

REFLEXIONS SUR LA VALEUR CHIMIOTAXONOMIQUE DES SUBSTANCES LICHENIQUES A BASSES CONCEN- TRATIONS: LE CAS DE L'ACIDE USNIQUE CHEZ *EVERNIA PRUNASTRI* (L.) ACH.

J. L. RAMAUT

Travaux lichénologiques di l'Institut de Morphologie végétale et de Botanique systématique n° 20,
Centre Interuniversitaire de Chimie organique, Université de Liège

(Received 24 June 1964)

Abstract—In two successive papers,^{1,5} Culberson stated that the microcrystallization test permits amounts as low as 2 μ g usnic acid to be detected, whereas paper chromatography is not sensitive enough for detecting this acid in *E. prunastri* (L.) Ach. In the present work, our previous observations³ are confirmed: paper chromatography does not reveal usnic acid in this species except when a large amount of material is used. However, this result does not invalidate a lack of sensitivity of the technique but rather the very low concentration of this acid in this case. When 5–10 μ g of pure usnic acid is added to a crude extract of *E. prunastri*, this substance can be detected by paper chromatography. In conclusion, we confirm the opinion of Culberson that usnic acid has any chemotaxonomical value in the present case.

Résumé—Dans deux publications successives,^{1,2} Culberson affirme que le test de microcristallisation permet de détecter jusqu'à 2 μ g d'acide usnique alors que la chromatographie de partage sur papier, de par sa sensibilité trop faible, ne convient pas pour le déceler chez *E. prunastri* (L.) Ach. Dans le présent travail, nous confirmons nos observations antérieures³, à savoir que la chromatographie sur papier ne permet pas de détecter l'acide usnique dans cette espèce sauf si l'on utilise des quantités assez importantes de matière. Ce résultat n'infirme toutefois pas la sensibilité de la technique mais plaide en faveur d'une concentration très faible de cet acide. Nous montrons, en particulier, que l'addition à un extrait brut d'*Evernia prunastri* de 5–10 μ g d'acide usnique pur permet la mise en évidence chromatographique indubitable de cette substance. En conséquence, nous rejoignons l'opinion de C. Culberson pour dénier à l'acide usnique toute valeur chimio-taxonomique dans le cas présent.

TOUT récemment, Culberson¹ a étudié la sensibilité de quelques tests microchimiques employés pour la mise en évidence de l'acide usnique et de l'atranorine, substances très répandues l'une et l'autre chez les lichens et parfois présentes simultanément. Un tel souci se justifie pleinement dès que les acides lichéniques prennent place parmi les critères taxonomiques; il devient fondamental quand la présence ou l'absence d'une substance chimique constitue la distinction principale, voire unique, entre deux taxa à morphologie semblable.

On peut cependant se poser la question de savoir si la présence d'un acide à concentration de quelques μ g peut encore avoir une signification chimiotaxonomique et si, sur cette présence infinitésimale, il est encore permis de créer des espèces ou des races chimiques. Dès qu'il faut mettre en oeuvre une certaine abondance de matière pour révéler la substance, l'utilité taxonomique réelle du critère devient fort aléatoire. C'est peut-être, pour ne pas dire certainement, le cas de l'acide usnique chez *Evernia prunastri* (L.) Ach.

En 1962, nous avons étudié de nombreuses récoltes d'*Evernia prunastri*³ afin de rechercher

¹ C. CULBERSON, *Microchem. J.* 7, 153 (1963).

² C. CULBERSON, *Phytochem.* 2, 335 (1963).

³ J. L. RAMAUT et J. LAMBINON (avec la coll. de A. TARGÉ), *Lejeunia* Nouv. Ser., 12, 1 (1962).

parmi celles-ci l'existence d'une "espèce chimique" créée par Duvigneaud,⁴ *E. herinii*. Celle-ci se caractérise selon cet auteur par l'absence d'acide usnique, toujours présent dans *E. prunastri*.

Tous les spécimens que nous avons examinés par chromatographie de partage sur papier se sont montrés dépourvus d'acide usnique. Cette constatation assez surprenante nous a conduit à effectuer diverses expériences appelées à préciser la sensibilité de cette méthode vis-à-vis de l'acide usnique. Nous sommes arrivés à apercevoir, sur papier, 4 μ g d'acide usnique pur, en utilisant des u.v. de 254 m μ . Par contre, à cette même concentration, nous n'avons pas enregistré de réaction positive avec le réactif d'Ehrlich, recommandé pour la détection de l'acide usnique dans un extrait. En conclusion de ce travail, nous avons dénié toute valeur systématique à *Evernia herinii* et avons conclu à l'impossibilité de mettre en évidence l'acide usnique chez *E. prunastri* par chromatographie de partage sur papier, tout au moins quand on utilise relativement peu de matériel. Nous n'avons pas fait appel aux tests de microcristallisation car, pour la séparation de l'atranorine et de l'acide usnique, Mitsuno déjà⁵ en déconseille l'emploi.

