

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À CHICOUTIMI
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN
RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR
WIVECKE DAHL
B. Sc. (BIOCHIMIE)

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DES MÉTABOLITES SECONDAIRES CHEZ LES
LICHENS FRUCTICULEUX *CLADINA STELLARIS* ET *CLADINA RANGIFERINA*

FÉVRIER 2003



Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

à Charles

RÉSUMÉ

Les lichens *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina*, mieux connus sous le nom de mousses à caribou, dominant souvent la végétation des pessières noires ouvertes. Ces peuplements jugés improductifs d'un point de vue forestier, aussi nommés pessières noires à lichens ou dénudés secs, constituent une problématique importante tant au niveau écologique qu'économique. Ces dénudés secs semblent apparaître suite à des accidents de régénération survenant dans le domaine de la pessière noire à mousse. Les facteurs feu, lit de germination et viabilité des graines seraient les principaux acteurs mettant en scène l'ouverture irréversible de la forêt dense. L'influence réelle des lichens sur la dynamique écologique de ces forêts en déclin demeure inconnue jusqu'à ce jour. Plusieurs hypothèses quant au maintien et à la progression de la fragmentation, mettent en cause des facteurs physiques ou chimiques. Parmi les possibilités d'interférences sur la croissance des arbres ou leur régénération figure la libération d'agents allélopathiques par les lichens. Les activités biologiques observées pour divers métabolites secondaires provenant des lichens, montrent qu'ils peuvent limiter la croissance cellulaire animale et végétale. Hormis pour l'acide usnique (21) et quelques rares composés lichéniques, peu de connaissances sur l'identité des composés et des propriétés biologiques des extraits des lichens du genre *Cladina* sont disponibles. C'est en partie par ce manque d'information, qu'il est difficile d'établir un lien solide entre le relâchement de substances allélopathiques et la diminution progressive de la densité d'épinette noire dans les peuplements en phase d'ouverture.

Le premier objectif de cette recherche est donc de mieux connaître les composés biosynthétisés par *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina*. Pour ce faire, une grande variété d'extraits a été obtenue à partir de solvants organiques, tels que l'hexane, le chloroforme, le dichlorométhane, l'acétone, l'éthanol et le méthanol, ainsi que des mélanges de ces solvants. Les extraits bruts ont été par la suite analysés par chromatographie gazeuse (GC) et spectrométrie de masse (MS). Les résultats obtenus montrent que la complexité des extraits est sous-estimée par la littérature. Plusieurs structures sont proposées à partir de l'analyse des spectres de masse avec la banque de données ou en comparant avec la littérature. Par contre, la présence de certains dérivés monoaromatiques semble reliée à la dégradation des depsides pendant le processus analytique. Afin d'obtenir plus d'information sur les composés inconnus, plusieurs tentatives de séparation par solubilité différentielle et d'isolation par chromatographie éclair ont été effectuées. Cette dernière approche a permis l'isolation de trois produits, qui ont été caractérisés par spectroscopie RMN (résonance magnétique nucléaire). Le produit isolé chez *Cladina stellaris* a été identifié comme étant l'acide usnique (21), tandis que chez *Cladina rangiferina* les composés isolés sont l'éthylhaematommate (8) et le β -orcinolméthylcarboxylate (5). Ce dernier correspond au produit de dégradation de l'acide atranorique (14), le composé le plus abondant chez *Cladina rangiferina*. Des extraits aqueux ont été obtenus par macération dans des mélanges EtOH-H₂O (1 : 4, 1 : 1 et 4 : 1). Les analyses HPLC, qui ont permis d'évaluer la complexité des extraits obtenus avec l'EtOH et le mélange EtOH-H₂O (4 : 1), révèlent plusieurs inconnus chez *Cladina rangiferina* et chez *Cladina stellaris*.

Le second objectif du travail est d'évaluer l'effet sur la croissance cellulaire des extraits aqueux. Pour ce faire, un test d'inhibition de croissance est effectué sur une lignée de cellules cancéreuses. Chez *Cladina stellaris* l'extrait susceptible de contenir le plus d'acide usnique (21) entraîne une inhibition de la croissance cellulaire, ce qui concorde bien avec l'activité biologique de cette molécule rapportée par la littérature. Chez *Cladina rangiferina* l'activité est observable avec l'extrait obtenu avec le mélange EtOH-H₂O le plus polaire. L'inhibition de la croissance cellulaire, met en évidence le potentiel inhibiteur des extraits aqueux des lichens.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon co-directeur de maîtrise M. André Pichette, qui a bien voulu m'encadrer et m'accueillir dans son équipe pendant ce projet. Sans sa confiance et ses encouragements, le projet n'aurait jamais pu s'achever. Il s'est d'autant plus investi, en me permettant d'acquérir une expérience unique de recherche en chimie médicinale. De plus, M. Pichette m'a soutenu durant tout ce projet par ses conseils et son optimisme. L'ambiance qu'il fait régner dans son laboratoire a de plus grandement contribué au maintien de ma motivation et au plaisir de travailler au sein de son équipe.

Je tiens aussi tout particulièrement à remercier mon co-directeur M. Daniel Lord, pour m'avoir offert ce projet et de m'avoir soutenu par le biais de son équipe. Je tiens aussi à remercier une figure de proue dans le domaine de la chimie des produits naturels, M. François-Xavier Garneau, pour m'avoir insufflé sa passion pour les produits naturels avant même le début de mes études universitaires et de l'avoir également ranimée en m'introduisant aux groupes de recherche de l'UQAC. De plus, c'est grâce à son intervention que je fus orientée vers ce projet.

Le travail n'aurait jamais pu être complété sans l'utilisation du GC-MS du LASEVE et ni sans la participation des assistantes de recherches, Mme Hélène Gagnon et Mme France-Ida Jean. Sans oublier les précieuses analyses RMN effectuées par M. Jimmy Bouchard de l'Université Laval et M. Michel Girard de Santé Canada.

C'est en grande partie grâce à M. Jean-Claude Madelmont de l'INSERM unité 484, de Clermont-Ferrand, que j'ai pu acquérir une expérience unique ayant trait aux tests d'activité biologique, puisqu'il a bien voulu m'accueillir au sein de son institut. Une bonne part de ma reconnaissance va à M. Jean Legault, qui m'a transmis de façon exceptionnelle toute son expérience en culture cellulaire et en test d'activité biologique. Le temps que m'a consacré mon ami et superviseur de stage, m'a permis de m'épanouir autant professionnellement que personnellement.

Je tiens aussi à remercier M. Pierre-Luc Boudreault, étudiant au premier cycle d'avoir bien voulu consacrer son projet d'été à l'étude des lichens. Sans les discussions partagées avec M. Jean François Boucher, les multiples facettes de la problématique forestière ne m'auraient paru aussi claires. Je tiens donc à le remercier de m'avoir éclairé sur la dynamique de la pessière.

La générosité du département des sciences fondamentales s'est non seulement traduite par un soutien informatique et matériel, par aussi par le biais de M. André Barette qui m'a permis d'adoucir les coûts élevés de cette recherche.

Cette recherche de longue durée n'aurait pu se faire sans l'appui financier du Consortium de Recherche sur la forêt boréale, ni sans la bourse d'excellence versée par Abitibi-Consolidated, qui m'ont permis de réduire mon endettement. Le ministère de l'Éducation du Québec, m'a aussi généreusement soutenu pendant la durée de mon stage à l'étranger. Tous ces donateurs m'ont permis d'acheminer cette recherche à l'abri des inquiétudes monétaires.

Enfin, je tiens à remercier mon collègue et ami M. Serge Lavoie, qui m'a pendant la totalité de cette recherche, soutenu et aidé par ses justes conseils. Il s'est de plus beaucoup investi pour me fournir les bons outils de travail, autant pour la rédaction de ce mémoire que pour le travail en laboratoire. Sans oublier la tâche difficile qu'est de m'avoir patiemment supporté et écouté dans les moments difficiles comme heureux.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
REMERCIEMENTS	vi
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES ANNEXES.....	xviii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE	6
2.1. Influence écologique des lichens	7
2.1.1. Compétition ou facteurs physiques	7
2.1.2. Influence allélopathique ou facteurs chimiques.....	7
2.2. Lichens du genre <i>Cladina</i>	9
2.2.1. Morphologie des Cladinacées	9
2.3. Métabolisme secondaire des lichens.....	12
2.3.1. Métabolites secondaire des lichens	12
2.3.2. Rôle des métabolites secondaires.....	14
2.3.3. Voies biosynthétiques des produits phénoliques.....	15

2.4. Structures des composés phénoliques des lichens	16
2.4.1. Composés monoaromatiques: les orcinols et β -orcinols	16
2.4.2. Depsides	18
2.4.3. Depsidones	21
2.4.4. Dibenzofurane et acide usnique	22
2.4.5. Autres composés	23
2.5. Activité biologique	24
2.5.1. Activité des extraits de <i>Cladina stellaris</i> et <i>Cladina rangiferina</i>	25
2.5.2. Activité biologique des composés monoaromatiques	25
2.5.3. Activité biologique des depsides et depsidones	26
2.5.4. Activité biologique de l'acide usnique	27
CHAPITRE 3 PARTIE EXPÉRIMENTALE ET MÉTHODOLOGIE	28
3.1. Considérations générales	29
3.2. Échantillonnage des lichens	30
3.3. Identification des espèces	30
3.4. Chromatographie sur couche mince	31
3.5. Extraction des composés lichéniques	32
3.5.1. Extraction au Soxhlet	32
3.5.2. Extraction fractionnée par solvants au Soxhlet	34
3.5.3. Extraction par macération dans le solvant	35
3.5.4. Entraînement à la vapeur	35

3.6. Séparation des composantes des extraits par chromatographie éclair et par partition.....	36
3.6.1. Chromatographie éclair.....	36
3.6.2. Fractionnement par solubilité différentielle ou par partition	38
3.7. Chromatographie et spectroscopie.....	39
3.7.1. GC-MS	39
3.8. Chromatographie liquide haute performance (HPLC)	41
3.8.1. Appareils et colonnes utilisés.....	42
3.8.2. Préparation des solvants.....	43
3.8.3. Préparation de l'échantillon	44
3.8.4. Méthodes analytiques.....	44
3.9. RMN ¹ H et RMN ¹³ C.....	45
3.10. Évaluation de l'inhibition de croissance cellulaire (IC ₅₀).....	46
3.10.1. Culture cellulaire.....	48
3.10.2. Test de survie	48
3.10.3. Test de réduction cellulaire avec la Résazurine	49
3.10.4. Quantification de l'ADN cellulaire par le Hoechst 33342.....	50
CHAPITRE 4 RÉSULTATS ET DISCUSSION	52
4.1. Identification des espèces	53
4.2. Extraction sur <i>Cladina stellaris</i>	54
4.3. Extraction sur <i>Cladina rangiferina</i>	59
4.4. Analyse par CCM des composés de <i>Cladina stellaris</i> et <i>Cladina rangiferina</i>	60

4.5. Analyse par chromatographie gazeuse	64
4.5.1. Analyses des extraits par Soxhlet de <i>Cladina stellaris</i>	66
4.5.2. Analyse des extraits à température ambiante de <i>Cladina stellaris</i>	76
4.5.3. Analyse des huiles essentielles de <i>Cladina stellaris</i>	80
4.6. Analyse des composés de <i>Cladina rangiferina</i>	85
4.6.1. Influence de la chaleur sur l'acide atranorique	85
4.6.2. Analyse des extraits au Soxhlet de <i>Cladina rangiferina</i>	86
4.7. Analyse des extraits EtOH-H ₂ O par HPLC et tentatives d'isolation par HPLC semi-préparatif.....	91
4.8. Fractionnement de l'extrait à l'EtOH et Analyses des fractions obtenues par CCM et HPLC	94
4.9. Séparation par chromatographie éclair	99
4.10. RMN de l'acide usnique isolé chez <i>Cladina stellaris</i>	101
4.11. Analyse par RMN des produits isolés chez <i>Cladina rangiferina</i>	102
4.12. Évaluation de l'effet sur la croissance cellulaire (IC ₅₀) d'extraits de <i>Cladina stellaris</i> et <i>Cladina rangiferina</i>	105
CHAPITRE 5 CONCLUSION	110
5.1. Conclusions générales	111
5.2. Perspectives futures	113
BIBLIOGRAPHIE	115

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : TAPIS DE LICHENS	9
FIGURE 2 : <i>CLADINA STELLARIS</i>	10
FIGURE 3 : <i>CLADINA RANGIFERINA</i>	11
FIGURE 4 : STRUCTURE DE QUELQUES COMPOSÉS MONOAROMATIQUES.	17
FIGURE 5 : STRUCTURES DE QUELQUES DEPSIDES	19
FIGURE 6 : VOIES BIOSYNTHÉTIQUES SUGGÉRÉES POUR LA FORMATION DES META-DEPSIDES ET DES DEPSIDONES [44].	20
FIGURE 7 : STRUCTURE DE QUELQUES DEPSIDONES	21
FIGURE 8 : STRUCTURE DES DEUX ÉNANTIOMÈRES DE L'ACIDE USNIQUE (21).....	23
FIGURE 9 : COMPOSANTES DE L'EXTRACTEUR TYPE "SOXHLET"	33
FIGURE 10 : PARTITION DE L'EXTRAIT À ETOH DE <i>CLADINA STELLARIS</i>	38
FIGURE 11 : CCM DES EXTRAITS DANS L'ÉLUANT A	61
FIGURE 12 : CCM DES EXTRAITS ETOH-H ₂ O DANS L'ÉLUANT A.....	63
FIGURE 13 : FRAGMENTATION DE L'ACIDE USNIQUE (21) [27].....	67
FIGURE 14: FRAGMENTATION PROPOSÉE POUR LE β-ORCINOLMÉTHYLCARBOXYLATE (5) [97]	68
FIGURE 15 : DÉGRADATION THERMIQUE DE L'ACIDE PERLATOLIQUE (13).....	69
FIGURE 16 : FRAGMENTATION PROPOSÉE DE L'OLIVÉTOL (3) [86,99].....	70
FIGURE 17 : STRUCTURE DU BIS-(2-ÉTHYLHEXYL)ADIPATE (26).....	71
FIGURE 18 : FRAGMENTATION PROPOSÉE POUR LE 4-O- MÉTHYLOLIVÉTOLÉTHYLCARBOXYLATE (31) [86,97]	74

FIGURE 19 : STRUCTURE DU NONANAL (36) ET DU DÉCÉNAL (37)	79
FIGURE 20 : STRUCTURE DU 4-O-MÉTHYLOLIVÉTOLMÉTHYLCARBOXYLATE (39)	79
FIGURE 21 : STRUCTURE DE QUELQUES COMPOSÉS DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CLADINA</i> <i>STELLARIS</i>	84
FIGURE 22 : FRAGMENTATION PROPOSÉE POUR LE MÉTHYLHAEMATOMMATE (7) [99]	88
FIGURE 23 : PARTITION DE L'EXTRAIT À L'ETOH DE <i>CLADINA STELLARIS</i>	94
FIGURE 24 : PARTITION DE L'EXTRAIT À L'ETOH DANS LE MÉLANGE CHCl ₃ -H ₂ O	95
FIGURE 25 : PARTITION DANS LE MÉLANGE HEXANE-90 % MEOH AQ.	96
FIGURE 26 : ÉTHANOLYSE DE L'ACIDE ATRANORIQUE (14)	100
FIGURE 27 : ACIDE USNIQUE (21)	101
FIGURE 28 : STRUCTURE DE L'ÉTHYLHAEMATOMMATE (8) ET DU β- ORCINOLMÉTHYLCARBOXYLATE (5)	103

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : RÉACTIONS COLORIMÉTRIQUES DES <i>CLADINA</i>	11
TABLEAU 2 : PRINCIPALES CLASSES DE MÉTABOLITES SECONDAIRES DES LICHENS [44].....	14
TABLEAU 3 : PROVENANCE ET GRADE DES RÉACTIFS ET SOLVANTS	29
TABLEAU 4 : COMPOSANTES ET PARTICULARITÉ DU GC-MS.....	40
TABLEAU 5 : CONDITIONS D'OPÉRATIONS GC-MS UTILISÉES POUR L'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES ET DES COMPOSÉS EXTRAITS DES LICHENS.	41
TABLEAU 6 : TYPES DE CHROMATOGRAPHES ET COLONNES UTILISÉES POUR LA HPLC.....	43
TABLEAU 7 : NOMS ET PROVENANCE DES PRODUITS UTILISÉS EN CULTURE CELLULAIRE ET POUR LES TESTS D'ACTIVITÉ	47
TABLEAU 8 : CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES ET RÉSULTATS DES RÉACTIONS COLORIMÉTRIQUES POUR LES ESPÈCES ÉTUDIÉES.	54
TABLEAU 9 : CONDITIONS POUR LES EXTRACTIONS AU SOXHLET, PAR MACÉRATION ET PAR ENTRAÎNEMENT À LA VAPEUR SUR <i>CLADINA STELLARIS</i>	55
TABLEAU 10 : CONDITIONS DE L'EXTRACTION FRACTIONNÉE PAR SOXHLET SUR <i>CLADINA STELLARIS</i>	58
TABLEAU 11 : CONDITIONS POUR LES EXTRACTIONS PAR SOXHLET ET PAR MACÉRATION SUR <i>CLADINA RANGIFERINA</i>	59
TABLEAU 12 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DES COMPOSÉS DE L'EXTRAIT À L'HEXANE DE <i>CLADINA STELLARIS</i>	66
TABLEAU 13 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DES COMPOSÉS DE L'EXTRAIT AU CHCl_3 NO 2 DE <i>CLADINA STELLARIS</i>	72

TABLEAU 14 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DES COMPOSÉS DE L'EXTRAIT AU CHCl ₃ NO 3 DE <i>CLADINA STELLARIS</i>	72
TABLEAU 15 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DES COMPOSÉS DE L'EXTRAIT À L'ETOH DE <i>CLADINA STELLARIS</i>	75
TABLEAU 16 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DES COMPOSÉS DE L'EXTRAIT CHCl ₃ -MEOH DE <i>CLADINA STELLARIS</i>	77
TABLEAU 17 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DE L'EXTRAIT DCM-ACÉTONE DE <i>CLADINA STELLARIS</i>	80
TABLEAU 18: DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DES COMPOSÉS VOLATILES DE L'HUILE ESSENTIELLE DE <i>CLADINA STELLARIS</i>	82
TABLEAU 19 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DE L'ACIDE ATRANORIQUE (14) ..	86
TABLEAU 20 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DES COMPOSÉS DE L'EXTRAIT AU CHCl ₃ DE <i>CLADINA RANGIFERINA</i>	87
TABLEAU 21 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DES COMPOSÉS DE L'EXTRAIT À L'ACÉTONE DE <i>CLADINA RANGIFERINA</i>	89
TABLEAU 22 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES ET MS DES COMPOSÉS DE L'EXTRAIT À L'ETOH DE <i>CLADINA RANGIFERINA</i>	91
TABLEAU 23 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES DE L'EXTRAITS ETOH-H ₂ O (4:1) DE <i>CLADINA STELLARIS</i>	92
TABLEAU 24 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES DE L'EXTRAIT ETOH-H ₂ O (4:1) DE <i>CLADINA RANGIFERINA</i>	93

TABLEAU 25 : DONNÉES CHROMATOGRAPHIQUES DE L'EXTRAIT À LA FRACTION 90 % MEOH AQ	98
TABLEAU 26 : ASSIGNATION DES SIGNAUX OBSERVÉS EN RMN ¹ H ET RMN ¹³ C DE L'ACIDE USNIQUE (21)	102
TABLEAU 27 : ASSIGNATION DES SIGNAUX OBSERVÉS EN RMN ¹ H ET RMN ¹³ C DE L'ÉTHYLHAEMATOMMATE (8).	103
TABLEAU 28 : ASSIGNATION DES SIGNAUX OBSERVÉS EN RMN ¹ H ET RMN ¹³ C DU β- ORCINOLMÉTHYLCARBOXYLATE (5)	105
TABLEAU 29 : CYTOTOXICITÉ DES EXTRAITS ETOH-H ₂ O DE <i>CLADINA STELLARIS</i>	106
TABLEAU 30 : CYTOTOXICITÉ DES EXTRAITS ETOH-H ₂ O DE <i>CLADINA RANGIFERINA</i>	107

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 Liste des abréviations	132
ANNEXE 2 Structures des composés identifiés en GC-MS.....	135
ANNEXE 3 Spectres de masse des composés	138
ANNEXE 4 Spectres RMN des dérivés.....	168
ANNEXE 5 Chromatogrammes des analyses GC-MS	177
ANNEXE 6 Chromatogrammes des analyses HPLC (Shimadzu).....	185
ANNEXE 7 Chromatogramme HPLC (Perkin Elmer)	192

CHAPITRE 1
INTRODUCTION

La forêt boréale est considérée comme une des plus grandes richesses du territoire canadien, aussi bien pour ses aspects économique, récréo-touristique que socio-culturel. Ce biome qui s'étend tout autour de la terre cache une potentialité inexploitée que révèle le passage de nos ancêtres. Depuis longtemps la forêt est une source de plantes possédant des vertus thérapeutiques, d'aliments et de matériaux, comme le bois à partir duquel gravite l'industrie forestière. C'est ainsi qu'elle contribue à l'essor de l'économie du Québec.

