food Meas Charact* 2021. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00759-9>.
- [16] Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling *Circulation research*. 2018:877–902. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311401>.
- [17] Kacem M, Simon G, Leschiera R, Misery L, Elfeki A, Lebonvallet N. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Ruta chalepensis* L. extracts on LPS-stimulated RAW 264 cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 2014;8. <https://doi.org/10.1007/s11626-014-9813-7>.
- [18] Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & redox signaling* 2014;20:1126–67. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>.
- [19] Piktel E, Wnorowska U, Cieśluk M, Deptula P, Pogoda K, Turkowicz IM, et al. Inhibition of inflammatory response in human keratinocytes by magnetic nanoparticles functionalized with PBP10 peptide derived from the PIP2-binding site of human plasma gelsolin. *J Nanobiotechnology* 2019:1–19. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0455-5>.
- [20] Plaza CM, De Torres LED, Lücking RK, Vizcaya M, Medina GE. Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from venezuelan andes. *J Pharm Pharmacogn Res* 2014;2:138–47.
- [21] Müller L, Gnoyke S, Popken AM, Böhm V. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Sci Technol* 2010;43:992–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.02.004>.
- [22] Topçu G, Ay M, Bilici A, Sarikürkcü C, Öztürk M, Ulubelen A. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chem* 2007;103:816–22. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.028>.
- [23] Gali L, Bedjou F. Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *South African J Bot* 2019;120:163–9. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.011>.
- [24] Mazouz W, Haouli NEH, Gali L, Vezza T, Bensouici C, Mebrek S, et al. Antioxidant, anti-alzheimer, anti-diabetic, and anti-inflammatory activities of the endemic halophyte *Limonium spathulatum* (Desf.) kuntze on LPS-stimulated RAW264 macrophages. *South African J Bot* 2020;135:101–8. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.021>.