En 1963, Culberson, dans un premier article,¹ affirme l'impossibilité de détecter l'acide usnique à une concentration inférieure à 10 μ g par chromatographie sur papier quand on utilise des u.v. de 360 m μ ; elle juge donc cette technique comme trop peu sensible. Par contre, elle prétend que par microcristallisation (solution GE), on détecte régulièrement 2 μ g d'acide et souvent même moins (0,4 à 0,8 μ g). Dans un second article,³ Culberson affirme la présence presque constante de l'acide usnique chez *E. prunastri*, mais corrige cependant cette opinion en précisant qu'il est parfois présent à une concentration si faible qu'il n'est plus possible de le détecter. Elle conclut à une présence erratique de cet acide, qui suggère que son existence n'a pas de signification taxonomique; en cela nous partageons pleinement son avis.

Nous sommes cependant en désaccord avec l'opinion de Culberson au sujet de certains aspects techniques. Nous émettons tout d'abord de nettes réserves quant à la sensibilité du test de microcristallisation vis-à-vis d'un extrait brut d'*Evernia*. Suivant Culberson, la chromatographie, qui entraîne une séparation des constituants de l'extrait, ne permet pas de détecter 5 μ g d'acide, en fait purifié, alors qu'une microcristallisation, en présence de diverses impuretés, donne un résultat à l'échelle de 2 μ g. Peut-être pourra-t-on accepter une telle sensibilité du "crystal test" et la certitude d'une détection quand il s'agit de l'acide pur, c'est-à-dire de celui que l'on sait être là, mais non quand on s'adresse à un extrait brut naturel étant donné les incidences dues aux corps étrangers.

Comment peut-on affirmer avec certitude que l'acide usnique est ou non présent dans un thalle déterminé qui pèse 100 mg et moins quand on constate qu'il faut parfois traiter 100 g de matière sèche et plus pour récolter quelque 27 mg d'acide, autrement dit une concentration moyenne de 27 μ g dans 100 mg de thalle?

Nous sommes par ailleurs quelque peu surpris de Culberson ne mette jamais l'acide usnique en évidence par chromatographie sur papier, alors qu'elle en affirme la présence par "crystal test" chez *E. prunastri*, *E. mesomorpha* et *E. perfragilis*. Il faut croire que la concentration y est bien faible, inférieure à 5 μ g, puisqu'à cette concentration nous obtenons une détection chromatographique en u.v. 254 m μ .

On prétend qu'il peut y avoir interférence entre les concentrations respectives d'acide

⁴ P. DUVIGNEAUD, *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.* 72, 148 (1940).

⁵ M. MITSUNO, *Pharmaceut. Bull.* 1, 170 (1953).

usnique, d'atranorine et d'acide évernique, ces deux dernières substances étant présentes dans le thalle à des concentrations nettement plus élevées que l'acide usnique. Tout d'abord la question se pose de savoir pourquoi cette interférence ne se manifesterait pas quand on procède à une microcristallisation, d'autant plus que celle-ci se réalise très souvent en partant d'un extrait acétonique qui contient certainement les 3 substances et particulièrement de l'acide évernique? Quand nous chromatographions un extrait benzénique, nous avons surtout de l'acide usnique, de l'atranorine mais très peu d'acide évernique; l'extrait est par conséquent plus pur que celui que l'on obtient directement de l'acétone. De plus, la chromatographie a précisément pour but de séparer les constituants d'un mélange, donc de faciliter leur détection en supprimant au maximum les interférences gênantes.

Partant de ce raisonnement, de nos observations antérieures et de celles de Culberson, nous avons repris l'examen de la mise en évidence de l'acide usnique par chromatographie de partage sur papier, en considérant l'acide usnique pur, des extraits d'*Evernia prunastri* et des extraits appartenant à d'autres lichens contenant également cet acide. Parallèlement à ces examens chromatographiques, nous avons aussi revu la question de la réaction d'Ehrlich au sujet de laquelle Culberson ne partage pas notre opinion quand nous écrivons qu'elle se montre parfois négative avec nos extraits d'*Evernia prunastri*. Nous avons entrepris de déterminer la sensibilité de cette réaction en présence de quantités connues et croissantes d'acide usnique pur.

A. Réaction d'Ehrlich

Nous avons ajouté 1 ml de réactif d'Ehrlich frais respectivement à diverses quantités d'acide usnique pur, à 2,5–200 μg . Nous avons chauffé, refroidi puis additionné de 2 ml d'éthanol 94°. Avec 2,5–10 μg la réaction est strictement négative; avec 20 μg on perçoit une coloration vert bleuâtre très faible; avec 40 μg on perçoit une coloration vert bleuâtre faible; avec 60 μg on perçoit une coloration bleuâtre faible; avec 80–100–150–200 μg on perçoit une coloration bleu-clair. Dans aucun cas, on n'obtient la coloration bleu franc caractéristique; étant donné ces observations, comment détecter par cette voie 10 μg dans un extrait?