Par ailleurs la forêt boréale, riche d'une biodiversité qui lui est propre, se subdivise en plusieurs domaines forestiers, dont celui de la pessière noire à mousses, qui y occupe la plus grande partie au Québec [1]. Ce territoire qui représente plus de 28 % de la forêt exploitable, se caractérise par un couvert forestier densément peuplé par l'épinette noire (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) [1]. De plus, l'incidence variable mais fréquente des feux y joue un rôle central puisque c'est ainsi que se maintient la dominance de l'épinette noire. Les feux sont essentiels pour assurer sa multiplication sexuée, son principal mode de régénération, qui débute rapidement après l'incendie [2,3,4]. Ils permettent non seulement l'ouverture des cônes semi-sérotineux, mais créent également un milieu propice à la germination des graines, par la mise à nu du sol minéral [1,2,3,4,5]. Par contre sous certaines circonstances, la pessière noire à mousses s'ouvre et se fragmente progressivement, ce qui résulte en la formation sporadique de pessières à lichens [6]. L'apparition de ces milieux ouverts improductifs constitue une problématique écologique et économique importante. Mais le processus semble naturellement irréversible, même après plusieurs années, comme en témoignent les modèles de succession végétale [1,2,5,7,8,9,10].

En ce qui concerne l'apparition de ces milieux, il y a tout lieu de croire qu'ils sont la conséquence d'accidents de régénération, possiblement reliés à l'incidence et l'intensité des feux accompagnés ou non de facteurs pouvant affecter la production de graines viables et/ou l'installation des semis [3,4,11]. D'après le concept de la succession végétale, l'intensité et les conditions précédant les feux pourraient engendrer des stades successifs, conduisant aux pessières à lichens [2,8]. Selon un aspect dynamique, des feux trop rapprochés pourraient fragmenter le peuplement par perturbations de la reproduction et/ou de l'installation des semis [3,5,12]. Par exemple, la conjonction entre des feux trop rapprochés et l'impact de la tordeuse des bourgeons de l'épinette, pourrait entraîner un déclin de la densité des peuplements [4]. C'est ainsi que la pessière noire à mousse disparaîtrait pour faire place à des milieux ouverts, dont la strate cryptogamique composée d'un cortège de lichens (genre *Cladonia* et *Cladina*), domine à long terme, autant la strate arbustive qu'arborescente.

Une fois le processus d'ouverture enclenché, plusieurs facteurs seraient susceptibles de maintenir la structure ouverte et pourraient également l'aggraver [6]. Selon certaines hypothèses, des causes physiques, se situant principalement au niveau de l'équilibre hydrique, interviendraient dans la transition de la pessière noire à mousse vers une forêt fragmentée [3,13,14]. En plus des facteurs physiques, une interférence chimique entre les lichens et les arbres cohabitant dans ces milieux, pourrait être aussi en cause. Ce phénomène, baptisé allélopathie, se définit de façon générale comme une interaction négative sur une plante modulée par des agents chimiques sécrétés par une autre plante [15]. Les interactions allélopathiques ont été de nombreuses fois observées et décrites par

la littérature [15,16,17,18,19,20,22,23,24]. Selon certains auteurs, l'allélopathie est considérée comme une des causes d'échec de la régénération végétale [18,19,20]. Parmi les évidences qui soutiennent cette hypothèse concernant les pessières noires à lichens, figurent les travaux de Fisher *et al* [16] qui révèlent l'effet inhibiteur d'extraits de lichens du genre *Cladina* sur la croissance de plantules de conifères. Ceci nous amène à suggérer que la croissance de l'épinette noire puisse être perturbée par des composés sécrétés par les lichens du genre *Cladina*.

Bien que la plausibilité d'une telle hypothèse soit admise, peu de pistes concernant l'identité des composés susceptibles d'être actifs permettent d'étudier l'interaction directe entre les agents allélopathiques issus des *Cladina* et l'épinette noire à l'aide d'un modèle permettant l'extrapolation écologique. Les connaissances sur les métabolites secondaires de ces lichens étant peu évoluées, l'objectif principal de ce travail est donc d'étudier davantage la composition chimique d'extraits issus des lichens *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina*, qui prédominent dans les pessières ouvertes. Les objectifs spécifiques sont :

- Extraire et identifier les composés de *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina*.
- Mettre au point une stratégie d'isolation pour caractériser les composés inconnus ne pouvant être identifiés avec les méthodes d'analyses disponibles.
- Évaluer l'activité biologique d'extraits aqueux sur un modèle cellulaire animal.

Tout d'abord, afin de bien situer le contexte de cette recherche, une revue de littérature est présentée au Chapitre 2. Les aspects couverts permettront de se familiariser

avec les lichens étudiés ainsi qu'avec les composés biosynthétisés par ces espèces. Il sera également question du potentiel inhibiteur des lichens, plus précisément de l'effet, sur la croissance cellulaire des extraits et des molécules provenant des *Cladina* ou de proches parents. Ceci nous permettra de mieux juger du lien pouvant être établi pour d'éventuelles interactions allélopathiques avec l'épinette noire.

La section expérimentale et méthodologique qui est présentée au Chapitre 3, permet de prendre connaissance de l'approche expérimentale développée en vue d'enrichir les connaissances sur les composés des lichens étudiés et d'explorer le potentiel inhibiteur de la croissance cellulaire des extraits aqueux. C'est au Chapitre 4, que sont présentés et discutés les résultats obtenus. L'interprétation des résultats et la discussion porteront principalement sur certains aspects chimiques des composés des lichens, mais également sur l'activité biologique des extraits. En conclusion, un bref retour sur la signification des résultats se terminera par les perspectives futures qui viseront à mieux orienter les projets ultérieurs.

CHAPITRE 2
REVUE DE LA LITTÉRATURE

2.1. INFLUENCE ÉCOLOGIQUE DES LICHENS

Les interactions présentes dans une communauté naturelle sont non seulement régies par des facteurs physiques comme la compétition pour la lumière ou l'eau, mais aussi par les mécanismes de défense face au voisinage, pouvant se traduire par la libération d'agents chimiques [15,17,18,19,20]. Plusieurs études suggèrent que la pessière noire à lichens se prête aussi à ce type de relation, où l'implication des lichens semble omniprésente, à en juger par la littérature [9,21,22, 23,24,25,26,27,28,29].

2.1.1. Compétition ou facteurs physiques

Tout d'abord, le caractère compétitif du lichen se laisse entrevoir par la structure compacte formée par l'établissement de vastes colonies. Le tapis de lichens agirait comme isolant thermique et abaisserait considérablement la température du sol sous le couvert [13]. La diminution de température est un facteur limitant pour le métabolisme racinaire [14]. De plus, le couvert de lichens, en absorbant une grande quantité d'eau, pourrait aussi agir sur le taux d'humidité du sol [13]. Finalement, par sa capacité d'absorber les nutriments, le lichen pourrait perturber les cycles d'éléments nutritifs en les rendant moins disponibles pour les autres plantes [13,14].

2.1.2. Influence allélopathique ou facteurs chimiques

De nombreux composés allélopathiques ont été identifiés pour leurs effets inhibiteurs sur des plantes agricoles de même que sur des plantes indigènes [17,19,20]. Ces

produits sont généralement des phénols, comme les acides féruliques, les acides cafféiques, des coumarines et des terpènes, pouvant être lessivés ou sécrétés [17,18,19,20,21,22]. Ils sont possiblement accumulés dans des structures spécialisées, assurant ainsi la protection de l'organisme qui les métabolise [17,19,20]. Une fois relâchés à l'extérieur de la plante, les agents allélopathiques seraient absorbés par les tissus végétaux des plantes voisines.

Plusieurs observations font référence à des facteurs chimiques, soit les interactions de type allélopathique, auxquelles est associé un faible taux de croissance de l'épinette noire poussant en compagnie des lichens [9,15,18]. La présence de substances chez les lichens pouvant affecter la croissance végétale a été démontrée à plusieurs reprises par l'étude de leur activité biologique sur divers modèles de plantes [15,22,25,26,27,28,29]. Cependant, les travaux n'ont pu, jusqu'à maintenant, identifier clairement une relation allélopathique entre le lichen et l'épinette en milieu naturel.

D'autres travaux stipulent que l'effet des lichens *Cladina rangiferina* et *Cladina stellaris* sur la croissance des arbres se fait par relâchement de substances chimiques, qui auraient un effet non pas sur l'arbre, mais sur les champignons mycorhizoteurs racinaires [23,24]. Une telle interaction affecterait de façon significative la croissance des plantules et des transplants, par réduction de l'accumulation des nutriments comme le phosphore et l'azote [14,15].

2.2. LICHENS DU GENRE *CLADINA*

Dans la pessière noire à lichens, la strate cryptogamique est principalement occupée par les lichens du genre *Cladina*. Ce sont *Cladina rangiferina* (L.) Wigg. et *Cladina stellaris* (Opiz) Brodo qui figurent parmi les espèces les plus abondantes. Elles y forment un tapis dense et hétérogène avec d'autres lichens, au pied des arbres et éricacées (Figure 1). Le cortège de *Cladina* est composé également des espèces *arbuscula*, *mitis* et *stygia* [31].



Figure 1 : Tapis de lichens

2.2.1. Morphologie des Cladinacées

Longtemps considérées comme des lichens du genre *Cladonia*, les *Cladina* (*Cladonia* sous genre *Cladina*) forment une classe distincte. Ces lichens issus d'une association symbiotique entre un ascomycète et l'algue unicellulaire *Trebouxia*, se différencient des *Cladonia* par l'absence de cortex externe et de thalle primaire (corps végétatif adhérent au substrat) [32,33]. Ces lichens fruticuleux terricoles sont dressés par

un podétion (tige) vide, souvent abondamment ramifié mais dont les extrémités sont généralement dépourvues d'apothécie (fructification discoïde ou en forme de coupe) [33]. Comme ils n'ont pas de cortex externe, c'est la couche médullaire cartilagineuse du mycosymbiote (mycète associé) qui assure le maintien du thalle et l'enchâssement du photosymbiote (partenaire photosynthétique) [32,33]. Pour *Cladina stellaris*, le thalle est formé par des ramifications d'un diamètre équivalent au podétion et dont les extrémités sont orientées dans toutes les directions, lui donnant la forme d'un buisson dense [33,34,35]. La Figure 2 présente l'apparence générale de *Cladina stellaris* [32].



Figure 2 : *Cladina stellaris*

Pour *Cladina rangiferina*, le podétion est plus large que les ramifications qui sont d'ailleurs moins fréquentes que chez *Cladina stellaris* (Figure 3). Les extrémités sont formées par des petites pointes brunes dirigées dans la même direction et sont ramifiées en groupe de quatre [32,33,34,35].



Figure 3 : *Cladina rangiferina*

En plus des critères morphologiques les lichens peuvent être identifiés par des tests colorimétriques. Ces tests qui s'effectuent directement sur le thalle, utilisent la para-phénylènediamine (PD), l'hydroxyde de potassium (KOH) et l'hypochlorure de calcium (CaOCl) [27,32,33,34,36]. Le Tableau 1 donne les réactions colorimétriques pour les lichens retrouvés en Amérique du Nord et généralement présents dans les pessières ouvertes [32].

Tableau 1 : Réactions colorimétriques des *Cladina*

Test	<i>Cladina</i>					<i>Cladonia uncialis</i>
	<i>arbuscula</i>	<i>mitis</i>	<i>rangiferina</i>	<i>stellaris</i>	<i>stygia</i>	
KOH	(-)	(-)	(+) jaune	(-)	(+) jaune	(-)
CaOCl	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
PD	(+) rouge vif	(-)	(+) rouge orangé	(-)	(+) rouge orangé	(-)
KOH+CaOCl	(+) jaune	(+) jaune	(-)	(+)	(-)	(-)

Tel que le montre le Tableau 1, ces tests sont très utiles pour discriminer les espèces, à l'exception de *Cladina stygia* qui ne peut être différencié de *Cladina rangiferina*

par cette méthode, d'où l'importance de prendre en considération les critères morphologiques. Le thalle de *Cladina stygia* va du brun au noir, tandis que celui de *Cladina rangiferina* est gris cendré.

La réaction au PD indique la présence de l'acide fumarprotocétrarique (19), qui est absent chez *Cladina stellaris* et *Cladina mitis*. C'est ainsi qu'il est possible de différencier *Cladina mitis* de *Cladina arbuscula* qui présentent une forte similarité morphologique. La coloration allant du jaune à l'orangé est obtenue suite à l'attaque du carbonyle aldéhydique par l'amine primaire (de la PD) entraînant la formation d'une base de Schiff [27,37]. La réaction avec le KOH permet d'identifier les depsides, comme l'acide atranorique (14), qui donne la coloration jaune foncé observée uniquement chez *Cladina rangiferina* et *stygia*. Cette réaction est obtenue suite à l'hydrolyse du lien ester du depside [27,37]. Le test avec l'hypochlorure de calcium ou de sodium (CaOCl ou NaOCl) est négatif pour les espèces rencontrées en Amérique du Nord. Moins fiable en raison de son manque de stabilité, cette réaction est presque toujours précédée par le test du KOH, qui donne alors une coloration d'un jaune intense pour *Cladina arbuscula* et *mitis*, tandis qu'une coloration jaune pâle est obtenue pour *Cladina stellaris*.

2.3. MÉTABOLISME SECONDAIRE DES LICHENS

2.3.1. Métabolites secondaire des lichens

Les métabolites secondaires sont des composés non structuraux localisés dans certaines parties des végétaux [38]. Généralement de faibles poids moléculaires, leurs

structures très variables dérivent des métabolites primaires [39]. Jusqu'à maintenant plus de 700 métabolites secondaires, dont la structure a été élucidée, sont connus chez les lichens [27]. Le statut symbiotique des lichens fait en sorte que des composés uniques y sont métabolisés. Ces composés sont souvent apparentés aux produits biosynthétisés par les mycètes non symbiotiques. La majorité des composés secondaires retrouvés chez les lichens proviennent de la voie biosynthétique des acétogénines [42,44,45,46,47]. Cette famille représente les depsides, depsidones, dibenzofuranes, acides usnique et depsones, retrouvés spécifiquement chez ces symbiotes (organisme symbiotique) [34,40,41,42]. La production de certains composés, comme les depsides et les depsidones, nécessite que le mycosymbiote, soit en présence du photosymbiote, tel que démontré par des expériences *in vitro* [40,41,42]. La majeure partie des molécules serait produite par le mycosymbiote, tel que mis en évidence par la mise en culture d'hyphes symbiotiques isolés chez des lichens [42]. Le Tableau 2 montre les principales familles de produits naturels et les catégories auxquelles appartiennent les métabolites secondaires des lichens [42,44].

Tableau 2 : Principales classes de métabolites secondaires des lichens [44].

I. Voie des acétogénines	
A.	Acides aliphatiques secondaires, esters et composés apparentés
B.	Dérivés aromatiques de l'acide acétique
	1 Composés phénoliques mononucléaires
	2 Dérivés di- et tri-aryl de phénol simples
	a. para-, meta-Depsides, tridepsides et esters de benzyl
	b. Depsidones, depsones et diphényl ethers apparentées
	c. Dibenzofuranes et dérivés de l'acide usnique
	3 Chromones
	4 Naphthoquinones
	5 Xanthones
	6 Anthraquinones et xanthones biogéniquement reliées
II. Voie de l'acide mévalonique	
A.	Di-, sester- et triterpènes
B.	Steroïdes
III. Voie de l'acide shikimique	
A.	Terphénylquinones
B.	Dérivées de l'acide pulvinique

Une description détaillée des caractéristiques structurales des dérivés aromatiques des lichens, sera effectuée à la section suivante.

2.3.2. Rôle des métabolites secondaires

Plusieurs hypothèses ont été émises concernant leur rôle [17,19,20,26,27,34,38,39,42]. Ils ne semblent pas essentiels à la croissance végétale, mais peuvent jouer un rôle important dans les mécanismes de défense contre les agressions extérieures [38,42]. Notamment, certains métabolites tels que les anthraquinones, pourraient agir comme pigments accessoires, permettant en condition de faible luminosité de capter l'énergie solaire ou à l'opposé, de protéger l'organisme contre les effets nocifs induits par les radiations solaires [42]. Outre leur rôle comme agents protecteurs contre les stress physiques, les métabolites secondaires interviennent dans les mécanismes de défense

dirigés contre divers organismes. Par exemple, les terpènes et les dibenzofuranes possèdent des propriétés antibactériennes et antifongiques [31,38,42,43]. Les effets biologiques des métabolites de lichens seront traités en détails à la section 2.5.

2.3.3. Voies biosynthétiques des produits phénoliques

Les produits phénoliques sont difficiles à décrire car ils forment un vaste ensemble de produits naturels d'une grande diversité structurale. À priori, ils sont caractérisés par la présence d'au moins un noyau benzénique hydroxylé. La formation de ces composés peut être issue de deux voies biosynthétiques. La plus courante est celle de l'acide shikimique qui utilise comme précurseur les acides aminés aromatiques. Cette route biosynthétique conduit aux acides benzoïques, acétophénones, lignanes, lignines et coumarines. L'autre voie, celle des acétogénines (polyacétates), utilise comme précurseur l'acide acétique activée sous forme d'acétyl-S-coenzyme A [39]. Le couplage des unités acétates conduit à la formation des poly- β -cétosters qui, après cyclisation (condensation de Claisen), donnent naissance aux composés mono ou polycycliques. Les orcinols, les quinones, les xanthones, les depsides et les depsidones en sont des exemples. Des réductions et des variantes de l'aldolisation conduisent respectivement à la formation des acides gras et aux dérivés isopréniques, soient les terpènes, via l'acide mévalonique, aux dérivés isopréniques [39,42,44].

2.4. STRUCTURES DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES LICHENS

2.4.1. Composés monoaromatiques: les orcinols et β -orcinols

Les composés monoaromatiques sont des dérivés phénoliques simples issus de la cyclisation des chaînes poly- β -cétoesters. Deux composés aromatiques seraient à l'origine de la variabilité des substances lichéniques, l'orcinol (1) et le β -orcinol (2). La Figure 4 montre la structure de ces molécules et d'autres composés aromatiques connus [42,44].