- [25] Boussadia A, Beghidja A, Gali L, Beghidja C, Elhabiri M, Rabu P, et al. Coordination properties of two new Schiff-base phenoxy-carboxylates and comparative study of their antioxidant activities. *Inorganica Chim Acta* 2020;508:119656. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119656>.
- [26] Mamache W, Amira S, Ben Souici C, Laouer H, Benchikh F. In vitro antioxidant, anticholinesterases, anti- $\alpha$ -amylase, and anti- $\alpha$ -glucosidase effects of Algerian *Salvia aegyptiaca* and *Salvia verbenaca*. *J Food Biochem* 2020;44:1–15. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13472>.
- [27] Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., & Karademir. Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004;7970–81. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>.
- [28] Kandikattu, K., BharathRathna Kumar P, VenuPriya R, Sunil Kumar k, RanjithSingh B, Rathore. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of *Canthium Parviflorum* By in-Vitro Method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology* 2013;5674:2320–2.
- [29] Alilou M, Marzocco S, Hofer D, Rapa SF, Asadpour R, Schwaiger S, et al. Labdane-Type Diterpenes from the Aerial Parts of *Rydingia persica*: Their Absolute Configurations and Protective Effects on LPS-Induced Inflammation in Keratinocytes. *J Nat Prod* 2020;83:2456–68. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00360>.
- [30] Rapa SF, Waltenberger B, Di R, Simona P, Siracusa R, Peritore AF, et al. Plumericin prevents intestinal inflammation and oxidative stress in vitro and in vivo. *The FASEB Journal* 2020;1576–90. <https://doi.org/10.1096/fj.201902040R>.
- [31] Cansaran D, Atakol O, Halici MG, Aksoy A. HPLC Analysis of Usnic Acid in Some Ramalina. Species from Anatolia and Investigation of their Antimicrobial Activities. *Pharmaceutical Biology* 2008;0209. <https://doi.org/10.1080/13880200601028503>.
- [32] Jain A, Bhandarkar S, Rai G, Yadav AK, Lodhi S. Evaluation of *Parmotrema reticulatum taylor* for antibacterial and antiinflammatory activities. *Indian J Pharm Sci* 2016;78:94–102. <https://doi.org/10.4103/0250-474X.180241>.
- [33] Rajan VP, Gunasekaran S, Ramanathan S, Murugaiyah V, Samsudin MW, Din LB. Biological activities of four *Parmotrema* species of Malaysian origin and their chemical constituents. *J Appl Pharm Sci* 2016;6:36–43. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60806>.
- [34] Ganesan A, Thangapandian M, Ponmurugan P, Sundararaj JP. Antibacterial and antioxidant activity of *parmotrema reticulatum* obtained from eastern ghats, Southern India. *Biomed Res* 2017;28:1593–7.
- [35] Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U. Antioxidant and antibacterial activities of lichen *Usnea ghattensis* in vitro. *Biotechnol Lett* 2005;27:991–5. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-7847-3>.
- [36] Poornima Shanmugam, Ponmurugan Ponnusamy, Mythili Gnanamangai Balasubramanian, Nagarajan AG. Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Activities of Few Macrolichens Collected From Eastern Ghats of Tamil Nadu, India. *Int Res J Pharm* 2017;8:39–43. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.080334>.
- [37] Hodzic Z, Srabovic M, Saletovic M. The Influence of Total Phenols Content on Antioxidant Capacity in the Whole Grain Extracts. *European Journal of Scientific Research* 2009; 28(3):471-7.
- [38] Kosanić, M., Ranković, B., & Vukojević, J. Antioxidant properties of some lichen species. *Journal of Food Science and Technology* 2011;48:584–90. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0174-2>.
- [39] Rekha C, Poornima G, Manasa M, Abhipsa V, Devi JP. Ascorbic Acid, Total Phenol Content and Antioxidant Activity of Fresh Juices of Four Ripe and Unripe Citrus Fruits. *Chemical Science Transactions* 2012;1:303–10. <https://doi.org/10.7598/cst2012.182>.
- [40] Vivek MN, Kambar Y, Manasa M, R PKT, Vinayaka KS. Radical scavenging and antibacterial activity of three *Parmotrema* species from Western Ghats of Karnataka, India. 2014;4:86–91. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40317>.
- [41] Zhu MT, Huang YS, Wang YL, Shi T, Zhang LL, Chen Y, et al. Comparison of (poly)phenolic compounds and antioxidant properties of pomace extracts from kiwi and grape juice. *Food Chem* 2019;271:425–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.151>.
- [42] Anyasor GN, Okanlawon AA, Ogunbiyi B. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Justicia secunda* Vahl leaf extract using in vitro and in vivo inflammation models. *Clinical Phytoscience* 2019;5. <https://doi.org/10.1186/s40816-019-0137-8>.
- [43] Poornima S, Nagarjun N, Ponmurugan P, Gnanamangai BM, Narasimman S. Toxicity and anti-inflammatory study of *Parmotrema austrosinense* extract against oxozalone induced intestinal inflammation in zebrafish (*Danio rerio*) model. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2019;21:101278. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101278>.
- [44] Bocheńska, K., Smolińska, E., Moskot, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., & Gabig-Cimińska, M. Models in the Research Process of Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(12): 2514 <https://doi.org/10.3390/ijms18122514>.
- [45] Lee, Choi, N'deh, Choi, Fan, Kim, An. Inhibitory Effect of *Centella asiatica* Extract on DNCB-Induced Atopic Dermatitis in HaCaT Cells and BALB/c Mice. *Nutrients* 2020; 12(2): 411. <https://doi.org/doi:10.3390/nu12020411>.
- [46] Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>.
- [47] Sieteiglesias V, González-Burgos E, Bermejo-Bescós P, Divakar PK, Gómez-Serranillos MP. Lichens of Parmelioid Clade as Promising Multitarget Neuroprotective Agents. *Chem Res Toxicol* 2019;32:1165–77. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00010>.
- [48] Fernández-Moriano C, Divakar PK, Crespo A,