Après avoir examiné la réaction en présence d'acide usnique pur, nous l'avons appliquée, dans les mêmes conditions, à des résidus d'extraits benzéniques provenant de 500 mg de thalle d'origines diverses et même à des thalles appartenant à d'autres lichens, tels *Usnea* sp. et *Cladonia sylvatica*. Voici le matériel étudié: *E. prunastri* récolté (i) à Bende (Condroz) sur *Ulmus* sp.; (ii) à Hout-si-Plout (Condroz) sur *Fraxinus*; (iii) à Biron (Famenne) sur *Quercus*, et (iv) à Monthou-sur-Bièvre (L. et C., France) sur *Acer* sp. (W. C. Culberson 10.461); *Usnea* sp.; *Cladonia sylvatica*.

A notre grand étonnement, la réaction d'Ehrlich a été positive dans toutes les récoltes d'*Evernia* ainsi que dans celles de *C. sylvatica* et d'*Usnea* sp. D'après ces résultats et par comparaison avec ceux que l'on obtient quand on utilise l'acide pur, tous les spécimens examinés doivent contenir une teneur supérieure au moins à 20 μg d'acide usnique. Pour-suivant le raisonnement, puisque la chromatographie permet la mise en évidence d'une concentration de 10 μg (Culberson, Ramaut *et alii*), tous ces extraits devraient révéler de l'acide usnique à la chromatographie. Nous allons maintenant voir ce qu'il en est quand on applique cette technique.

B. Chromatographie de partage sur papier

Comme précédemment nous employons le papier Whatman no. 1, la méthode ascendante et la phase n-butanol– NH_4OH . La révélation est faite en u.v. de 254 $\text{m}\mu$. Nous chromato-

graphions respectivement de l'acide usnique pur à la concentration de 5 et 10 μg , les résidus des extraits benzéniques des récoltes de Bende, Biron, Hout-si-Plout et Monthou-sur-Bièvre (extraits provenant de 500 mg de thalle), ainsi que les résidus des extraits benzéniques de *Cladonia sylvatica*, *Parmelia caperata*, *Usnea* sp. et *Evernia divaricata*.

L'examen du chromatogramme 1 permet les observations suivantes: (a) 5 et 10 μg d'acide usnique pur sont détectés en u.v. 254 m μ . (b) Dans la récolte de Monthou-sur-Bièvre, traces d'acide usnique. (c) Dans les récoltes de Bende-Biron-Hout-si-Plout, pas d'acide usnique. (d) Dans les récoltes de *Cladonia-Parmelia-Usnea* et *E. divaricata*, acide usnique présent.

Ces résultats sont pour le moins surprenants et inexplicables par rapport à ceux que fournissent la réaction d'Ehrlich. Jusqu'à présent, nous n'avons pu élucider cette dualité entre les deux techniques; nous avons cependant poursuivi nos examens en procédant à la chromatographie de diverses combinaisons que voici: (a) Acide usnique à la concentration de 5 et 10 μg . (b) Acide usnique à la concentration de 5 μg + atranorine; idem avec 10 μg d'acide usnique. (c) Acide usnique à la concentration de 5 μg + atranorine et acide évernique; idem avec 10 μg d'acide usnique. (d) Résidu de l'extrait benzénique de la récolte de Biron. (e) Résidu de l'extrait benzénique de la récolte de Biron + 5 μg d'acide usnique; idem avec 10 μg d'acide usnique.

Le chromatogramme 2 permet de se rendre compte des résultats que donne la technique chromatographique. (1) D'une manière générale, nous détectons l'acide usnique à la concentration de 5 et 10 μg , qu'il soit seul ou en mélange avec des quantités nettement supérieures d'atranorine et d'acide évernique. (2) Dans le résidu de l'extrait benzénique du spécimen de Biron, nous confirmons une fois de plus l'absence d'acide usnique. (3) Dans le résidu auquel nous ajoutons 5 μg et 10 μg d'acide, nous détectons ce dernier.

En présence de ces résultats que devons-nous penser de l'interférence de l'atranorine et de l'acide évernique avancée pour expliquer la faillite du test chromatographique? A notre avis elle ne peut répondre de celle-ci.

Un autre argument expérimental, qui renforce cette première observation, est le cas d'un extrait d'*Evernia prunastri* où l'on ne détecte pas d'acide usnique, mais où celui-ci se met en évidence quand il y a été ajouté à raison de 10 voire même de 5 μg . Il est clair dans ce dernier cas qu'une interférence des substances présentes dans le thalle d'*Evernia prunastri* ne peut expliquer la non détection de l'acide usnique quand il est présent.

Nous pensons qu'il faut simplement admettre une concentration tellement faible que les quantités habituellement utilisées de thalle ne permettent pas de mettre la substance en évidence, ceci signifie donc une teneur inférieure à 5 μg . On arrivera dans certains cas à détecter l'acide usnique chez cette espèce; nous y sommes parvenu en partant d'une récolte importante de matière, 80–100 g. A ce moment pourtant, nous sommes loin d'un critère chimiotaxonomique pratiquement utilisable et nous enlevons à la présence ou l'absence de l'acide usnique toute valeur systématique. Dans ce sens nous rejoignons d'ailleurs l'opinion de Culberson qui déclare que l'acide usnique n'a aucune valeur taxonomique dans le genre *Evernia*.