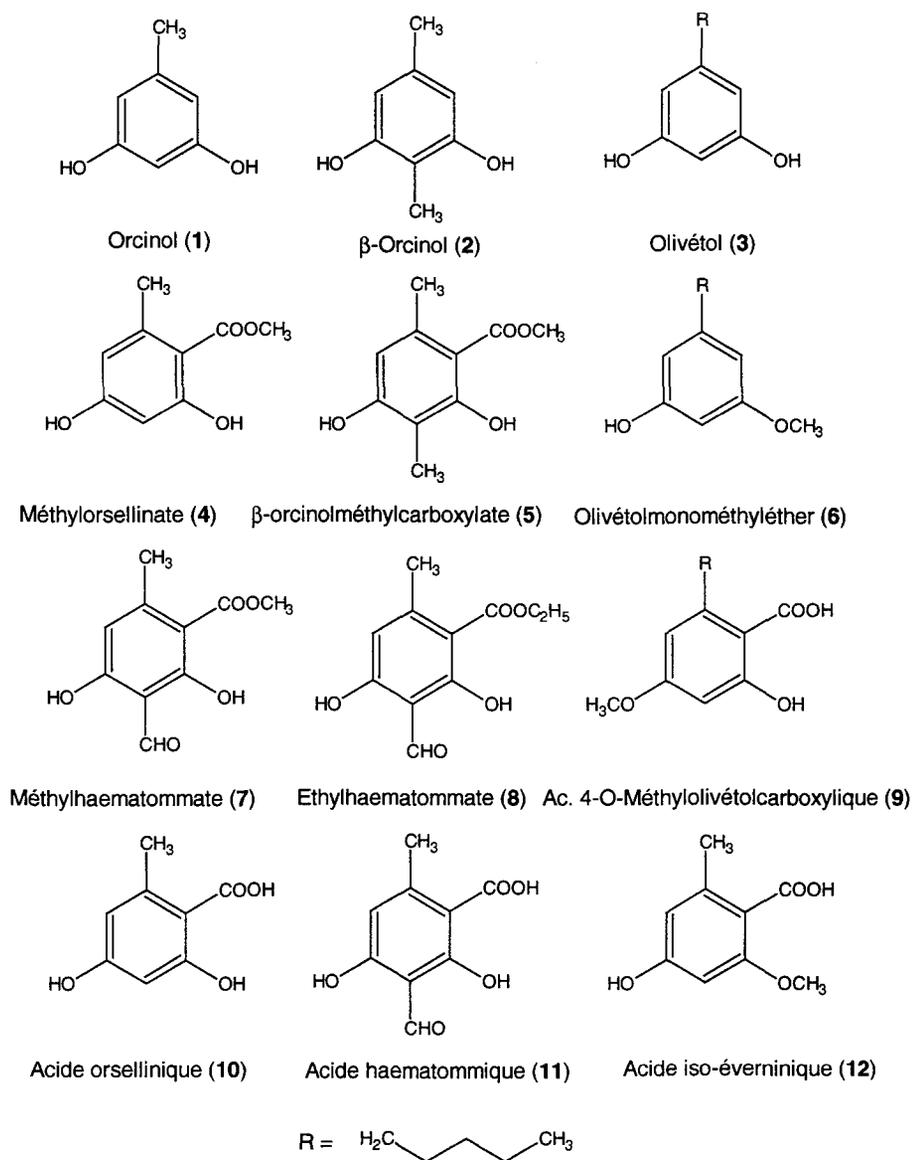


Figure 4 : Structure de quelques composés monoaromatiques.

L'orsinol (1) est dihydroxylé en position 1,3 et méthylé en position 5, tandis que le β -orsinol (2) contient deux groupements méthyles et orienté en position 2,5. Ces deux précurseurs peuvent, à la suite de diverses réactions (C-hydroxylation, O-méthylation, alkylation, isoprénylation et oxydation), conduire à une large variété de dérivés monocycliques [42,48]. La caractérisation des composantes de l'huile essentielle de *Evernia*

prunastri et *furfurcea* montrent que les composés monoaromatiques y sont abondants [49,50,51]. C'est ainsi que la présence de l'olivétol (3), un dérivé alkylé (pentyl) de l'orcinol (1) et son dérivé monométhylé, l'olivétolmonométhyléther (6), ont été identifiés. L'absence des composés monoaromatiques dans les cultures de mycobionts isolés propose qu'ils sont liés à l'enzyme catalysant le couplage jusqu'à ce qu'ait lieu la conjugaison [34]. C'est pourquoi la plupart des dérivés monoaromatiques chez les lichens, sont considérés par plusieurs auteurs comme des produits de dégradation des depsides et depsidones [27,49,52,53,54].

2.4.2. Depsides

Les depsides sont une classe de molécules probablement issues de la famille des acétogénines, puisqu'ils semblent dériver des composés monocycliques décrits précédemment. À la longue liste de depsides connus, s'ajoutent sans cesse de nouveaux composés bicycliques dont les caractéristiques structurales font l'objet de nouvelles découvertes [44]. Leur squelette de base est formé par l'estérification ou le couplage oxydatif de deux noyaux monoaromatiques, ce qui engendre une structure polycyclique [42,48,55]. Le noyau A directement lié sur le carbonyle de l'ester est joint au noyau B via l'attachement sur l'oxygène (Figure 6). Ce type de composé pourrait aussi être formé par la condensation de deux dérivés de l'acide hydroxybenzoïque, le groupement carboxylique de la première molécule s'estérifiant avec l'hydroxyle phénolique de l'autre molécule [42]. Comme les depsidones, ces molécules peuvent être classées selon leur précurseur

biosynthétique et en fonction de la position des substituants. La Figure 5 représente les principales depsides connues du genre *Cladina*.

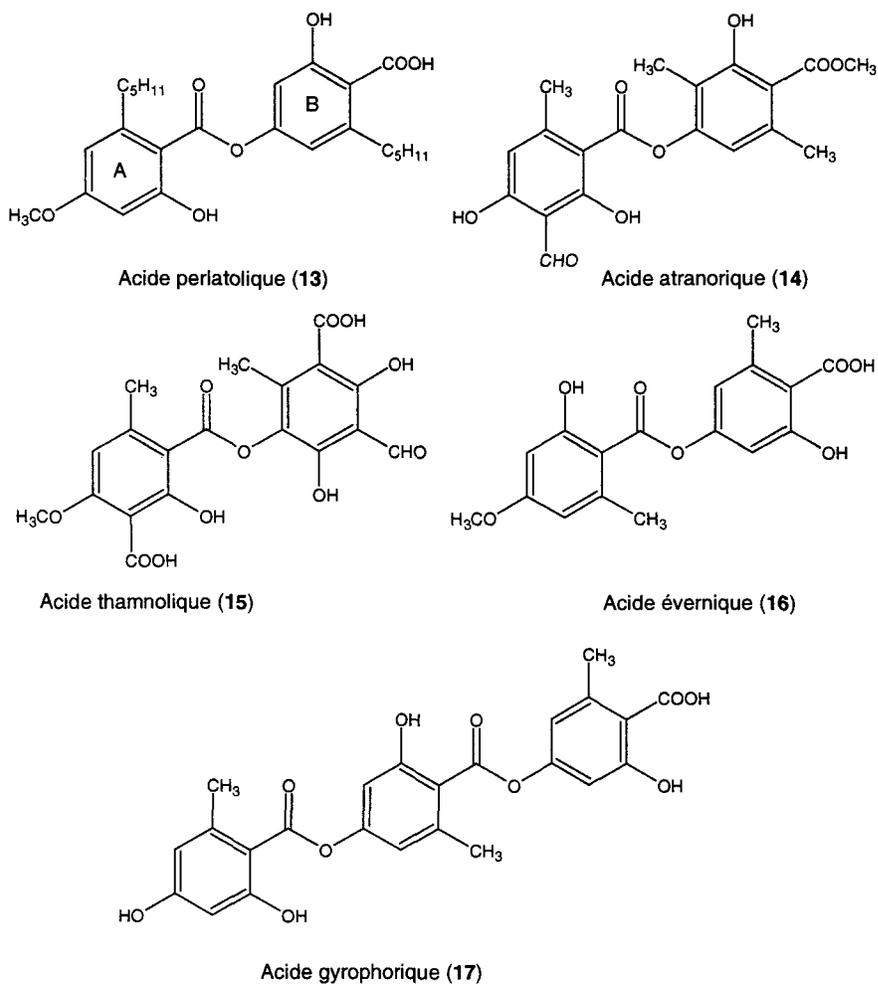


Figure 5 : Structures de quelques depsides

La biosynthèse des depsides et des depsidones pourrait se faire telle qu'illustrée à la Figure 6.

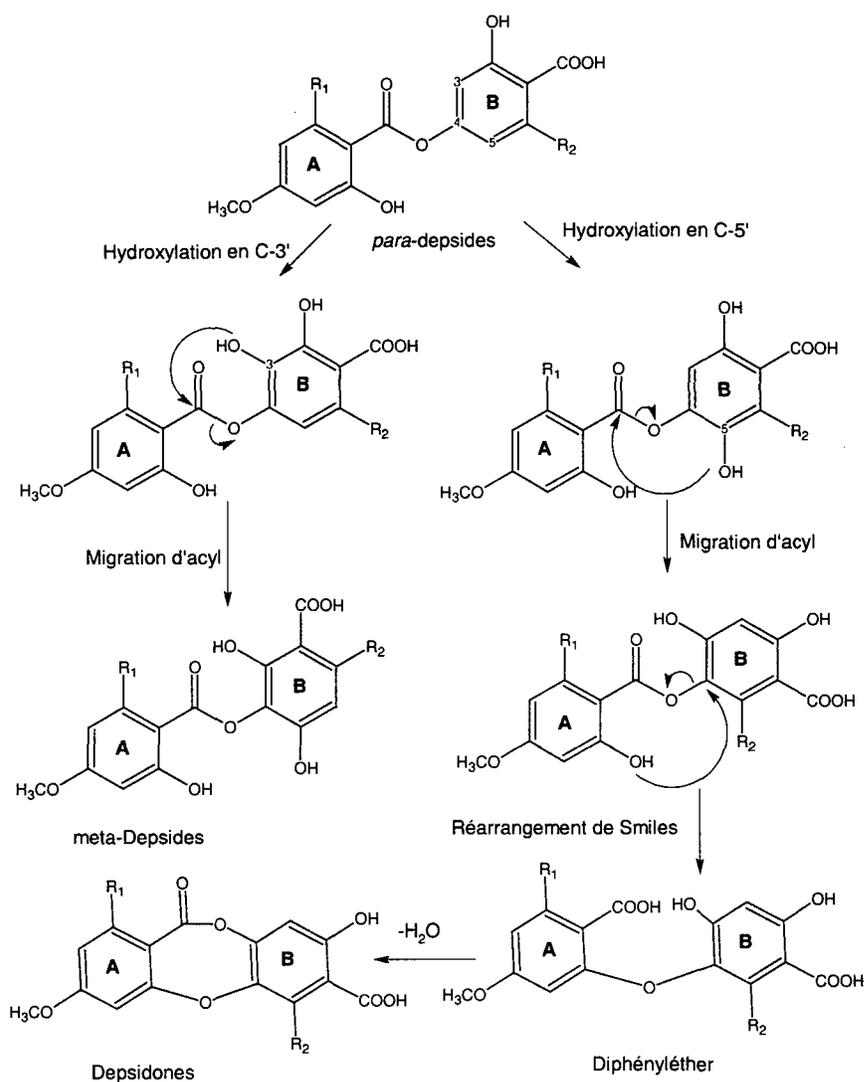


Figure 6 : Voies biosynthétiques suggérées pour la formation des meta-depsides et des depsidones [44].

Ainsi les meta-depsides pourraient être issus des para-depsides par C-hydroxylation d'un carbone aromatique en ortho par rapport au lien depsidique, suivie d'une migration d'un groupement acyle. Les variations structurales des para-depsides et meta-depsides, sont dues à la longueur des chaînes en position 6 (noyau A) et 6' (noyau B) ainsi que de leur degré d'oxydation (le noyau A étant généralement plus réduit que le noyau

B). Il existe aussi une autre classe : les tridepsides, comme l'acide gyrophorique (17), où les unités aromatiques sont attachées en position para par rapport à l'acide carboxylique libre.

2.4.3. Depsidones

Les depsidones sont basées sur un squelette composé de deux noyaux benzéniques A et B, doublement pontés par lien ester en position 1-4' et par un lien éther en position 2-5'. Certaines évidences suggèrent que les depsidones sont dérivées des para-depsides [55]. La formation des depsidones impliquerait une hydroxylation en 5' du noyau B, suivie d'une migration d'un groupement acyle et d'un réarrangement qui finalement conduirait à la depsidone, comme illustré à la Figure 6 [44]. La Figure 7 montre les depsidones connues chez les *Cladina*.

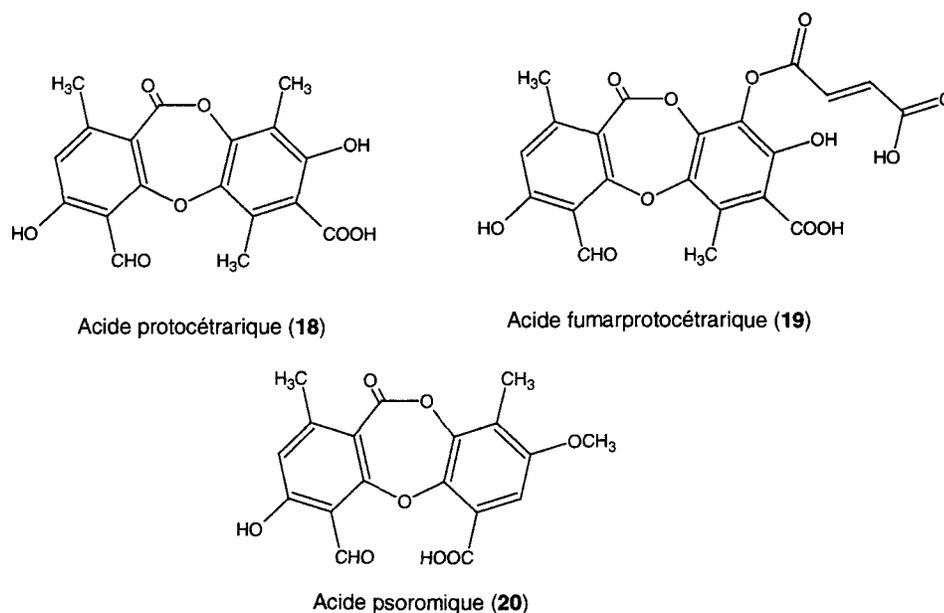


Figure 7 : Structure de quelques depsidones

Les depsidones se divisent en trois classes qui leur sont attribuées en fonction des précurseurs biosynthétiques. Les depsidones de la première classe sont composées de deux noyaux benzéniques dérivés de l'acide orsellinique (10). La seconde classe est formée par les dérivés de l'acide carboxylique C-méthylé du β -orcinolméthylcarboxylate (5). La troisième classe est issue de dérivés provenant d'un couplage oxydatif mixte entre les deux précurseurs décrits précédemment [55]. La variabilité des molécules est due à des modifications secondaires telles que l'O-méthylation, C-prénylation, l'oxydation des groupements méthyles ou la décarboxylation. Des expériences *in vitro* démontrant le couplage oxydatif de benzophénones, suggèrent que cette voie puisse être utilisée *in vivo*. Par contre, aucune benzophénone n'a été isolée chez les lichens. Selon une autre hypothèse, les précurseurs seraient acylés l'un par l'autre [55]. Des exemples de ce type de composés sont retrouvés chez *Cladina rangiferina*, comme l'acide fumarprotocétrarique (19) et l'acide protocétrarique (18).

2.4.4. Dibenzofurane et acide usnique

Les dibenzofuranes et les acides usniques sont une autre classe d'acétogénine retrouvée chez les *Cladina*. Les dibenzofuranes sont formées par le couplage oxydatif de deux noyaux benzéniques séparés par un groupement furane. Les acides usniques contiennent un noyau aromatique et un noyau acétophénone [39]. La Figure 8 montre la structure des deux énantiomères de l'acide usnique.

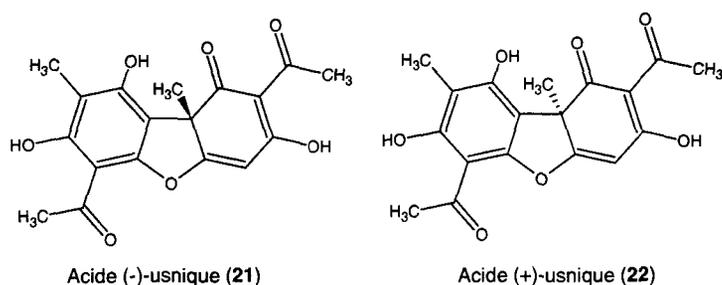


Figure 8 : Structure des deux énantiomères de l'acide usnique (21)

La voie biosynthétique la plus préconisée débute par le couplage oxydatif de deux dimères de méthylphloroacétophénone, suivi d'une O-alkylation en position ortho par rapport au lien carbone-carbone des acétophénones [39]. Une dernière étape de déshydratation conduirait à ce type de molécules [42]. Les deux isomères, l'acide (-)-usnique (21) et (+)-usnique (22), sont dus à la présence d'un carbone chiral [56]. L'acide (-)-usnique (21) est souvent classé comme une dibenzofurane par les lichenologistes et représente le composé majeur chez certaines *Cladina* [55]. Comme deux voies biosynthétiques sont proposées, il peut aussi être considéré comme un shikimate, si le précurseur biosynthétique dérive de l'acétophénone [39].

2.4.5. Autres composés

Outres les composés monoaromatiques, les depsides, les depsidones et les dibenzofuranes, aucune autre famille de métabolites secondaires n'a été rapportée dans la littérature portant sur le genre *Cladina*. Peu de travaux ont été consacrés à l'étude des composantes chimiques de ces lichens, c'est pourquoi d'autres composés pourraient être identifiés ultérieurement. Les familles susceptibles d'être rencontrées sont les suivantes : les depsones, les diphényléther, les dérivés de l'acide pulvinique, les composés terpéniques,

les acides aliphatiques, les quinones, les xanthoquinones et les naphthoquinones [27,58,59,60].

Concernant les métabolites primaires; les *Cladina* contiennent plusieurs caroténoïdes, tels que l' α -carotène et le β -carotène [61,62]. La présence de sucres et d'acides aminés a également été rapportée. La quantité de protéines est faible par rapport aux végétaux supérieurs, cependant la présence de 19 acides aminés a été démontrée [63]. Des alditols et des polysaccharides complexes ont aussi été observés [34,63,64,65,66]. Les polysaccharides sont formés par liens osidiques variés (type α -1 \rightarrow 3', α -1 \rightarrow 4', α -1 \rightarrow 6') entre des unités de glucose, de mannose et de galactose [63].

2.5. ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

Le potentiel thérapeutique des lichens est depuis longtemps exploité par la médecine douce [26]. Différentes préparations provenant de lichens ont montrées des effets analgésiques [26,27], antipyrétiques [26,27], antibactériens [43] et antifongiques [26]. Plus récemment, les tests de criblage d'activité biologique ont démontré non seulement leur action anti-inflammatoire [67] mais aussi leur potentiel antibiotique [68]. L'évaluation de l'activité biologique a également révélé des propriétés pesticides [28], phytotoxiques [29,30], antitumorales [64,66,68,69], antiprolifératives [71], antimitotiques [68,70], antioxydantes [72] et antivirales [73]. Cependant, les lichens du genre *Cladina* ont été bien moins étudiés que les *Usnea*, *Parmellia* et *Cladonia*. Quelques travaux rapportent que plusieurs métabolites bioactifs issus d'autres lichens sont également présents chez le

genre *Cladina*. C'est le cas pour l'acide usnique (21) et l'acide atranorique (14), composés majeurs chez *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina* respectivement [46].