- Gómez-Serranillos MP. Neuroprotective activity and cytotoxic potential of two Parmeliaceae lichens: Identification of active compounds. *Phytomedicine* 2015;22:847–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.06.005>.
- [49] Cheng H, Hsiang C, Chen G, Wu S. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced Interleukin-1  $\beta$  and Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$  Production by Menthone through Nuclear Factor-  $\kappa$  B Signaling Pathway in HaCat Cells. *Chinese Journal of Physiology* 2008;51:160–6.
- [50] Kim JE, Min SK, Hong JM, Kim KH, Han SJ, Yim JH, et al. Anti-inflammatory effects of methanol extracts from the Antarctic lichen, *Amandinea* sp. in LPS-stimulated raw 264.7 macrophages and zebrafish. *Fish Shellfish Immunol* 2020;107:301–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.10.017>.
- [51] Potapovich AI, Lulli D, Fidanza P, Kostyuk VA, De Luca C, Pastore S, et al. Plant polyphenols differentially modulate inflammatory responses of human keratinocytes by interfering with activation of transcription factors NF $\kappa$ B and AhR and EGFR-ERK pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;255:138–49.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.06.007>.
- [52] Korkina LG, Pastore S, Luca C De, Kostyuk VA. Metabolism of Plant Polyphenols in the Skin: Beneficial Versus Deleterious Effects. *Current Drug Metabolism* 2008;7:10–29.
- [53] González R, Ballester I, López-Posadas R, Suárez MD, Zarzuelo A, Martínez-Augustin O, et al. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011;51:331–62.  
<https://doi.org/10.1080/10408390903584094>.
- [54] Sharma V, Mishra M, Ghosh S, Tewari R, Basu A, Seth P, et al. Modulation of interleukin-1 $\beta$  mediated inflammatory response in human astrocytes by flavonoids: Implications in neuroprotection. *Brain Res Bull* 2007;73:55–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.01.016>.
- [55] Saha S, Pal A, Paul S. A Review on Pharmacological, Anti-oxidant Activities and Phytochemical Constituents of a Novel Lichen *Parmotrema* Species. *J Biol Act Prod from Nat* 2021;11:190–203.  
<https://doi.org/10.1080/22311866.2021.1916596>.
- [56] Ranković, B., & Kosanić, M. Lichens as a potential source of bioactive secondary metabolites. In *Lichen secondary metabolites* 2019 (pp.1-29). Springer.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8>.
- [57] Cakmak K C, Gülçin İ. Anticholinergic and antioxidant activities of usnic acid-an activity-structure insight. *Toxicol Reports* 2019;6:1273–80.  
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.11.003>.

# *Résumés*

## Résumé:

Les lichens, organismes constitués d'un champignon et une algue ou des cyanobactéries vivants en symbiose, sont utilisés en médecine traditionnelle à travers le monde pour traiter de nombreuses maladies tels que les troubles respiratoires, digestifs, gynécologiques et cutanées. Récemment, de nombreuses recherches ont prouvé leurs effets antioxydant, antibactérien, anti-inflammatoire et anti-tumoral. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet des extraits de lichen *Parmotrema hypotropia* sur la dermatite atopique induite chez les souris. Notre travail débute par une étude des propriétés phytochimiques, antioxydantes d'extraits, suivie d'une évaluation de l'effet anti-inflammatoire *in vitro* et sur un modèle de dermatite atopique *in vivo*. La teneur en polyphénols et en flavonoïdes a été déterminée dans l'extrait de dichlorométhane et d'éthanol selon les méthodes de Folin Ciocalcu et chlorure d'aluminium respectivement. La quantité d'acide usnique dans les extraits a été mesurée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). L'activité antioxydante des deux extraits a été évaluée par différentes méthodes DPPH, ABTS, blanchiment de  $\beta$ -carotène et CUPRAC. Les extraits ont été ensuite testés *in vitro*, pour leur effet anti-inflammatoire via le test de dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) et sur la lignée cellulaire de kératinocytes humains (HaCaT) en mesurant la production intercellulaire de ROS (Reactive Oxygen Species) et de TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor-alpha), l'effet de l'extrait de dichlorométhane sur la dermatite atopique a été évalué *in vivo* sur un modèle induit par le DNCB. Les résultats montrent que l'extrait de dichlorométhane est plus riche en polyphénols et en acide usnique, il a un effet antioxydant plus important que l'extrait éthanolique. Les deux extraits empêchent la dénaturation de la BSA de manière dose-dépendante et réduisent la production intracellulaire de ROS et de TNF- $\alpha$  par les kératinocytes. L'extrait de dichlorométhane testé sur un modèle de dermatite révèle une réduction des scores de lésions induites par la dermatite. De point de vue histologique, le lichen *P.hypotropia* entraîne une réparation de la peau. Sur la base des différents résultats, le lichen *P.hypotropia* constitue une source potentielle de composés bioactifs aux effets antioxydants et anti-inflammatoires pouvant être utilisé comme traitement pour la dermatite atopique.