2.5.1. Activité des extraits de *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina*

Des travaux portant sur le potentiel allélopathique du genre *Cladina*, montrent que des fragments de *Cladina stellaris* et de *Cladina rangiferina* dans des semis d'épinette blanche, induisent une diminution de la croissance et de l'accumulation du phosphore [15]. L'influence de *Cladonia* sur la germination du pin sylvestre a été évaluée à partir d'extraits faits à base de solutions tamponnées [22]. Il semble qu'une activité inhibitrice importante est observée à forte dose. Des travaux portant sur l'activité d'extraits aqueux de *Cladina* ont mis en évidence leur action phytotoxique et suggèrent que des dérivés d'acides aminés pourraient être responsables du ralentissement de la croissance observée sur des plantules [22]. L'absorption pouvant se faire au niveau des racines, l'action phytotoxique serait donc possible avec des molécules hydrosolubles [17]. La littérature ne fait pas état de travaux portant sur la phytotoxicité de composés hydrophiles isolés chez *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina*.

2.5.2. Activité biologique des composés monoaromatiques

Les produits phénoliques, qui sont présents en grande partie dans les tissus végétaux, sont susceptibles de se retrouver dans le sol [74,75,76,77]. Les phénols, tels que l'acide benzoïque, cinnamique ou caféïque, peuvent intervenir au niveau des propriétés membranaires des végétaux et affecter le transport ionique, résultant d'une baisse du

phosphore inorganique [77]. Contrairement à ces phénols, il n'y a pas d'études qui démontrent un lien entre les métabolites secondaires d'origine lichénique et l'inhibition de la germination ou de la croissance des végétaux [76].

La littérature rapporte cependant que certains composés monoaromatiques des lichens peuvent interférer avec la croissance racinaire et la germination des semis [29,30]. C'est ce que met en évidence, une étude portant sur l'activité inhibitrice de dérivés de l'orcinol (**1**) effectuée sur deux modèles de plantes, soit *Amaranthus hypochondriacus* et *Echinochloa crusgalli*. Il a été observé que le méthylorsellinate (**4**), le β -orcinolméthylcarboxylate (**5**) et notamment le méthylhaematommate (**7**), inhibent de façon significative la croissance et la germination des graines [29]. Ce type de composés pourrait agir sur la photosynthèse, au niveau du photosystème II (complexe moléculaire de conversion de l'énergie lumineuse) [14,28].

2.5.3. Activité biologique des depsides et depsidones

Une activité antioxydante des depsides et depsidones, observée notamment avec l'acide atranorique (**14**) et l'acide divaricatique, a été mise en évidence sur des homogénats tissulaires et avec le β -carotène [72]. Ceci suggère qu'ils jouent un rôle de défense contre le stress oxydatif [26,72]. L'acide atranorique (**14**) présente également une activité fongicide [28] et anti-inflammatoire [67]. L'acide gyrophorique (**17**) qui présente une activité cytostatique et antiproliférative [26], perturberait aussi l'activité du photosystème II

[29]. L'activité des depsidones est plus rarement rapportée, mais il semblerait que ces composés soient de meilleurs antioxydants [72].

2.5.4. Activité biologique de l'acide usnique

L'acide usnique (**21**) est le métabolite secondaire des lichens le plus étudié [68]. La molécule possède une forte activité antimicrobienne [26,28] et ces effets antimitotiques sont bien connus sur des cellules tumorales humaines [68,69,71]. Par contre, son effet sur les végétaux a été peu étudié, mais selon certains travaux, l'acide usnique (**21**) inhibe, de façon significative, la germination des graines de laitue [68]. Son activité antifongique a été aussi observée chez plusieurs types de champignons dont des champignons mycorhizateurs [24,28,68].

CHAPITRE 3
PARTIE EXPÉRIMENTALE ET MÉTHODOLOGIE

3.1. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

La provenance ainsi que le grade de tous les solvants, réactifs et standards utilisés au cours de ce projet sont détaillés au Tableau 3.

Tableau 3 : Provenance et grade des réactifs et solvants

Produit	Provenance	Grade
Acétate d'éthyle	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.5%
Acétone	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S., 99.5%
Acide formique	Fisher Scientific	Réactif A.C.S., 99.5%
Acide usnique	Aldrich	Standard
AcOH, glacial	Fisher Scientific	Réactif A.C.S., 99.7%
Atranorine	Aldrich	Standard
Benzène	Aldrich	HPLC, 99.9%
CaOCl	Provenance inconnue	Grade inconnu
$CDCl_3$	Aldrich	99.8%
$CHCl_3$	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S., 99.5%
$Ce(SO_4)_4(NH_4)_4 \cdot 2H_2O$	J. T. Baker	102.4%
DCM	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.5%
Diéthyléther	Laboratoire MAT	Réactif A.C.S., 99.5%
Dioxane	Aldrich	HPLC, 99.9%
EtOH	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.5%
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	BDH	98%
H_3PO_4	Fisher Scientific	85.30%
H_2SO_4	Anachemia	Réactif A.C.S., 95-98%
Hexane	Anachemia	HPLC, 99.9%
KOH	Fisher Scientific	86.5%
MeOH	Anachemia	Réactif A.C.S., 99.8%
MeOH	Caledon Laboratories	HPLC
$MoO_4(NH_4)_2$	J. T. Baker	85%
Na_2SO_4	Provenance inconnue	Grade inconnu
Olivetol	Aldrich	Standard
PD	Provenance inconnue	Grade inconnu
SiO_2	Silicycle, 230-400 mesh, 60 A	Ultrapure
Alumine	J. T. Baker	Grade inconnu
Toluène	Anachemia	HPLC, 99.9%

3.2. ÉCHANTILLONNAGE DES LICHENS

Les échantillons ont été récoltés à divers endroits afin de préserver les colonies existantes. Pour le début travaux, un premier lot est récolté le 4 mars 2000, sur un site non enneigé du Parc des Grands Jardins. Le 12 mai 2000, un deuxième lot de lichens est récolté à Chicoutimi. Un troisième lot provient d'une récolte effectuée en juin 2000 dans le secteur ouest du Lac Saint-Jean. Finalement, les autres récoltes sont effectuées au printemps 2001 à St-Félix d'Otis. Les sites d'échantillonnage sont caractérisés par une strate arborescente peu dense, constituée d'épinette noire (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) et de pin gris (*Pinus strobus*, L.). La végétation au sol est majoritairement constituée des lichens *Cladina rangiferina*, *Cladina stellaris* et *Cladonia uncialis*. D'autres *Cladonia* et *Cladina* sont aussi présentes en compagnie d'éricacées (*Kalmia*, *Ledum*, *Vaccinum*).

3.3. IDENTIFICATION DES ESPÈCES

L'identification des espèces est d'abord effectuée par observation des caractéristiques morphologiques générales, telles que la forme, la couleur, la hauteur, l'orientation des extrémités et le type de ramification. Ces observations sont comparées avec la description des espèces signalée par la littérature et rapportée à la section 2.2.1 [27,34,36]. Une observation au binoculaire permet de constater la présence ou l'absence du cortex apical et des structures apothéciaires. L'identification est par la suite confirmée par les réactions colorimétriques, qui donnent selon l'espèce des réactions différentes, tel que décrit au Tableau 1.

Les réactifs sont appliqués directement sur le podétion, sur une surface préalablement grattée avec une lame de rasoir. Pour ce faire, les réactifs utilisés sont le KOH, le CaOCl, la paraphényldiamine (PD) et la combinaison du KOH avec le CaOCl, où le KOH est appliqué en premier. Après l'ajout de quelques gouttes, une coloration est obtenue rapidement. Il faut cependant se méfier de la coloration que prend le thalle une fois hydraté, n'indiquant pas nécessairement un test positif. La solution de KOH est préparée en le dissolvant (20 % p/v de KOH) dans 100 ml d'eau distillée. La solution de CaOCl est préparée en dissolvant les pastilles jusqu'à saturation dans l'eau. La solution de PD, qui doit être fraîchement préparée, est obtenue en dissolvant le produit à 1% p/v dans l'EtOH absolu.

3.4. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Les analyses par chromatographie sur couche mince visent à évaluer la complexité des extraits bruts ou à les fractionner grossièrement. Ces analyses peuvent également être utilisées pour identifier certains composés dans les extraits, si les standards sont disponibles. Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de verre recouvertes de 250 μ m de gel de silice, achetées chez Silicycle. Celles-ci sont imprégnées d'un fluorochrome (F-254) qui facilite la détection des substances organiques sous lampe UV. Cependant, ce ne sont pas tous les composés lichéniques qui sont détectables à l'UV. C'est pourquoi l'acide molybdate d'ammonium cérique (CAM) est utilisé comme révélateur complémentaire. Une coloration allant du bleu au gris foncé est obtenue après chauffage d'une plaque préalablement trempée dans la solution de CAM. Le

CAM est préparé en dissolvant 10 g de sulfate d'ammonium cérique $[\text{Ce}(\text{SO}_4)_4(\text{NH}_4)_4]$, 25 g de molybdate d'ammonium $[\text{MoO}_4(\text{NH}_4)_2]$ et 100 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) dans l'eau pour un volume total de 1L.

Pour ce faire, une quantité variable (selon la concentration de la solution) d'extrait brut ou du composé est appliquée sur les plaques, suivant l'intensité de la tâche. La séparation des composés est obtenue par élution des plaques dans différents systèmes de solvants. Les trois éluants suggérés par la littérature ont la composition suivante : éluant A : Toluène-dioxane-acide acétique (36 : 9 : 1), éluant B : Hexane-diéthyléther-acide formique (13 : 8 : 2) et éluant C : Toluène-acide acétique (4 : 1) [44]. Selon la littérature, ces éluants sont appropriés pour la séparation des produits polyphénoliques des lichens et peuvent être utilisés pour l'identification des substances lichéniques, suite à l'ajout de standards [78,79]. Les trois éluants sont nécessaires pour calculer les indices de rétention des composantes d'un extrait. Pour ce faire, la séparation s'effectue en présence des standards d'acide atranorique (14) et d'acide norstictique, ce qui permet d'exprimer les facteurs de rétention sous la forme d'indices de rétention pouvant être comparés, tel que décrit par Culberson *et al* [79].

3.5. EXTRACTION DES COMPOSÉS LICHENIQUES

3.5.1. Extraction au Soxhlet

L'extraction par Soxhlet des composantes des lichens est souvent mentionnée par la littérature [27]. Son avantage est d'optimiser l'extraction en évitant l'effet de saturation

du solvant. L'extraction peut ainsi durer aussi longtemps qu'il reste des extractibles dans la matrice végétale [38]. Le désavantage majeur est la nécessité de chauffer les solvants jusqu'à leur point d'ébullition pendant l'extraction, ce qui peut entraîner la dégradation des molécules thermosensibles [38]. Les composantes de ce système sont illustrées à la Figure 9.

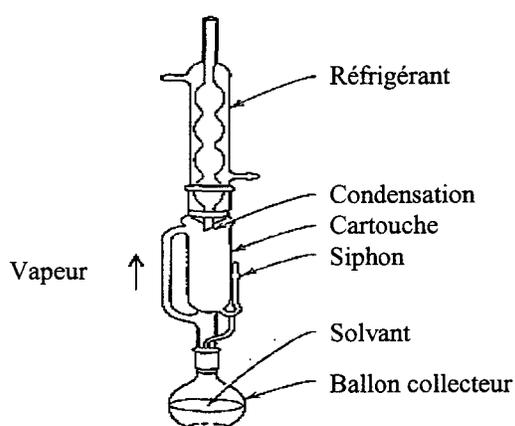


Figure 9 : Composantes de l'extracteur type "Soxhlet"

Le lichen préalablement séché à température ambiante est réduit en poudre dans un mortier à l'aide du pilon. Un broyage cryogénique dans l'azote liquide est également effectué sur les thalles humides. Ce type de broyage donne une poudre très fine, ce qui augmente la surface de contact avec le solvant. Une quantité allant de 10 à 30 g est transférée dans une cartouche en cellulose pour Soxhlet. Les solvants utilisés sont l'hexane, le CHCl_3 , le mélange CHCl_3 -MeOH (1 : 1), l'EtOH ou l'acétone. Ceci permet d'obtenir des extraits qui présentent une composition chimique variable, puisque ces solvants sont de polarités différentes. L'extraction débute dès que le solvant distillé se condense et s'accumule dans le cylindre contenant la matière végétale. Un cycle est

complété lorsque le solvant contenant les extractibles est évacué par le siphon. La durée totale de l'extraction est de 24 heures, totalisant environ 36 cycles. L'extrait recueilli dans le ballon est ensuite asséché avec du Na₂SO₄ anhydre, puis filtré par gravité (papier Whattmann no 4). Le solvant organique du filtrat est évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif, puis le résidu obtenu est soumis à une pompe à vide pendant plusieurs heures afin d'en retirer les traces de solvant.

3.5.2. Extraction fractionnée par solvants au Soxhlet

Les divers composés présents dans la matrice végétale ont une affinité propre envers différents solvants (de polarité différente). Ainsi, il est possible de fractionner grossièrement ces composés en effectuant des extractions séquentielles avec différents solvants [27]. Ce type d'extraction est basé sur le même principe que l'extraction au Soxhlet décrit précédemment. La différence réside dans l'utilisation de plusieurs solvants qui nécessite l'interruption des cycles. Le changement de solvant s'effectue en vue d'obtenir une polarité croissante, tandis que la durée de l'extraction est déterminée en fonction des informations connues sur la solubilité des produits ciblés. La littérature rapporte une séquence pouvant conduire à une séparation sommaire des composantes des lichens, dont est inspirée la séquence utilisée suivante : hexane (2 heures) : diéthyléther (2 heures) : MeOH (16 heures) [27]. Chaque fraction est par la suite traitée tel que décrit précédemment (voir section 3.5.1).

3.5.3. Extraction par macération dans le solvant

L'extraction par macération s'effectue avec le pentane et des mélanges DCM-MeOH (1 : 1), CHCl₃-Acétone (1 : 1) ou EtOH-H₂O (1 : 4), (1 : 1) et (4 : 1), sur la poudre finement broyée à l'azote liquide. L'extraction est menée à température ambiante avec agitation constante pendant 24 heures ou plusieurs jours pour les extraits aqueux. Les extraits DCM-MeOH (1 : 1) et CHCl₃-Acétone (1 : 1), qui ciblent les composés de polarité intermédiaire à élevée, sont traités tel que décrit précédemment (voir section 3.5.1). Les extraits EtOH-H₂O élaborés pour les tests d'activité, sont évaporés sous vide à basse température et concentrés sur un lyophilisateur (Lyph-Lock® 6 liter Freeze Dry system, Labconco) pendant 4 à 7 jours. Le lyophilisat est ensuite récupéré pour les tests d'activité biologique.

3.5.4. Entraînement à la vapeur

L'extraction par entraînement à la vapeur est effectuée sur des thalles humides de *Cladina stellaris* fraîchement cueillies (St-Félix d'Otis). Une quantité allant de 500 à 700 g est déposée dans un ballon à demi rempli d'eau, relié à un générateur de vapeur et à un réfrigérant. Le ballon collecteur contient 500 ml d'eau, 50 g de NaCl et 50 ml de diéthyléther. Il est de plus refroidi avec de la glace pendant la totalité de l'extraction. L'extraction débute lorsque les premières gouttes tombent dans le ballon collecteur et se poursuit pendant 2 à 3 heures.

3.6. SÉPARATION DES COMPOSANTES DES EXTRAITS PAR CHROMATOGRAPHIE ÉCLAIR ET PAR PARTITION

3.6.1. Chromatographie éclair

Toutes les chromatographies éclair sont effectuées en exerçant une faible pression de gaz sur la tête de la colonne. La colonne est montée à sec avec de la silice activée à 100°C pendant 48 heures ou avec de l'alumine. Le gel est mouillé au départ avec de l'hexane. Le matériel à séparer est solubilisé dans un volume minimal du solvant utilisé pour l'élution initiale. Les échantillons insolubles dans le volume idéal de solvant, c'est-à-dire moins de 5% du volume de la colonne, sont adsorbés sur un minimum de silice ou d'alumine. Pour ce faire, l'extrait est solubilisé jusqu'à dissolution complète dans un ballon auquel la silice ou l'alumine est ajoutée (1 g pour 100 mg d'extrait). Le solvant est évaporé sur un évaporateur rotatif, puis l'échantillon adsorbé sur silice est introduit au sommet de la colonne chromatographique. Des quantités d'extraits allant de 25 mg pour un diamètre de colonne de 2 cm et de 100 mg pour une colonne de 5 cm sont utilisées pour la séparation.

Pour la séparation des composés de *Cladina rangiferina*, trois chromatographies éclair ont été effectuées. Un mélange hexane-diéthyléther-acide formique (15 : 4 : 1) est d'abord utilisé pour séparer les composés de polarité faible à intermédiaire des composés très polaires contenus dans l'extrait brut. Les fractions contenant les composés de polarité faible à intermédiaire sont obtenues suivant une élution avec 300 ml de ce mélange, les composés fortement polaires n'étant pas élués dans ces conditions. La seconde

chromatographie permet de séparer le mélange de composés de faible polarité et de polarité intermédiaire obtenu précédemment. Les fractions correspondant aux composés faiblement retenus sont obtenues suite à une élution avec 100 ml d'un mélange hexane-acétate d'éthyl (95 : 5). La troisième chromatographie éclair vise à séparer les composés faiblement retenus, qui forment un mélange moins complexe. Cette dernière séparation permet d'isoler deux composés, soit l'éthylhaematommate (8) et le β -orcinolméthylcarboxylate (5). Cette séparation s'effectue d'abord par une élution avec 50 ml d'hexane. Une seconde élution avec 50 ml d'un mélange hexane-diéthyléther (95 : 5), conduit à l'isolation de l'éthylhaematommate (8). Finalement, le β -orcinolméthylcarboxylate (5) est obtenu en poursuivant l'élution avec 15 ml supplémentaire du mélange hexane-diéthyléther (95 : 5).

Un extrait de *Cladina stellaris* obtenu avec l'hexane par Soxhlet fractionné est ici utilisé pour une chromatographie éclair avec l'alumine. Tout d'abord, la séparation des composés faiblement polaires s'effectue par une élution avec 150 ml d'hexane. Afin d'éluer les composés moyennement retenus, 100 ml d'un mélange hexane-diéthyléther-acide formique (245 : 4 : 1) sont utilisés dans un premier temps, puis la polarité est augmentée graduellement jusqu'à l'obtention d'un ratio hexane-diéthyléther-acide formique de 75 : 8 : 2, totalisant un volume d'éluants ajoutés de 400 ml. Finalement, l'élution avec 100 ml d'un mélange hexane-diéthyléther-acide formique (15 : 8 : 2) permet d'obtenir l'acide usnique (21).

3.6.2. Fractionnement par solubilité différentielle ou par partition

Une autre approche de purification a été mise à l'essai dans le cadre de ce travail. Cette approche permet la séparation grossière des composantes de l'extrait en fonction de leur affinité pour différents solvants. Les fractions ainsi obtenues sont plus simples (le nombre de composantes est restreint) que l'extrait de départ ce qui facilite la purification par chromatographie éclair ou par HPLC. La Figure 10 illustre le fractionnement de l'extrait à l'EtOH obtenu par Soxhlet avec *Cladina stellaris*.

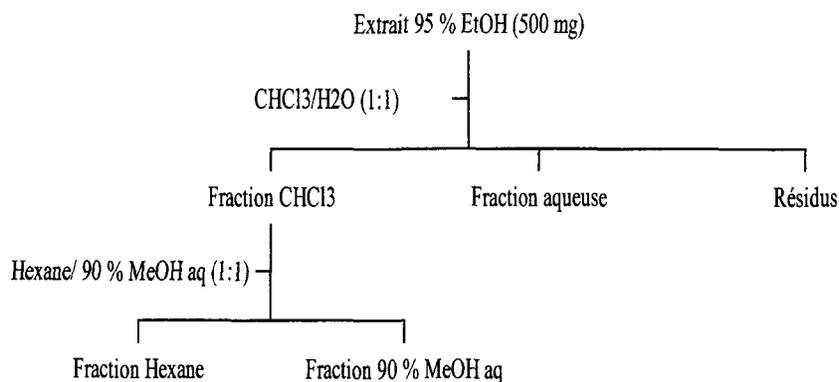


Figure 10 : Partition de l'extrait à EtOH de *Cladina stellaris*

Tel que suggéré par Hui *et al* [80], les produits naturels sont partitionnés au départ par un mélange de CHCl₃ et H₂O (1 : 1). Pour ce faire, 500 mg d'extrait brut sec sont solubilisés par agitation dans 100 ml de ce mélange. En cas de besoin, le mélange est chauffé légèrement pour solubiliser complètement l'extrait. Les phases organique et aqueuse sont séparées dans une ampoule à décantation. La fraction organique (CHCl₃) est partitionnée à trois reprises avec 50 ml d'un mélange hexane et une solution 90 % MeOH aq. (1 : 1). La solution 90 % MeOH aq. est obtenue en ajoutant 10% d'H₂O distillée au

solvant organique. Après évaporation du MeOH à basse température, la solution aqueuse est concentrée par lyophilisation.

3.7. CHROMATOGRAPHIE ET SPECTROSCOPIE

3.7.1. GC-MS

Le choix de cette méthode d'analyse est motivé par l'opportunité de non seulement séparer les composés mais aussi d'obtenir des informations spectrales, puisque le chromatographe capillaire en phase gazeuse est couplé à un spectromètre de masse. La chromatographie gazeuse est très utile pour l'analyse des composés volatiles, qui sont facilement séparés en fonction de leur pression de vapeur et de leur groupement fonctionnel [81,82,83]. Cette méthode n'est cependant pas la mieux adaptée pour les produits peu volatiles et thermosensibles, dont l'analyse peut conduire à des artefacts [27,44,52,54,81].

En plus de leurs spectres de masse, les composés sont parfois recensés dans les banques de données ou la littérature, en fonction de leur indice de rétention, soit l'indice de Kovats (I_K) [84]. Le temps de rétention spécifique (I_K) pour chaque composé peut être calculé par la formule suivante :

$$I_K = 100 \left[n + (N + n) \frac{\text{Log}(t_r^{\text{inconnu}}) - \text{Log}(t_r^n)}{\text{Log}(t_r^N) - \text{Log}(t_r^n)} \right], \text{ où}$$

N = Nombre de carbone du plus petit alcane

N = Nombre de carbone du plus grand alcane

t_r^n = temps de rétention du plus petit alcane

t_r^N = temps rétention du plus grand alcane

t_r^{inconnu} = temps de rétention de l'inconnu

Les temps de rétention étant variables en raison de l'usure de la colonne, il est nécessaire d'injecter la série d'hydrocarbure systématiquement à tous les mois, afin d'obtenir des I_K reproductibles. Les données chromatographiques obtenues peuvent être ainsi comparées avec celles d'analyses réalisées à d'autres moments ou dans d'autres conditions [83].

Le chromatographe en phase gazeuse capillaire utilisé est un Hewlett Packard et il est couplé à un spectromètre de masse de la même compagnie. Les informations concernant le type de colonne, le détecteur et les réglages du GC-MS sont résumées au Tableau 4.

Tableau 4 : Composantes et particularité du GC-MS

Composante	Particularité
Modèle	HP5890
Gaz porteur	Hélium, 1 ml/min
Type de colonne	Capillaire, DB-5
Dimension de la colonne	30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m
Type de détecteur	MS, quadropole
Modèle de détecteur	HP5972
Ionisation	EI, 70 eV

La séparation des extractibles obtenus par Soxhlet ou par macération avec les solvants organiques est obtenue selon le programme lichen, tandis que celle des huiles

essentielle est effectuée avec le programme huiles. Le Tableau 5 donne les conditions d'opérations pour ces deux programmes d'analyses.

Tableau 5 : Conditions d'opérations GC-MS utilisées pour l'analyse des huiles essentielles et des composés extraits des lichens.

Paramètres	Température	
	Programme huiles	Programme lichen
Injecteur	200 °C	200 °C
Détecteur	320 °C	320 °C
Colonne, initiale	40 °C (2min)	40 °C (2min)
Gradient 1	2 °C/min	5 °C/min
Colonne partielle 1	210 °C (33 min)	210 °C (15 min)
Gradient 2	10 °C/min	25 °C/min
Colonne, finale ou partielle 2	310 °C (5 min)	280 °C (0 min)
Gradient 3		5 °C/min
Colonne, finale		325 (0 min)

3.8. CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

Les analyses par chromatographie liquide haute performance (HPLC) visent à contourner les problèmes reliés à la faible volatilité et à la sensibilité thermique des composés des lichens pouvant être reliés aux analyses GC-MS [27]. Selon la littérature, l'analyse par HPLC est la mieux adaptée pour la séparation des constituants d'extraits bruts provenant de lichens [27,44,46,47,85,86]. Des travaux consacrés à l'étude des composés des lichens du genre *Cladina*, ont permis d'obtenir une très bonne résolution des composés majeurs de lichens comme *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina* [27,45,46,47,86]. La méthode la plus utilisée est celle de Huovinen *et al* [47], qui utilise pour la séparation un mélange de MeOH et d'H₂O-H₃PO₄ (où l'eau contient 1% de H₃PO₄) et des standards

internes. La standardisation interne permet d'obtenir l'indice de rétention (RI) de chaque composé, ce qui peut être utile pour procéder à leur identification sans recourir à l'isolation, puisque les composés des lichens sont recensés selon leur RI dans une banque de données (Wintabolites) et par la littérature [27,45,46,47,86]. L'indice de rétention est calculé d'après la formule suivante [47] :

$$RI = \left[\frac{(t_r^{\text{ac. benzoïque}}) - (t_r^{\text{inconnu}})}{(t_r^{\text{bis-(2-éthylhexyl)phthalate}}) - (t_r^{\text{inconnu}})} \right], \text{ où}$$

$t_r^{\text{ac. benzoïque}}$ = Temps de rétention de l'acide benzoïque

$t_r^{\text{bis-(2-éthylhexyl)phthalate}}$ = Temps rétention du bis-(2-éthylhexyl)phthalate

t_r^{inconnu} = Temps de rétention de l'inconnu

Les standards utilisés sont le bis-(2-éthylhexyl)phthalate et l'acide benzoïque (Sigma). Le bis-(2-éthylhexyl)phthalate a été récemment remplacé par l'acide solorinique. Il n'est cependant pas vendu sur le marché.

3.8.1. Appareils et colonnes utilisés

Les analyses préliminaires et le suivi de la partition de l'extrait à l'EtOH (voir section 3.6.2) sont effectués avec un chromatographe Perkin Elmer serie 4, équipé d'un détecteur UV à longueur d'onde variable selon la méthode décrite à la section 3.8.4. La colonne utilisée est de type phase inverse Supelcosil LC-18 avec une taille de particules de 5 μ m (voir Tableau 6). Le volume d'injection est de 20 μ l. Les analyses des extraits

EtOH-H₂O (4 :1) sont effectuées avec un chromatographe liquide Shimadzu, équipé d'un détecteur spectrophotométrique UV/visible à deux longueurs d'onde selon la méthode décrite à la section 3.8.4. La colonne utilisée est la même que celle décrite précédemment. À titre exploratoire, les tentatives d'isolation sont effectuées sur l'appareil Shimadzu, selon les conditions relatives aux extraits EtOH-H₂O (voir section 3.8.4), mais cette fois équipé d'une colonne semi-analytique de type C-18 et avec un volume d'injection de 100 µl. Les informations relatives aux appareils et aux colonnes sont détaillées au Tableau 6.

Tableau 6 : Types de chromatographes et colonnes utilisées pour la HPLC.

Modèle de HPLC	Perkin Elmer Series 4	Shimadzu
Contrôleur		SCL-10A VP
Pompe		LC-10ATVP
Injecteur	Rheodyne 7125	Rheodyne 7725
Détecteur	LC-85	SPD-10A VP
Colonne	Supelcosil LC-18	Supelcosil LC-18
Dimension	25 cm x 4,6 mm, 5µm	25 cm x 4,6 mm, 5µm

3.8.2. Préparation des solvants

La solution H₂O-H₃PO₄ (99 : 1) est préparée en diluant 0,9g d'acide o-H₃PO₄ dans 1 litre H₂O distillée. Pour éliminer toutes impuretés, les solvants (MeOH et H₂O-H₃PO₄ 99 : 1) sont mélangés avec du charbon activé et filtré sur un appareil Millipore avec un filtre en Teflon FP-200, de 47 mm de diamètre et d'une porosité de 0,2 µm pour HPLC (Gelman Sciences Inc.). Les solvants sont ensuite transférés dans des bouteilles en verre et dégazés. Les solvants utilisés pour les analyses sur l'appareil Perkin Elmer sont dégazés pendant 10 min avec de l'hélium, tandis qu'un dégazeur à membrane (DGU-14A) est utilisé pour les solvants des analyses effectuées avec l'appareil Shimadzu.

3.8.3. Préparation de l'échantillon

Pour les analyses sur le chromatographe Perkin, les échantillons préalablement lyophilisés proviennent de la phase MeOH:H₂O (90 : 10) obtenue par fractionnement de l'extrait à l'EtOH (voir section 3.6.2). Les échantillons sont dilués dans un mélange H₂O-MeOH (1 : 1), contenant 10 mg/ml d'acide benzoïque et 10 mg/ml de bis-(2-éthylhexyl)phthalate, pour obtenir une concentration finale de 7 mg/ml. En ce qui concerne les analyses effectuées sur la chromatographe Shimadzu, les échantillons qui proviennent des extraits EtOH-H₂O (4 : 1), n'ont subi aucune préparation préalable. Dans tous les cas, les résidus sont éliminés par filtration sur filtre 0,2 µM à l'aide d'une seringue.

3.8.4. Méthodes analytiques

La méthode d'analyse utilisée avec l'appareil Perkin Elmer implique l'utilisation de deux solvants, soit le MeOH et de l'H₂O-H₃PO₄ (99 : 1). Cette méthode tirée de celle décrite par Huovinen *et al* [47], utilise un gradient d'élution allant de 20 % de MeOH (MeOH : H₃PO₄-H₂O 20 : 80) à 99 % (MeOH : H₂O-H₃PO₄ 99 : 1). Le gradient d'élution est étalé sur une période de 85 minutes à un débit de 1 ml/min. La colonne est nettoyée pendant 5 minutes avec 99 % de MeOH à un débit de 1 ml/min et rééquilibrée à 20% de MeOH pendant 5 minutes.

Afin de diminuer la durée de l'analyse, les conditions d'élution ont été modifiées. Un gradient d'élution allant de 30 % de MeOH (MeOH : H₂O-H₃PO₄ 30 : 70) à 99% (MeOH : H₂O-H₃PO₄ 99 : 1) est étalé sur une période de 60 minutes à un débit de 1 ml/min. Les meilleurs résultats sont obtenus avec la méthode d'Huovinen *et al* [47], c'est

pourquoi cette méthode a été utilisée pour calculer les indices de rétention (RI), tel que décrit par la littérature [27,44,47].

En ce qui concerne les analyses effectuées sur le chromatographe Shimadzu, la méthode est basée sur celle décrite par Huovinen *et al* [47]. La méthode implique également l'utilisation d'un gradient d'élution allant de 20 % de MeOH (MeOH : H₂O-H₃PO₄ 20 : 80) mais cette fois à 85 % (MeOH : H₂O-H₃PO₄ 85 : 15). Le gradient d'élution est étalé sur une période plus courte totalisant 40 minutes, à un débit de 1 ml/min. Puis une élution isocratique à 85 % MeOH (MeOH : H₂O-H₃PO₄ 85 : 15) est effectuée pendant 20 minutes, avec le même débit. Finalement, la colonne est nettoyée pendant 5 minutes avec 99 % MeOH et rééquilibrée à 20% MeOH pendant 10 minutes.

Les analyses effectuées à l'échelle analytique ont permis de déterminer les signaux qui devraient être observés à l'échelle semi-préparative. La méthode utilisée pour l'isolation implique l'utilisation du chromatographe Shimadzu avec la colonne semi-analytique C-18. Les conditions d'élution sont les mêmes que celles décrites précédemment. Seuls les composés les plus abondants et bien résolus des extraits EtOH-H₂O (4:1) de *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina* sont récoltés à l'échelle semi-préparative.

3.9. RMN ¹H ET RMN ¹³C

Les spectres RMN ont été réalisés sur un spectrophotomètre Bruker 300 MHz de l'Université Laval et sur un Bruker 400 MHz à 300 °K de Santé Canada. Les échantillons

(11-20 mg) sont dissous dans 1 ml de CDCl_3 . Les déplacements chimiques (δ) sont calculés par rapport au tétraméthylsilane (TMS). La résolution des spectres RMN ^1H est de 400 MHz pour l'éthylhaematommate (8) et le β -orcinolméthylcarboxylate (5) et de 300 MHz pour l'acide usnique (21). Pour les RMN ^{13}C , la résolution est de 100 MHz pour l'éthylhaematommate (8), ainsi que pour le β -orcinolméthylcarboxylate (5) et de 75 MHz pour l'acide usnique (21).

3.10. ÉVALUATION DE L'INHIBITION DE CROISSANCE CELLULAIRE (IC_{50})

Les essais biologiques se définissent comme des tests visant à déterminer l'activité biologique d'un extrait ou d'un composé issu d'extraits biologiques. Généralement, ces tests *in vitro* visent à évaluer la cytotoxicité (IC_{50}) d'agents anticancéreux [87,88,89,90,91,92,93]. L' IC_{50} est définie comme étant la concentration qui inhibe 50% de la croissance cellulaire. Cette valeur est obtenue suite à l'évaluation de la réponse cellulaire à différentes doses, qui peut être traduite par un fluorophore. Ainsi le pourcentage de survie est établi en fonction de la fluorescence obtenue en référence avec la réponse des témoins.

L'évaluation de la croissance cellulaire (IC_{50}) sur la lignée cancéreuse MCF-7 a été effectuée à l'INSERM unité 484 de Clermont-Ferrand, France. Il est important de spécifier que les résultats de ces tests préliminaires ne permettront pas de tirer des conclusions pouvant se rattacher à l'hypothèse de l'allélopathie. Les cellules végétales sont, de par la présence d'une paroi cellulaire, très différentes des cellules animales

utilisées pour évaluer le potentiel inhibiteur des extraits aqueux des *Cladina*. Ce test d'inhibition de croissance était le seul disponible dans nos laboratoires, d'autres tests devront être effectués sur des cellules végétales *in vitro* et *in vivo*. L'évaluation de l'inhibition de croissance cellulaire (IC₅₀) des extraits aqueux de *Cladina stellaris* et de *Cladina rangiferina* a été effectuée selon la méthode de Legault *et al* [92].

Le nom, la provenance des milieux et des produits chimiques relatifs à la culture cellulaire et aux tests d'activité sont listés au Tableau 7. Tous ces produits sont de grade pour culture cellulaire.

Tableau 7 : Noms et provenance des produits utilisés en culture cellulaire et pour les tests d'activité

Produits	Provenance
Ac. aminés non-essentiels 100X	Gibco-BRL
EDTA	Sigma
Gentamycine 10 mg/ml	Gibco-BRL
Hoechst 33342	BioWest
Milieu MEM Eagle's with Glutamax-I and Earle's salts	Gibco-BRL
Milieu RPMI 1640	Gibco-BRL
Chlorure de sodium	Merck
PBS 10X	Gibco-BRL
Pyruvate de sodium 100mM	Gibco-BRL
SDS	Sigma
Sérum Fœtal de Bovin 10%	BioWest
Résazurine	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Trypsine-EDTA 10X	Gibco-BRL
Vitamine 100X	Gibco-BRL

3.10.1. Culture cellulaire

Les cellules d'adénocarcinome du cancer du sein (MCF-7) utilisées pour ce travail, proviennent de l'European Collection of Cell Cultures (ECACC, Salisbury, United-Kingdom). La lignée cellulaire MCF-7 croissant en monocouche dans des flacons pour culture cellulaire de 75 ml (Falcon), est maintenue dans le milieu minimum essentiel (MEM, Glutamax™ Eagle's with Earle's salts) enrichi avec 10 % de sérum fœtal bovin, 5 ml d'une solution 100X de vitamines, 5 ml d'une solution 100 mM de pyruvate de sodium et 5 ml d'une solution 100X d'acide aminés non-essentiels. Afin de diminuer les risques de croissance bactérienne, 2 mg de gentamycine sont ajoutés. La croissance des cellules se fait dans un incubateur à 37 °C, avec 5% de CO₂ sous atmosphère humide

3.10.2. Test de survie

Cent µl d'une suspension cellulaire à 5×10^4 cellules/ml dans le milieu MEM complet, sont distribués dans chacun des puits de microplaques 96 puits (Nunclon™, Nunc). Les cellules sont incubées pendant de 24 heures à 37 °C, avec 5% de CO₂ afin de leur permettre d'adhérer à la surface des puits. Ensuite, 100 µl de milieu MEM complet contenant ou non une concentration croissante d'extraits (0.78 µg/ml à 100 µg/ml) ont été ajoutés. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 48 heures à 37 °C, avec 5% de CO₂. Les extraits de *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina* testés proviennent des macérations effectuées dans les trois mélanges EtOH-H₂O contenant 20, 50 et 80 % (v/v) d'EtOH (voir section 3.5.3). Les extraits sont dilués sur glace dans l'EtOH, pour obtenir une solution de départ à une concentration de 40 mg/ml, puis filtrés à la seringue sur un filtre 0,45 µm. Le

test de survie s'effectue avec 8 doses, qui sont obtenues par dilution successive de la solution de départ à 40 mg/ml. Pour ce faire, 100 µl de la solution la plus concentrée sont ajoutés à 100 µl d'EtOH à 7 reprises. Une seconde dilution est effectuée en prélevant 12,5 µl de chaque dose qui sont ajoutés et mélangés à 2500 µl de milieu MEM complet. Cette avant dernière dilution permet de s'assurer que la concentration d'EtOH n'excède pas 0,5%. Finalement, 100 µl de chaque dilution sont ajoutés aux puits contenant les cellules pour obtenir une concentration finale de 100 µg/ml à 0,78 µg/ml. L'évaluation de la survie cellulaire a été effectuée en utilisant la quantification du pouvoir réducteur cellulaire (section 3.10.2.1) ou par quantification de l'ADN cellulaire (section 3.10.2.2).