**Mots clé :** *P.hypotropia*, antioxydante, anti-inflammatoire, HaCaT, acide usnique, dermatite atopique.

## **Abstract:**

Lichens are organisms consisting of a fungus and algae or cyanobacteria living in symbiosis, they are used in traditional medicine throughout the world to treat many diseases such as respiratory, digestive, gynecological, and cutaneous disorders. Recently, many studies have proven their antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory, and anti-tumor effects. This work aims to study the effect of *Parmotrema hypotropa* lichen extracts on induced atopic dermatitis in mice. Our work begins with a study of the phytochemical and antioxidant properties of extracts, followed by an evaluation of the anti-inflammatory effect *in vitro* and on an atopic dermatitis model *in vivo*. The content of polyphenols and flavonoids was determined in the dichloromethane and ethanol extracts according to the methods of Folin Ciocalcu and aluminum chloride respectively. The amount of usnic acid in the extracts was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant activity of the two extracts was evaluated by different methods DPPH, ABTS,  $\beta$ -carotene bleaching, and CUPRAC. The extracts were then tested *in vitro*, for their anti-inflammatory effect via the denaturation test of bovine serum albumin (BSA), and on the cell line of human keratinocytes (HaCaT) by measuring the intercellular production of ROS (Reactive Oxygen Species) and TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor-alpha), the effect of dichloromethane extract on atopic dermatitis was evaluated *in vivo* on a model induced by DNCB. The results show that the dichloromethane extract is richer in polyphenols and usnic acid, and it has a greater antioxidant effect than the ethanolic extract. Both extracts prevent the denaturation of BSA in a dose-dependent manner and reduce the intracellular production of ROS and TNF- $\alpha$  by keratinocytes. The dichloromethane extract tested on a dermatitis model shows a reduction in dermatitis-induced lesion scores. From the histological results, the *P.hypotropa* lichen leads to skin repair. Based on the different results, the *P.hypotropa* lichen is a potential source of bioactive compounds with antioxidant and anti-inflammatory effects that can be used as treatment for atopic dermatitis.

**Keywords:** *P.hypotropa*, antioxidant, anti-inflammatory, HaCaT, usnic acid, atopic dermatitis.



## ملخص:

الأشنيات هي كائنات حية تتكون من فطريات وطحالب أو بكتيريا زرقاء تعيش في تكافل ، وقد تم استخدامها في الطب التقليدي في جميع أنحاء العالم لعلاج العديد من الأمراض مثل أمراض الجهاز التنفسي والجهاز الهضمي وأمراض النساء والجلد. في الآونة الأخيرة ، أثبتت العديد من الأبحاث آثارها المضادة للأكسدة والبكتيريا والمضادة للالتهابات والمضادة للأورام. الهدف من هذا العمل هو دراسة تأثير مستخلصات *P.hypotropa* على التهاب الجلد التأتبي عند الفئران. يبدأ عملنا بدراسة الخصائص الكيميائية النباتية والخصائص المضادة للأكسدة للمستخلصات ، يليها تقييم للتأثير المضاد للالتهابات في المختبر وعلى نموذج التهاب الجلد التأتبي في الجسم الحي. تم تحديد محتوى البوليفينول والفلافونويد في مستخلص ثنائي كلورو ميثان والإيثانول وفقاً لطريقة Folin Ciocalcu وكلوريد الألومنيوم على التوالي. تم قياس كمية حمض الزنك في المستخلصات بواسطة كروماتوجرافيا سائلة عالية الأداء (HPLC). تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصين بطرق مختلفة DPPH و ABTS ، تبييض البيتا كاروتين و CUPRAC. ثم تم اختبار المستخلصات في المختبر لمعرفة تأثيرها المضاد للالتهابات عن طريق اختبار تمسخ لألبومين المصل البقري (BSA) وعلى الخلايا الكيراتينية البشرية (HaCaT) عن طريق قياس إنتاج الخلايا لـ ROS (أنواع الأكسجين التفاعلية) و  $TNF-\alpha$  (عامل نخر الورم ألفا) ، تم تقييم تأثير مستخلص ثنائي كلورو ميثان على التهاب الجلد التأتبي في الجسم الحي على نموذج مستحث بواسطة DNCB. أظهرت النتائج أن مستخلص ثنائي كلورو ميثان اغني بالبوليفينول وحمض الأوسنيك ، وله تأثير مضاد للأكسدة أكبر من المستخلص الإيثانولي. كلا المستخلصين يمنعان تمسخ BSA بطريقة تعتمد على الجرعة ويقللان من إنتاج الـ ROS و  $TNF-\alpha$  بواسطة الخلايا الكيراتينية. يُظهر مستخلص ثنائي كلورو ميثان الذي تم اختباره على نموذج التهاب الجلد انخفاضاً في درجات التقرحات الجلدية. حسب النتائج النسيجية ، يؤدي *P.hypotropa* إلى إصلاح الجلد. استناداً إلى النتائج المختلفة، يعد *P.hypotropa* مصدرًا محتملاً للمركبات النشطة بيولوجيًا ذات التأثيرات المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات الذي يمكن استخدامه كعلاج لالتهاب الجلد التأتبي.