3.10.3. Test de réduction cellulaire avec la Résazurine

Après 48 heures, la prolifération cellulaire a été quantifiée par la résazurine. La résazurine est réduite dans les cellules vivantes en résorufine fluorescente. La fluorescence émise est proportionnelle à la quantité de cellules. Pour ce faire, les puits sont tout d'abord vidés et lavés avec 200 µl de PBS 1X à 37 °C, à l'aide d'un laveur pour microplaques Cellwash™ de LabSystems. Par la suite, 150 µl d'une solution à 25 µg/ml de résazurine dans le milieu RPMI 1640 (exempt de rouge phénol et de sérum de veau foetal (SVF)), sont distribués dans chaque puits à l'aide d'une micropipette à canaux multiples Multidrop 384™ de LabSystems. Les plaques sont incubées pendant 1 heure à 37 °C avec 5% de CO₂ sous atmosphère humide, pour le développement de la fluorescence via le métabolisme cellulaire.

La fluorescence est mesurée avec un fluorimètre Fluoroskan Ascent FL™ de Labsystems. La longueur d'onde d'excitation est de 530 nm et l'émission de 590 nm. L'IC₅₀ est obtenu par la courbe du pourcentage de survie en fonction de la dose testée. Le pourcentage de survie des puits expérimentaux est exprimé par rapport à celui des puits témoins contenant les cellules non traitées, après soustraction des blancs relatifs aux solvants et au milieu, ainsi que du bruit de fond.

3.10.4. Quantification de l'ADN cellulaire par le Hoechst 33342

La quantification est effectuée après le test de réduction cellulaire avec la résazurine. Le Hoechst 33342, qui est au départ non-fluorescent, est un agent intercalant de l'ADN. Ce composé se lie aux régions riches en bases azotées AT et devient alors fluorescent. La fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN cellulaire. Pour quantifier l'ADN cellulaire, les puits sont d'abord vidés à l'aide du laveur de microplaques. Le volume résiduel (50µl) est cette fois éliminé par absorption sur du papier. Pour lyser les membranes des cellules, 100 µl d'une solution de SDS 0,01% (m/v) sont d'abord ajoutés à tous les puits. Les plaques sont par la suite incubées à 20 °C pendant 1 heure avec agitation sur un Tiramax™ de Labsystems, puis congelées à -80 °C, pendant plus d'une heure. Les plaques sont dégelées à température ambiante. Une solution à 30 µg/ml de Hoechst 33342 est préparée en diluant une solution stock à 1 mg/ml dans un tampon TNE 2X (Tris-Cl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 4M, pH 7.4, filtré sur 0,2 µm). La solution de 30 µg/ml est distribuée à raison de 100 µl par puits, puis les plaques sont incubées à température ambiante et à l'obscurité pendant 1 heure, avec une agitation moyenne sur Tiramax™. La

fluorescence est mesurée sur le fluorimètre Fluoroskan Ascent FL™ de Labsystems, après excitation à 360 nm et émission à 460 nm. L'IC₅₀ est obtenue par la courbe du pourcentage d'ADN en fonction de la dose testée. Le pourcentage d'ADN des puits expérimentaux est exprimé par rapport aux puits témoins qui n'ont subi aucun traitement, après soustraction des blancs (solvant et milieu) et du bruit de fond.

CHAPITRE 4
RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1. IDENTIFICATION DES ESPÈCES

Les espèces sont identifiées selon la méthode décrite à la section 3.3. Tout d'abord une première identification est effectuée d'après les caractéristiques morphologiques, qui correspondent à celles rapportées par la littérature à la section 2.2.1 [27,34,36]. Chez *Cladina stellaris*, le thalle de couleur jaune porte des ramifications dont les extrémités sont dirigées dans toutes les directions, lui conférant la forme arbustive qui permet de le différencier de *Cladina mitis* et *Cladina arbuscula*. L'identification de *Cladina stellaris* est de plus confirmée par les réactions colorimétriques où l'absence de réaction avec la PD confirme qu'il ne s'agit ni de *Cladina arbuscula* et ni de *Cladina rangiferina*. Le lichen *Cladina rangiferina* est d'ailleurs reconnu par la disposition unidirectionnelle de ses ramifications et la couleur gris cendre de son thalle. La réaction avec le KOH et le CaOCl qui donne une coloration jaune foncé et la réaction avec la PD spécifiques à *Cladina rangiferina*, permettent de confirmer l'identification d'abord effectuée par les critères morphologiques. Le Tableau 8 résume les principales caractéristiques morphologiques et les résultats des réactions colorimétriques.

Tableau 8 : Caractéristiques morphologiques et résultats des réactions colorimétriques pour les espèces étudiées.

Observations	<i>C. stellaris</i>	<i>C. rangiferina</i>
Thalle	Très ramifié (buisson)	Simple
Podétion	Jaune, mince et vide	Gris, large et vide
Ramifications	Multidirectionnelles	Unidirectionnelles
Extrémités	Effilées et jaunes	Sphériques et brunâtres
KOH	Coloration jaune pâle	Coloration jaune
PD	Aucune réaction	Coloration rouge orangé
CaOCl	Aucune réaction	Coloration jaune

4.2. EXTRACTION SUR *CLADINA STELLARIS*

Les extraits sur la poudre finement broyée de *Cladina stellaris* ont été obtenus avec différents solvants ou mélange de solvants, suite à une extraction au Soxhlet ou par macération d'une durée variant entre 24 et 72 heures (voir sections 3.5.1 et 3.5.3). Les extractions par entraînement à la vapeur d'eau sont effectuées sur des périodes de temps variant entre 2 et 3 heures (voir section 3.5.4). Les rendements des extraits obtenus et les conditions d'extraction sont rapportés au Tableau 9.

Tableau 9 : Conditions pour les extractions au Soxhlet, par macération et par entraînement à la vapeur sur *Cladina stellaris*.

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

Chez *Cladina stellaris*, la mise à l'essai de différentes conditions d'extraction au Soxhlet, montre que parmi les meilleurs rendements figurent ceux obtenus avec l'EtOH (no 5) et le mélange CHCl₃-MeOH (no 4), tel que signalé par la littérature [27,42,47]. Mais contrairement au résultat attendu, le meilleur rendement est observé avec l'extrait à l'hexane (no 1). Les solvants peu polaires sont considérés comme peu efficaces pour l'extraction des acides lichéniques [27,42]. Il est cependant possible que le lichen contienne des lipides ou d'autres composés susceptibles de passer en solution dans ces conditions [38]. Bien que l'étape du séchage sous pompe à vide ait été effectuée systématiquement pour chaque extrait, elle a probablement été omise pour cet échantillon. Outre cette différence dans le conditionnement de l'extrait à l'hexane (no 1), le rendement élevé peut être en lien avec l'âge des lichens et les conditions environnementales subit par la colonie

avant la récolte. Ce sont d'ailleurs des facteurs pouvant influencer la quantité de métabolites secondaires chez les lichens [40,41,42,45,52,54,94,95]. Cependant, certains auteurs avancent que la concentration intrathalline de certains composés, comme l'acide usnique (21), ne soit pas significativement influencée par la température [45]. Une augmentation de l'activité enzymatique pourrait expliquer le rendement élevé de l'extrait obtenu avec ces lichens, puisqu'ils proviennent d'un site montagneux très exposé à la lumière.

Une différence notable a aussi été observée entre les deux extraits au CHCl_3 (no 2 et no 3), le rendement de l'extrait no 2 étant plus élevé que celui de l'extrait no 3. L'extrait no 2 qui a donné le meilleur rendement provient d'une récolte effectuée en début de printemps à Chicoutimi, tandis que l'autre provient d'une récolte estivale effectuée dans le secteur ouest du Lac-Saint-Jean. Cette observation pourrait être expliquée par une différence d'âge entre les deux lots, puisqu'ils proviennent de milieux présentant le même type de couvert forestier, mais de deux secteurs différents. La colonie récoltée au Lac-Saint-Jean pourrait être plus âgée, ce qui se traduirait par une activité métabolique plus lente [95].

Le désavantage majeur d'utiliser des solvants polaires et peu volatiles lors de l'extraction au Soxhlet est qu'ils nécessitent de chauffer durant l'extraction à plus de 70 °C. Certains travaux montrent qu'une température de 85 °C est suffisante pour dégrader certains composés lichéniques. Bien que leurs points de fusion soient supérieurs à 196 °C, les conditions qui prévalent au cours de l'extraction se combinent probablement à la

chaleur pour catalyser leur décomposition [41,52]. Le problème de dégradation par la chaleur est contourné par le choix d'une macération plutôt qu'un Soxhlet.

Parmi les différentes conditions de macération mises à l'essai, le mélange DCM-MeOH (no 7) donne le meilleur rendement tel que rapporté au Tableau 9. Les extractions par macération (no 6, 8, 9, 10, 11 et 12) donnent des rendements moins intéressants par rapport à ceux obtenus par Soxhlet, à l'exception du mélange DCM-MeOH (no 7). Contrairement au pentane et au mélange EtOH-H₂O, le mélange DCM-MeOH cible une plus grande variété de composés, tel que le suggère la solubilité des acides lichéniques connus chez *Cladina stellaris* [27]. Le composé majeur, l'acide usnique (21), est d'ailleurs très soluble dans les solvants chlorés [27]. Le rendement obtenu par macération avec le mélange CHCl₃-Acétone (no 8) est faible par rapport au mélange DCM-MeOH (no 7). Une partie des produits a pu être perdue au cours des étapes de filtration et de transfert. Les rendements observés pour les extraits au pentane et à l'eau (no 6 et 12) sont également faibles. Il en est de même pour ceux des extraits no 9 et 10 obtenus avec le mélange EtOH-H₂O. Le rendement de l'extrait no 11 obtenu avec 80 % d'EtOH est légèrement plus élevé que ceux des extraits no 9 et 10. Il est de plus comparable à celui obtenu avec l'extrait CHCl₃-Acétone (no 8).

Concernant les rendements obtenus pour les extractions par entraînement à la vapeur (no 13 et 14), ils figurent parmi les plus faibles. Ces rendements indiquent que les produits volatiles sont très peu abondants chez *Cladina stellaris*. L'extraction par entraînement à la vapeur donne aussi de faibles résultats chez la mousse de chêne [53]. Les

acides lichéniques étant peu volatiles, ils peuvent être entraînés par la vapeur d'eau que suite à une hydrolyse [27,51,53].

Afin de favoriser une séparation primaire, en fonction de la solubilité préférentielle des composés extraits pour différents solvants, un Soxhlet fractionné a été mis à l'essai (voir section 3.5.2). Les conditions de l'extraction et les rendements obtenus sont présentés au Tableau 10.

Tableau 10 : Conditions de l'extraction fractionnée par Soxhlet sur *Cladina stellaris*

Solvant	Durée (heures)	Rendement (%)
Hexane	2	1,5
Diéthyléther	2	0,5
MeOH	16	2,7

La séquence de solvants utilisés pour l'extraction successive est inspirée de celle suggérée par la littérature [27]. Elle permet tout d'abord avec l'hexane d'aller chercher les composés non polaires, tandis que le diéthyléther vise à extraire les composés de polarité faible à intermédiaire. Finalement, le MeOH permet de récupérer les produits très polaires. L'extraction au MeOH qui donne le meilleur résultat, est favorisée par la durée. De plus, la proportion de composés fortement polaires semble importante chez ce lichen. L'hexane semble entraîner une bonne proportion des extractibles. À en juger par la couleur jaune que prend le solvant dès le début de l'extraction, l'acide usnique (**21**), le composé majeur de *Cladina stellaris*, est solubilisé rapidement dans ces conditions, malgré qu'il semble peu soluble dans l'hexane [27]. Concernant la fraction obtenue avec le diéthyléther, elle donne un plus faible rendement que l'extraction à l'hexane précédente, ce qui implique que

l'hexane entraîne non seulement les produits non polaires et l'acide usnique (21), mais aussi les extractibles allant d'une polarité faible à intermédiaire. En vue d'améliorer la sélectivité de l'extraction successive, le diéthyléther devrait être remplacé par un solvant chloré (DCM ou CHCl₃).

4.3. EXTRACTION SUR *CLADINA RANGIFERINA*

Les extraits de *Cladina rangiferina* sont obtenus par extraction au Soxhlet ou par macération des thalles broyés, avec différents solvants ou mélange de solvants pendant 24 ou 72 heures (voir sections 3.5.3 et 3.5.1). Les conditions d'extraction et les rendements obtenus sont présentés au Tableau 11.

Tableau 11 : Conditions pour les extractions par Soxhlet et par macération sur *Cladina rangiferina*

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

Les rendements des extraits obtenus avec *Cladina rangiferina* sont faibles à l'exception de celui à l'EtOH (no 1) qui est le plus élevé. Les extractions au CHCl₃ et à l'acétone (no 2 et 3) donnent des rendements plus faibles qu'avec l'EtOH. Ces résultats sont attribuables à des différences dans le conditionnement de ces deux extraits.

Concernant l'extrait à l'acétone, l'utilisation d'un Soxhlet dont le siphon ne fonctionnait pas, a occasionné une saturation rapide du solvant. Pour l'extrait au CHCl_3 , un séchage a été effectué à 100 °C pendant 20 minutes. Ce traitement physique a pu avoir un impact sur la quantité de métabolites récoltés. En effet, la température d'entreposage ou de séchage peut influencer l'analyse quantitative voir même qualitative, tel qu'observé par certains travaux [52,54]. Ces variations pourraient être attribuables à une dégradation catalysée par une depside hydrolase [52]. Les produits ainsi formés, seraient évaporés ou séquestrés par l'enzyme, résultant d'une plus faible quantité de métabolites récoltés [94].

Concernant les extraits no 4, 5 et 6 obtenus par macération avec les mélanges EtOH-H₂O, ils sont équivalents et donnent des rendements faibles par rapport à ceux des extraits no 1, 2 et 3 obtenus par Soxhlet. Le même écart entre les rendements des mélanges EtOH-H₂O avec les extraits obtenus par Soxhlet a été observé chez *Cladina stellaris* (voir Tableau 9). L'écart s'explique par le fait que beaucoup de composés, connus chez les lichens, présentent un nombre de carbones et de chaînes alkyles élevés ce qui leur confèrent un caractère hydrophobe [27,37,42,44,55].

4.4. ANALYSE PAR CCM DES COMPOSÉS DE *CLADINA STELLARIS* ET *CLADINA*

RANGIFERINA

L'identification des composés à partir de leur indice de rétention s'est avérée impossible parce que le standard d'acide norstictique n'est pas vendu sur le marché. Ce composé était nécessaire pour standardiser l'analyse par CCM et comparer nos résultats

avec la littérature [27,45,46,47]. Les analyses par chromatographie sur couche mince ont donc été utilisées uniquement pour évaluer la complexité des extraits bruts.

Parmi les trois éluants mis à l'essai pour la chromatographie, le mélange Toluène-dioxane-acide acétique (36 : 9 : 1) et le mélange Hexane-diéthyléther-acide formique (13 : 8 : 2) ont donné les meilleurs résultats. L'éluant A : Toluène-dioxane-acide acétique (36 : 9 : 1) a été utilisé pour les analyses par CCM suivantes (voir section 3.4). Une représentation de la séparation chromatographique des extraits bruts de *Cladina rangiferina* et de *Cladina stellaris* est présentée à la Figure 11.

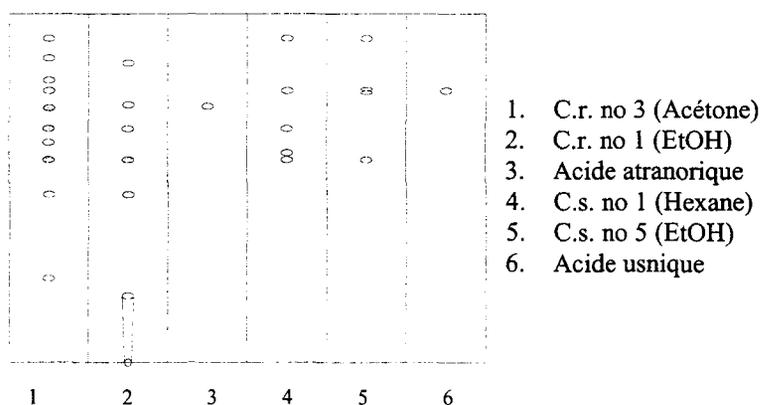


Figure 11 : CCM des extraits dans l'éluant A

La séparation correspond de gauche à droite aux extraits no 3 (Figure 11, #1), et no 1 (Figure 11, #2) de *Cladina rangiferina*, au standard d'acide atranorique (14) (Figure 11, #3), aux extraits no1 et no 5 (Figure 11, #4 et #5) de *Cladina stellaris*, puis au standard d'acide usnique (21) (Figure 11, #6). Pour détecter l'acide atranorique (14), qui est non visible avec le CAM, la plaque a été préalablement révélée à l'UV. Pour *Cladina rangiferina* les extraits no 3 et no 1 contiennent 10 et 7 produits respectivement (Figure 11,

#1 et #2), dont l'acide atranorique (**14**) qui est confirmé par ajout du standard. La traînée de l'extrait no 1 peut correspondre à plusieurs produits.

Pour ce qui est des extraits de *Cladina stellaris*, la complexité est moindre que pour *Cladina rangiferina*. Les extraits no 1 et no 5 sont constitués selon les CCM de 5 et 4 composés respectivement (Figure 11, #4 et #5). L'acide usnique (**21**) est présent dans les deux extraits, mais semble co-éluer avec un autre composé pour l'extrait no 5, tel qu'observé sur la Figure 11.

Les résultats des analyses par CCM montrent que la composition réelle des extraits des espèces étudiées est sous estimée par la littérature [27,45,46]. Ceci est attribuable à la méthode d'extraction choisie (Soxhlet), qui assure une solubilisation plus complète que la percolation à l'acétone utilisée par les auteurs. Par contre, une dégradation pendant le processus d'extraction peut résulter en la formation de nouveaux produits [27,52,54]. La présence de l'acide atranorique (**14**), un composé thermosensible, suggère que les conditions d'extractions soient suffisamment douces, mais n'écarte pas la possibilité d'une dégradation partielle [52,54].

La composition des extraits EtOH-H₂O de *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina* a été également évaluée par CCM. Une représentation de la séparation chromatographique obtenue avec l'éluant A : Toluène-dioxane-acide acétique (180 : 45 : 5), après une révélation au CAM est présentée à la Figure 12.

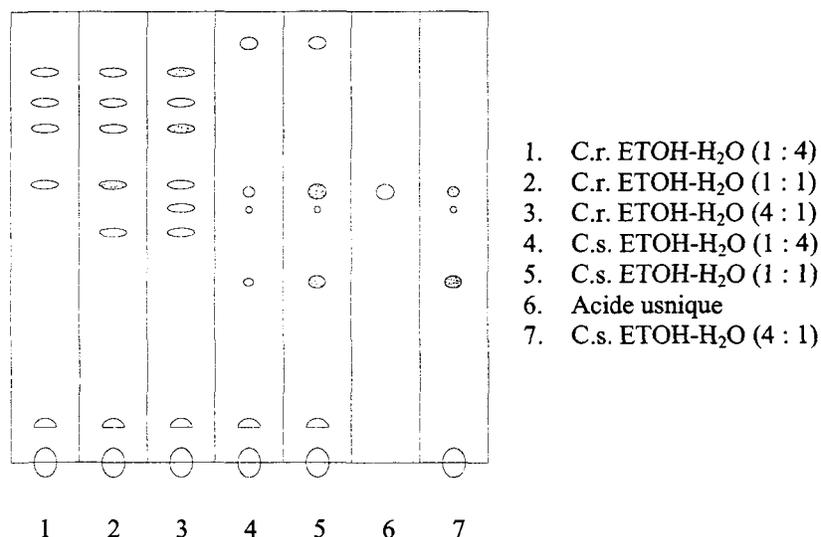


Figure 12 : CCM des extraits EtOH-H₂O dans l'éluant A

De gauche à droite, la figure représente les extraits EtOH-H₂O de *Cladina rangiferina* (Figure 12, #1, #2 et #3), puis ceux de *Cladina stellaris* (Figure 12, #4, #5 et #7) et le standard d'acide usnique (21) (Figure 12, #6). Le nombre de composés extraits chez *Cladina rangiferina* augmente avec la proportion d'EtOH (Figure 12, #1, #2 et #3). La présence d'acide atranorique (14) n'a pas été évaluée puisque la révélation à l'UV n'a pas été effectuée. L'acide usnique (21) semble présent dans tous les extraits de *Cladina stellaris* et également dans ceux de *Cladina rangiferina*. Selon la CCM d'origine, la tache de l'acide usnique (21) est jaune, ce qui n'est pas le cas pour les taches observées avec les extraits de *Cladina rangiferina* (Figure 12, #1, #2 et #3), ce n'est donc probablement pas de l'acide usnique (21). La présence de l'acide usnique (21) dans les trois extraits de *Cladina stellaris* (Figure 12, #4, #5 et #7) est de plus confirmée avec le standard (Figure 12, #6).

L'extrait de *Cladina stellaris* obtenu avec le mélange EtOH-H₂O (4 : 1) est exempt du composé le moins retenu (Figure 12, #7). Les taches circulaires à la ligne de base suggèrent la présence de composés polaires.

Les analyses des extraits obtenus par macération dans les mélanges EtOH-H₂O montrent une complexité insoupçonnée, mais il est possible que certains produits soient formés suite à l'hydrolyse des depsides, ce type de réaction pouvant se produire en présence d'eau, d'EtOH et de MeOH [27]. Selon la littérature, des sucres et des acides aminés sont susceptibles de se retrouver dans ces mélanges [22,63,65,66]. L'utilisation de révélateur, comme un mélange phénol-H₂SO₄ et la ninhydrine, aurait sans doute favorisée la détection des sucres et des acides aminés [22,38].

4.5. ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE

La GC-MS a été utilisée comme approche analytique pour l'identification de certains extractibles des lichens. Cette méthode analytique permet d'analyser un certain nombre de composés lichéniques, comme en témoignent les chromatogrammes présentés à l'annexe 5. La plupart des extraits obtenus avec différents solvants ont été analysés par GC-MS. Les structures de tous les composés identifiés dans les analyses GC-MS figurent à l'annexe 2. Il est à noter que seules les données chromatographiques et spectrales des composés bien résolus et abondants à plus de 0,5% sont rapportées. Comme les analyses sont étalées sur une période de deux ans, les temps de rétention peuvent varier sensiblement pour un même composé. Concernant les spectres de masse, l'ion moléculaire est rapporté

avec les fragments les plus abondants (les spectres de masse sont présentés à l'annexe 3). Les fragments secondaires doivent être issus de la perte de fragments caractéristiques, tels que H₂O ou CH₃OH, provenant de l'ion moléculaire [96,97,98,99]. L'attribution de l'ion moléculaire, de même que l'identité du composé, sont confirmées lorsque les données spectrales obtenues correspondent à celles rapportées par la littérature [27,84,85,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114].

L'analyse de la fragmentation et l'observation de fragments caractéristiques permettent de proposer dans certains cas, une famille de molécules pouvant convenir aux inconnus. L'identification des composés par la banque de données ou par la littérature conduit à des conclusions plus fiables. Cependant, l'identification à partir des spectres de masse s'avère souvent incertaine en raison de l'existence de plusieurs possibilités, c'est pourquoi les structures des composés présentées aux sections suivantes sont pour la plupart des propositions. Elles peuvent être sujettes à une révision aussi longtemps que leur isolation et leur caractérisation ne seront complétées.

Finalement, il est important de noter que certains contaminants retrouvés dans les extraits ont été identifiés par la banque de données. Ils ne figurent pas parmi les résultats présentés à cette section. L'abondance de ces contaminants a été soustraite, afin de mieux refléter la composition réelle des extraits obtenus. Les spectres de masse de ces produits sont présentés à la fin de l'annexe 3. Il s'agit principalement de phthalates, des polluants environnementaux provenant du plastique [106]. Ces composés peuvent être absorbés par les lichens lors de contacts avec le plastique ou être retrouvés dans les solvants [33,38]. Ils

se reconnaissent à leur pic de base $m/z = 149$, résultant de la formation de l'anhydride phthalique. L'expertise développée par notre laboratoire, permet de les reconnaître à l'aide des données chromatographiques et MS. Le BHT est un autre contaminant rencontré, il ne fait aucun doute que cet agent stabilisateur provient du diéthyléther.

4.5.1. Analyses des extraits par Soxhlet de *Cladina stellaris*

Les données chromatographiques et les spectres de masse des constituants de l'extrait no 1 obtenu avec l'hexane sont présentés au Tableau 12.

Tableau 12 : Données chromatographiques et MS des composés de l'extrait à l'hexane de

Cladina stellaris

T_R (min)	Composé	Abondance (%)	Spectre de masse (m/z, I%)
6.62	Hydrocarbure oxygéné (23)	0.5	M^+ 100 (4)?, 85 (24), 59 (55), 55 (42), 43 (100), 41 (35)
6.91	Hydrocarbure oxygéné (24)	0.8	M^+ 100 (1)?, 85 (22), 57 (17), 45 (68), 43 (100), 41 (30)
7.21	Hydrocarbure oxygéné (25)	1.0	M^+ 100 (1)?, 83 (91), 71 (19), 55 (68), 43 (100), 41 (28)
31.52	β -Orcinolméthyl-carboxylate (5)	1.7	M^+ 196 (33), 165 (20), 164 (75), 136 (100), 107 (16), 79 (16)
32.93	Olivétol (3)	0.6	M^+ 180 (15), 137 (9), 124 (100), 123 (27), 69 (10), 42 (10)
48.18	bis(2-éthylhexyl)-adipate (26)	2.6	M^+ ?, 147 (17), 129 (100), 112 (26), 70 (41), 55 (41)
53.08	Inconnu (27)	1.0	M^+ 322?, 182 (31), 154 (31), 55 (80), 44 (100), 42 (90)
54.89	Acide usnique (21)	89.7	M^+ 344 (39), 260 (48), 233 (100), 217 (22), 69 (13), 43 (54)

L'abondance tirée directement du chromatogramme de l'extrait à l'hexane, présenté à l'annexe 5, montre que les composés à plus de 0,5% représentent 97,9 % de l'extrait brut. Parmi les composés résolus, l'acide usnique (**21**) est le plus abondant. En plus d'être identifiée par la banque, la molécule se reconnaît facilement par l'ion moléculaire ($m/z = 344$). Les principaux fragments obtenus sont illustrés à la Figure 13.

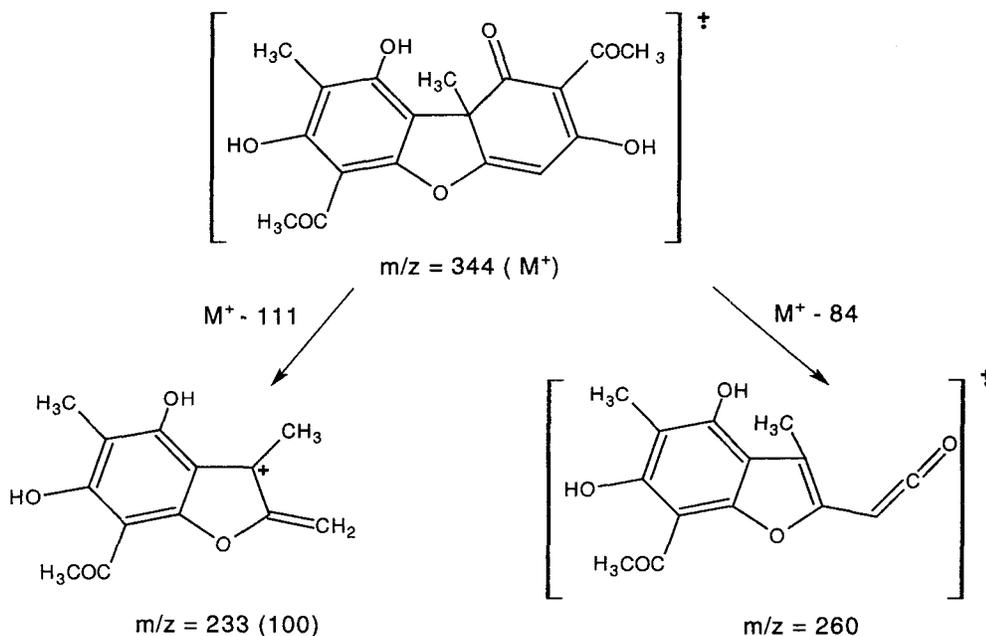


Figure 13 : Fragmentation de l'acide usnique (**21**) [27]

Le pic de base ($m/z = 233$) est formé suite à l'ouverture du cycle constitué d'un diène, tandis que le fragment $m/z = 260$ est obtenu par un autre type de clivage (voir Figure 13). Parmi les composés faiblement retenus, trois composés volatils inconnus présentent des spectres de masse apparentés aux hydrocarbures oxygénés (**23**, **24** et **25**) tels que l'hexanal ou l'hexanol [96,107,108]. Le composé élué après plus de 31,52 minutes est identifié par la banque comme étant le β -orcinolméthylcarboxylate (**5**). La Figure 14

présente les principaux fragments pouvant être formés, tel que rapporté au Tableau 12. Le fragment le plus intense est obtenu suite à la perte de l'ester ($M^+ - C_2H_4O_2$).

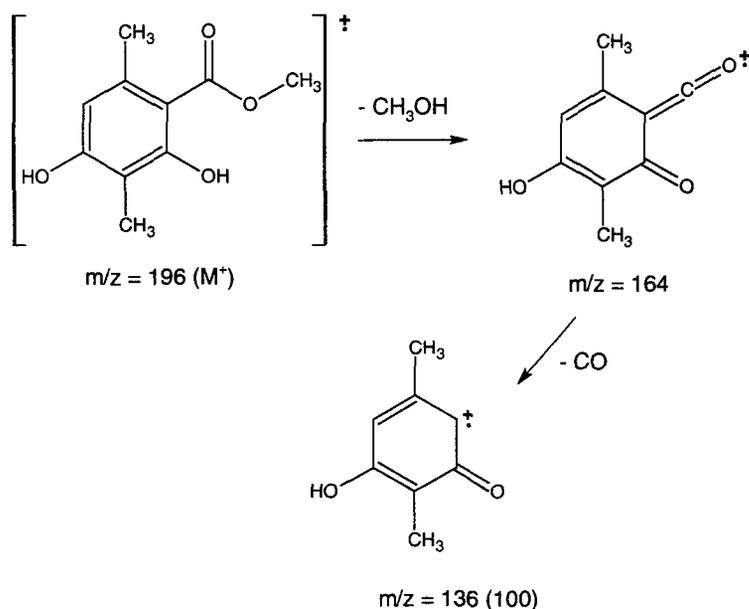


Figure 14: Fragmentation proposée pour le β -orcinolméthylcarboxylate (**5**) [97]

L'acide perlatolique (**13**), qui est généralement présent chez *Cladina stellaris*, n'est probablement pas détecté dans ces conditions chromatographiques [45,46,47]. D'autant plus que ce composé pourrait être dégradé au cours de l'injection, en raison de la labilité du lien ester [52]. Comme la distillation systématique des solvants n'a pas été effectuée et que l'extraction est effectuée aux environs de 70 °C, il faut s'attendre à rencontrer ces artefacts d'analyses. La dégradation thermique en présence d'eau du depside donnerait lieu à la formation de deux dérivés aromatiques, soit l'acide 4-O-méthylolivétolcarboxylique (**9**) et l'acide olivétolcarboxylique (**28**). En prenant pour acquis que l'acide perlatolique (**13**) est présent dans cet extrait, l'absence de ces deux dérivés suggère qu'ils se décomposent à leur

tour, pour former l'olivétol (3) et l'olivétolmonométhyléther (6). En effet, ces composés peuvent être obtenus suite à une décarboxylation [52], tel qu'illustré à la Figure 15. C'est d'ailleurs ce qui semble s'être produit, tel que l'indique la présence d'un composé peu abondant (0,6 %) identifié par la banque comme étant l'olivétol (3).

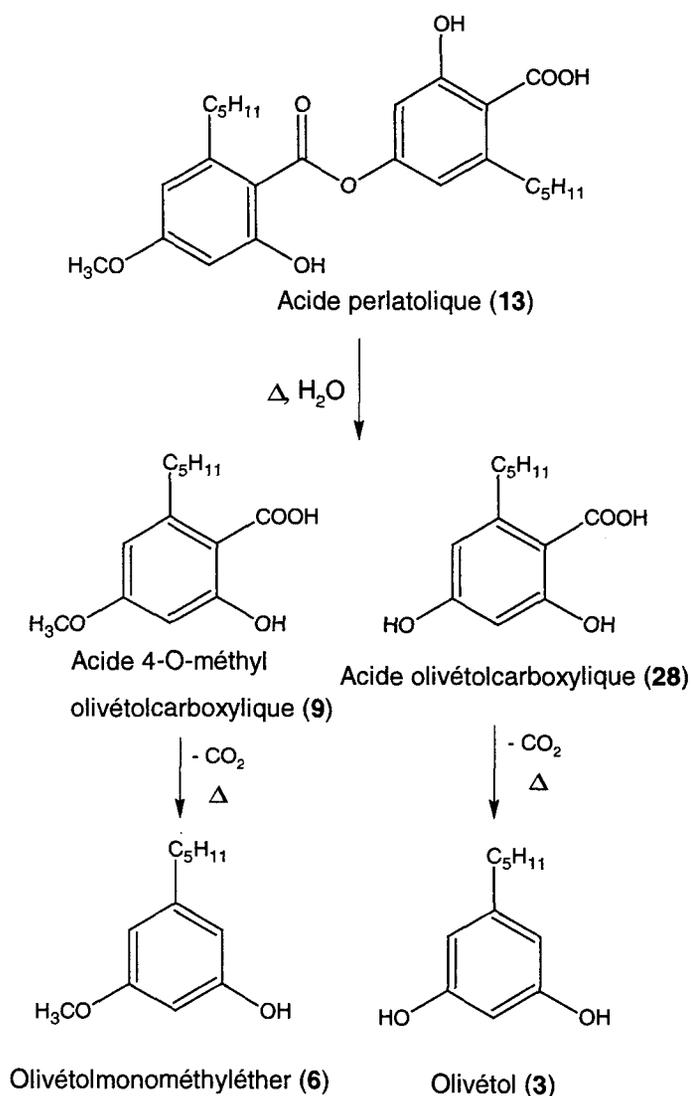


Figure 15 : Dégradation thermique de l'acide perlatolique (13)

Il est important de souligner que la présence de l'olivétolmonométhyléther (6) a été également observée à 31,36 minutes. Comme l'olivétolmonométhyléther (6) est peu abondant (moins de 0,5%), il ne figure pas parmi les composés rapportés au Tableau 12. La différence entre l'abondance de l'olivétol (3) et celle de l'olivétolmonométhyléther (6) suggère que l'acide 4-O-méthylolivétolcarboxylique (9) ne soit que partiellement décomposé. L'ion moléculaire de 180 m/z et la formation des principaux fragments de l'olivétol (3) sont illustrés à la Figure 16.

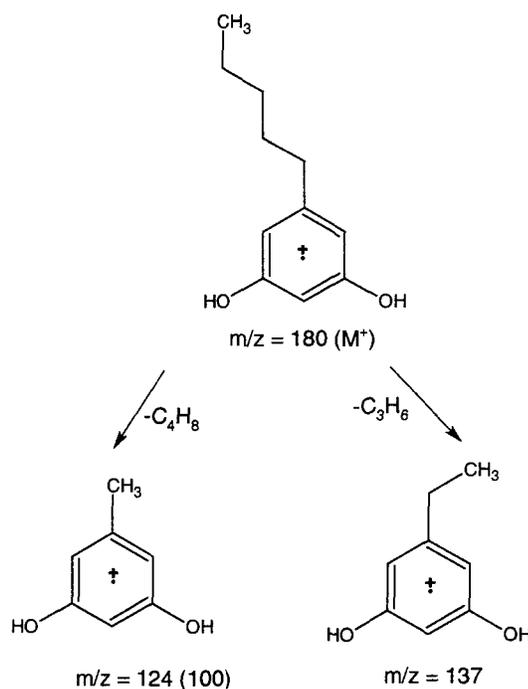


Figure 16 : Fragmentation proposée de l'olivétol (3) [86,99]

Le pic base ($m/z = 124$) est formé par un clivage résultant de la migration d'un hydrogène et de la perte d'un fragment neutre (C_4H_8) [86,99]. Le fragment moins abondant de $m/z = 137$ est formé suite au départ d'un C_3H_6 , selon un clivage similaire, tel qu'observé pour la fragmentation des hydrocarbures aromatiques [99].

Un autre composé parmi les plus abondant est résolu à 48,18 minutes. Tel qu'identifié par la banque de données, il s'agit d'un dérivé de l'acide adipique, soit le bis-(2-éthylhexyl)adipate (**26**) dont la structure est présentée à la Figure 17.

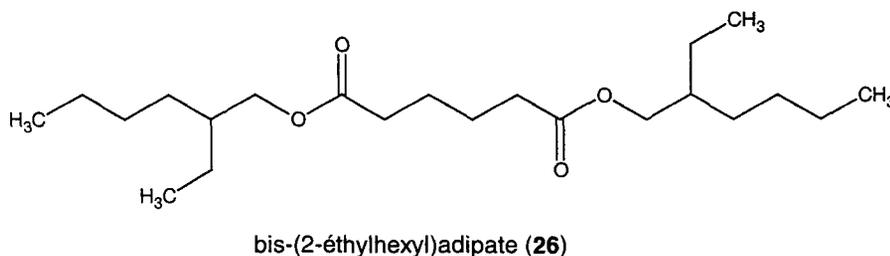


Figure 17 : Structure du bis-(2-éthylhexyl)adipate (**26**)

La présence de cet acide aliphatique estérifié est probablement due à des artefacts d'analyses. Certains acides gras présentant des spectres de masse similaires, ont été obtenus suite à des réactions d'estérification sur des acides gras provenant du lichen *Cetraria islandica* [109]. Bien que les dérivés de l'acide adipique ne soient pas considérés comme des polluants environnementaux [106], le bis-(2-éthylhexyl)adipate (**26**) est utilisé comme agent flexibilisateur dans le plastique. Finalement, un composé inconnu peu abondant, ne peut être identifié par son spectre de masse. Cet inconnu (**27**) ($T_R = 53,08$ minutes) possède un pic de base de 44 m/z et des fragments ($m/z = 55$ et 182), mais l'ion moléculaire n'est pas visible.

Les données chromatographiques de l'analyse GC-MS des extraits au CHCl_3 sont présentées au Tableau 13 et Tableau 14. Tel que décrit précédemment les extraits contiennent majoritairement de l'acide usnique (**21**). La présence du bis-(2-éthylhexyl)adipate (**26**) est observée dans les deux cas (voir Tableau 13 et Tableau 14). Par

contre, l'olivétol (**3**) est absent dans l'extrait no 2, où un hydrocarbure (**29**) est observé à 51,76 minutes et identifié par la banque de données. Il est possible que la présence de cet hydrocarbure soit due à des artefacts d'analyses, bien que la littérature rapporte des traces de ce type de composé chez le lichen *Cetraria islandica* [109].