**الكلمات المفتاحية :** *P.hypotropa* ، مضاد للأكسدة ، مضاد للالتهابات ، HaCaT ، حمض الأوسنيك ، التهاب الجلد التأتبي.

Année universitaire : 2021-2022

Présentée par : TARTOUGA MAYA ABIR

Intitulé :

**Etude de l'activité antioxydante et anti-inflammatoire d'extraits du lichen *Parmotrema hypotropia* sur un modèle de dermatite atopique chez la souris**

**Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat**

## RESUME

Les lichens, organismes constitués d'un champignon et une algue ou des cyanobactéries vivants en symbiose, sont utilisés en médecine traditionnelle à travers le monde pour traiter de nombreuses maladies tels que les troubles respiratoires, digestifs, gynécologiques et cutanées. Récemment, de nombreuses recherches ont prouvé leurs effets antioxydant, antibactérien, anti-inflammatoire et anti-tumoral. L'objectif de ce travail est d'étudier l'effet des extraits de lichen *Parmotrema hypotropia* sur la dermatite atopique induite chez les souris. Notre travail débute par une étude des propriétés phytochimiques, antioxydantes d'extraits, suivie d'une évaluation de l'effet anti-inflammatoire *in vitro* et sur un modèle de dermatite atopique *in vivo*. La teneur en polyphénols et en flavonoïdes a été déterminée dans l'extrait de dichlorométhane et d'éthanol selon les méthodes de Folin Ciocalcu et chlorure d'aluminium respectivement. La quantité d'acide usnique dans les extraits a été mesurée par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). L'activité antioxydante des deux extraits a été évaluée par différentes méthodes DPPH, ABTS, blanchiment de  $\beta$ -carotène et CUPRAC. Les extraits ont été ensuite testés *in vitro*, pour leur effet anti-inflammatoire via le test de dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA) et sur la lignée cellulaire de kératinocytes humains (HaCaT) en mesurant la production intercellulaire de ROS (Reactive Oxygen Species) et de TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor-alpha), l'effet de l'extrait de dichlorométhane sur la dermatite atopique a été évalué *in vivo* sur un modèle induit par le DNCB. Les résultats montrent que l'extrait de dichlorométhane est plus riche en polyphénols et en acide usnique, il a un effet antioxydant plus important que l'extrait éthanolique. Les deux extraits empêchent la dénaturation de la BSA de manière dose-dépendante et réduisent la production intracellulaire de ROS et de TNF- $\alpha$  par les kératinocytes. L'extrait de dichlorométhane testé sur un modèle de dermatite révèle une réduction des scores de lésions induites par la dermatite. De point de vue histologique, le lichen *P.hypotropia* entraîne une réparation de la peau. Sur la base des différents résultats, le lichen *P.hypotropia* constitue une source potentielle de composés bioactifs aux effets antioxydants et anti-inflammatoires pouvant être utilisé comme traitement pour la dermatite atopique.

**Mots clés :** *P.hypotropia*, antioxydante, anti-inflammatoire, HaCaT, acide usnique, dermatite atopique

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire d'Immunologie