Tableau 13 : Données chromatographiques et MS des composés de l'extrait au CHCl₃ no 2
de *Cladina stellaris*

T _R (min)	Composé	Abondance (%)	Spectre de masse (m/z, I%)
48.13	bis-(2-éthylhexyl)- adipate (26)	1.6	M ⁺ ?, 147 (17), 129 (100), 112 (26), 57 (41), 55 (41)
51.76	Hydrocarbure (29)	4.9	M ⁺ ?, 99 (13), 85 (46), 71 (66), 57 (100), 55 (26), 43 (76)
53.13	Inconnu (27)	8.5	M ⁺ 322?, 182 (31), 154 (31), 55 (80), 44 (100), 42 (90)
53.83	Inconnu (30)	3.4	M ⁺ 318 (16), 234 (51), 233(100), 215 (34), 85 (34), 43 (59)
55.04	Acide usnique (21)	78.2	M ⁺ 344 (39), 260 (48), 233 (100), 217 (22), 69 (13), 43 (54)

Tableau 14 : Données chromatographiques et MS des composés de l'extrait au CHCl₃ no 3
de *Cladina stellaris*

T _R (min)	Composé	Abondance (%)	Spectre de masse (m/z, I%)
32.80	Olivétol (3)	4.0	M ⁺ 180 (15), 137 (9), 124 (100), 123 (27), 69 (10), 42 (10)
38.65	4-O-méthylolivétol- éthylcarboxylate (31) ?	12.7	M ⁺ 266 (18), 220 (36), 210 (40), 192 (23), 164 (100), 135 (24)
48.02	bis-(2-éthylhexyl)- adipate (26)	0.7	M ⁺ ?, 129 (100), 71 (34), 70 (41), 57 (62), 55 (41)
54.75	Acide usnique (21)	80.0	M ⁺ 344 (39), 260 (48), 233 (100), 217 (22), 69 (13), 43 (54)

Une autre différence est observée pour ces deux extraits. L'inconnu (27) déjà remarqué dans l'extrait à l'hexane est abondant à plus de 8,5 % dans l'extrait no 2, mais absent de l'extrait no 3. Il en est de même pour un autre composé inconnu (30, Tr = 53,83 minutes), retrouvé uniquement dans l'extrait no 2. Les principaux fragments obtenus pour ce composé montrent une similitude avec le spectre de l'acide usnique (21). En effet, la fragmentation de ce composé donne le même pic de base ($m/z = 233$), que l'acide usnique (21).

L'analyse de l'extrait no 3 montre également la présence d'un nouveau composé qui semble correspondre à un dérivé de l'olivétol (5), soit le 4-O-méthylolivétol éthylcarboxylate (31). Cette identification non formelle est proposée sur la base de la fragmentation observée et des données fournies par la littérature [86]. La Figure 18 présente la formation des principaux fragments observés [86,97].

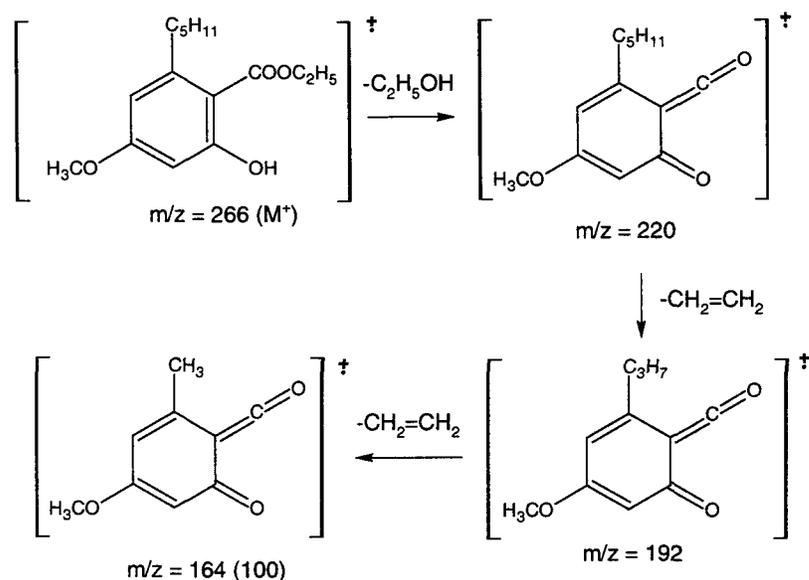


Figure 18 : Fragmentation proposée pour le 4-O-méthylolivétoléthylcarboxylate (**31**)

[86,97]

La différence dans la composition des extraits no 2 et no 3, serait attribuable à une différence entre l'origine et/ou l'âge des échantillons de lichens. Tel que discuté précédemment, le vieillissement des lichens implique une diminution du métabolisme, qui conduit non seulement à une baisse de la concentration de certains métabolites, mais peut aussi avoir un impact sur leur production [95]. Un autre facteur pouvant faire varier la composition des extraits est l'existence des quatre chemotypes pouvant être rencontrés chez le lichen *Cladina stellaris* [46]. Ainsi l'extrait no 2 proviendrait de lichens appartenant au chemotype III ou IV, tandis que les lichens de l'extrait no 3 appartiendraient au chemotype I ou II, puisque la présence d'acide perlatolique (**13**) se laisse entrevoir par la détection de l'olivétol (**5**), soupçonné d'être un de ses sous produits de dégradation

L'analyse de l'extrait à l'EtOH révèle une complexité supérieure à celles des extraits vus précédemment, tel que le montre les données chromatographiques rapportées au Tableau 15.

Tableau 15 : Données chromatographiques et MS des composés de l'extrait à l'EtOH de

Cladina stellaris

T_R (min)	Composé	Abondance (%)	Spectre de masse (m/z, I%)
35.57	Olivétol (3)	3.7	M^+ 180 (15), 137 (9), 124 (100), 123 (27), 69 (10), 42 (10)
38.09	Dérivé aromatique (32)	0.8	M^+ ?, 182 (33), 168 (50), 167 (100), 83 (9), 69 (15), 43 (20)
40.28	Acide olivétolcarboxylique (28)	0.5	M^+ 224 (64), 209 (100), 191 (57), 83 (15), 67 (33), 43 (67)
41.45	4-O-méthylolivétol- éthylcarboxylate (31) ?	6.5	M^+ 266 (18), 220 (36), 210 (40), 192 (23), 164 (100), 135 (24)
50.30	Dérivé aromatique polycyclique (33)	1.1	M^+ 276 (13), 234 (13), 233 (100), 215 (39), 77 (7), 43 (36)
51.10	bis-(2-éthylhexyl)- adipate (26)	0.5	M^+ ?, 147 (16), 129 (100), 112 (25), 83 (21), 70 (41), 57 (62)
56.96	Inconnu (30)	15.0	M^+ ? 318 (16), 260 (10), 234 (51), 233 (100), 215 (34), 43 (59)
57.99	Acide usnique (21)	40.0	M^+ 344 (39), 260 (48), 233 (100), 217 (22), 69 (13), 43 (54)
67.00	Inconnu (34)	1.4	M^+ 420 (13) ?, 260 (100), 234 (34), 217 (80), 204 (40), 55 (48)
67.08	Inconnu (35)	1.3	M^+ ?, 389 (5), 235 (13), 156 (100), 128 (18), 84 (16), 43 (20)

D'après les données MS disponibles dans la littérature [27], le composé à 40,28 minutes (possédant un ion moléculaire de $m/z = 224$) semble correspondre à l'acide olivétolcarboxylique (**28**), qui est soupçonné être un produit de dégradation de l'acide perlatolique (**13**).

En ce qui concerne le composé élué à 41,45 minutes, il correspond au 4-O-méthylolivétoléthylcarboxylate (**31**), tel que l'indique l'ion moléculaire ($m/z = 266$) et les fragments qui correspondent à ceux décrits par la littérature [27]. Ce composé pourrait être formé suite à l'éthanolysé de l'acide perlatolique (**13**) pendant l'extraction, ce qui expliquerait l'absence de l'olivétolmonométhyléther (**6**). L'analyse révèle plusieurs inconnus ne pouvant être identifiés en raison du manque d'information. C'est le cas du composé (**30**, $T_R = 56,96$ minutes), déjà relevé pour l'analyse de l'extrait au CHCl_3 no 2 (voir Tableau 13) et des inconnus (**34** et **35**) élués à 67,00 minutes et 67,08 minutes. La nature aromatique de l'inconnu (**32**) est confirmée par le pic de base de $m/z = 167$ [27]. L'inconnu (**33**) possédant un ion moléculaire de $m/z = 276$ semble être un dérivé aromatique polycyclique oxygéné, mais l'identification n'a pu être établie avec certitude [111].

4.5.2. Analyse des extraits à température ambiante de *Cladina stellaris*

Les analyses des extraits obtenus par macération à température ambiante visaient à évaluer la sensibilité thermique des produits naturels présents dans les *Cladina*. Le Tableau 16 montre les données chromatographiques et MS des composés obtenus à partir de l'extrait CHCl_3 -MeOH de *Cladina stellaris*.

Tableau 16 : Données chromatographiques et MS des composés de l'extrait CHCl₃-MeOH
de *Cladina stellaris*

T_R (min)	Composé	Abondance (%)	Spectre de masse (m/z, I%)
13.87	Nonanal (36)	0.7	M ⁺ ?, 124 (1), 70 (33), 57 (100), 55 (50), 43 (70), 41 (91)
19.76	Décénal (37)	2.1	M ⁺ ?, 136 (1) , 70 (82), 57 (57), 55 (84), 43 (99), 41 (100)
33.83	Olivétolmonométhyléther (6)	5.0	M ⁺ 194 (16), 152 (8), 138 (100), 137 (18), 107 (8), 77 (10)
34.03	β-oricinolméthyl- carboxylate (5)	2.0	M ⁺ 196 (33), 165 (20), 164 (75), 136 (100), 107 (16), 79 (16)
34.95	Inconnu (38)	4.2	M ⁺ ?, 259 (16), 171 (11), 113 (13), 69 (10), 59 (52), 43 (100)
35.64	Olivétol (3)	14.5	M ⁺ 180 (15), 137 (9), 124 (100), 123 (27), 69 (10), 42 (10)
39.51	4-O-méthylolivétol méthylcarboxylate (39) ?	1.3	M ⁺ 252 (20), 220 (30), 196 (52), 192 (20), 164 (100), 135 (25)
41.08	Dérivé d'acide aliphatique (40) ?	1.3	M ⁺ ?, 256 (8), 129 (29), 73 (100), 60 (94), 57 (69), 43 (99)
45.39	Inconnu (41)	0.9	M ⁺ ?, 264 (4), 83 (47), 69 (65), 55 (100), 43 (56), 41 (82)
45.96	Dérivé d'acide aliphatique (42)	0.5	M ⁺ 284 (11), 129 (31), 73 (90), 60 (81), 57 (74), 43 (100)
47.97	Dérivé aromatique (43)	0.5	M ⁺ ?, 262 (38), 206 (39), 177 (22), 164 (100), 135 (42), 41 (16)
49.37	Inconnu (44)	1.5	M ⁺ ?, 290 (2), 150 (21), 126 (100), 55 (44), 43 (77), 42 (72)
50.16	Inconnu (45)	0.8	M ⁺ ?, 112 (93), 69 (28), 57 (65), 55 (66), 43 (99), 41 (100)
50.28	Dérivé aromatique polycyclique (33) ?	1.1	M ⁺ 276 (13), 234 (13), 233 (100), 215 (39), 77 (7), 43 (36)
53.78	Dérivé aromatique polycyclique (46) ?	0.6	M ⁺ 278 (26), 233 (72), 215 (26), 126 (85), 43 (100), 41 (67)
57.35	Inconnu (30)	nd	M ⁺ ?, 318 (16), 260 (10), 234 (63), 233 (100), 85 (46), 43 (51)
57.37	Acide usnique (21)	25.2	M ⁺ 344 (39), 260 (48), 233 (100), 217 (22), 69 (13), 43 (54)
62.54	Inconnu (47)	0.8	M ⁺ ?, 362 (1), 323 (15), 125 (31), 96 (99), 69 (27), 43 (100)

La proportion de composé à plus de 0,5 % représente seulement 63 % de la composition de l'extrait brut. Le composé (30) à 57,35 minutes co-élue avec l'acide usnique ($T_R = 57,37$ minutes), ce qui rend son abondance difficile à déterminer. Le nombre de composés est nettement supérieur à celui obtenu pour les extractions au Soxhlet, à l'exception de celui obtenu avec l'EtOH (voir Tableau 15). Parmi les composés déjà identifiés dans les extraits précédents, figurent l'acide usnique (21), l'olivétol (3) et le β -orcinolméthylcarboxylate (5). Le bis-(2-éthylhexyl)adipate (26) identifié ultérieurement par la banque est absent, mais deux inconnus (40 et 42) présentent des spectres de masse avec un fragment de $m/z = 129$ apparenté aux acides aliphatiques estérifiés [109]. Un produit (43) élué à 47,97 minutes présente les caractéristiques structurales d'un dérivé aromatique. En effet, le pic de base de $m/z = 164$ est souvent observé lors de la fragmentation des depsides, suite au clivage du lien ester [27,101,102,113]. Deux composés (33 et 46) ont en commun le pic de base $m/z = 233$ en commun. Ils sont soupçonnés d'être des dérivés aromatiques polycycliques oxygénés, tel que mentionné précédemment. Des hydrocarbures ont été identifiés par la banque de données, il s'agit du nonanal (36) et du décénal (37) élués à 13,87 minutes et à 19,76 minutes.

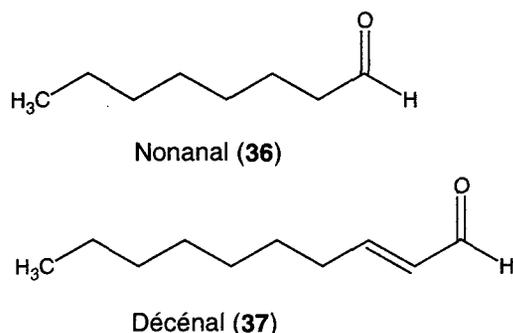
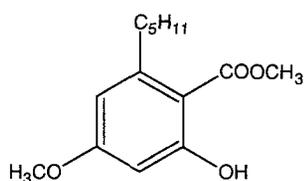


Figure 19 : Structure du nonanal (36) et du décénal (37)

Plusieurs dérivés monoaromatiques présentent des spectres caractéristiques disponibles dans la littérature [27,50]. L'olivétolmonométhyléther (6) sort peu avant l'olivétol (3), tel que l'indique le pic de base de $m/z = 138$, résultant de la perte d'un fragment C_4H_8 . Selon les données de la littérature, le 4-O-méthylolivétolméthylcarboxylate (39) semble présent dans cet extrait, contrairement au 4-O-méthylolivétoléthylcarboxylate (31), ce qui suggère qu'il a pu être formé suite à une méthanolyse de l'acide perlatolique (13) [27,50].



4-O-méthylolivétolméthylcarboxylate (39)

Figure 20 : Structure du 4-O-méthylolivétolméthylcarboxylate (39)

L'extrait obtenu avec le mélange DCM-Acétone est moins complexe que celui de l'analyse précédente. Tel que le montre le Tableau 17, l'analyse révèle un nombre de

composés moins élevé que celui de l'extrait DCM-MeOH. Les composés observés par les analyses précédentes sont communs à cet extrait.

Tableau 17 : Données chromatographiques et MS de l'extrait DCM-Acétone de *Cladina stellaris*

T_R (min)	Composé	Abondance Spectre de masse	
		(%)	(m/z, I%)
33.91	Olivétolmonométhyléther (6)	2.3	M^+ 194 (16), 152 (8), 138 (100), 137 (18), 107 (8), 77 (10)
34.09	β -orcinolméthyl-carboxylate (5)	2.3	M^+ 196 (33), 165 (20), 164 (75), 136 (100), 107 (16), 79 (16)
35.69	Olivétol (3)	4.9	M^+ 180 (15), 137 (9), 124 (100), 123 (27), 69 (10), 42 (10)
57.53	Inconnu (30)	4.9	M^+ 318 (16), 260 (10), 234 (63), 233 (100), 85 (46), 43 (51)
58.33	Acide usnique (21)	60.2	M^+ 344 (39), 260 (48), 233 (100), 217 (22), 69 (13), 43 (54)

Parmi les composés identifiés, figure l'acide usnique (21) qui est le plus abondant et l'inconnu (30) avec le fragment de $m/z = 318$, qui d'ailleurs est bien résolu contrairement à l'analyse précédente (Voir annexe 5). La proportion de composés résolus et abondants à plus de 0,5 % est de 74,6% dans cet extrait. Exceptionnellement pour cette analyse, 4 composés qui représentent 19,1 % de la composition de l'extrait, ont co-élus entre 58,38 et 58,96 minutes, les données MS relatives à ces composés n'ont pu être obtenues.

4.5.3. Analyse des huiles essentielles de *Cladina stellaris*

Les huiles essentielles obtenues par entraînement à la vapeur ont été analysées par GC-MS selon la méthode décrite à la section 3.7.1. L'entraînement à la vapeur effectué à deux reprises a permis de confirmer la présence de composés volatiles à plus de 0,5% chez

Cladina stellaris. Contrairement aux composantes volatiles de la mousse de chêne (*Evernia prunastri*) qui sont très bien caractérisées, les composés volatiles de *Cladina stellaris* n'ont fait l'objet d'aucune publication scientifique [50,51,53]. Le Tableau 18 rapporte les produits à plus de 0,5% sur le chromatogramme, qui représentent 93,3 % de la composition de l'huile essentielle de *Cladina stellaris*. Les produits responsables des signaux en chromatographie gazeuse et présentés au Tableau 18 ont été identifiés grâce aux informations chromatographiques et aux spectres de masse. Il est intéressant de souligner que seulement trois produits minoritaires n'ont pu être identifiés.

Tableau 18: Données chromatographiques et MS des composés volatiles de l'huile essentielle de *Cladina stellaris*

Composé	T _R (min)	Abondance (%)	I _K	I _K [85]	Spectre de masse (m/z, I%)
Mentha-1,5-dièn-8-ol (48)	26.72	0.8	1173	1166	M ⁺ ?, 94 (50), 91 (26), 79 (48), 77 (18), 59 (100), 43 (25)
α-terpinéol (49)	28.39	1.0	1191	1189	M ⁺ 136 (10), 121 (27), 93 (32), 81 (23), 67 (14), 59 (100)
2,4-nonadiénal (50)	30.01	1.0	1213	1212	M ⁺ 138 (5), 81 (100), 67 (14), 54 (8), 53 (12), 41 (29)
(E)-Décén-2-al (37)	33.38	1.8	1267	1264	M ⁺ ?, 83 (43), 70, (83), 55 (84), 43 (99), 41 (100)
(E,Z)-2,4-décadiénal (51)	35.62	1.1	1301	1293	M ⁺ 152 (8), 81 (100), 67 (30), 58 (65), 55 (30), 43 (57)
Dérivé aromatique (52)	36.82	1.2	1318		M ⁺ 150 (34), 121 (95), 94 (73), 93 (58), 91 (89), 77 (100),
(E,E)-2,4-décadiénal (53)	37.26	6.3	1324	1317	M ⁺ 152 (4), 81 (100), 95 (9), 67 (16), 55 (14), 41 (30)
Inconnu (54)	38.45	0.8	1340		M ⁺ ?, 125 (33), 99 (18), 84 (100), 55 (84), 43 (97), 41 (43)
2-undécénal (55)	40.42	1.3	1366	1365	M ⁺ 156 (2), 121 (10), 97 (14), 83 (40), 70 (72), 41 (100)
Inconnu (56)	41.51	2.2	1379		M ⁺ ?, 69 (11), 68 (100), 55 (14), 43 (16), 42 (11), 41 (23)
Inconnu (3b)	50.01	1.3	1515	nd	M ⁺ 180 (15), 137 (75), 125 (26), 124 (92), 81 (23), 55 (100)
2,6-di-tert-butyl-4-éthylphénol ? (57)	52.38	0.9	1551	nd	M ⁺ 234 (23), 220 (15), 219 (100), 91 (11), 57 (39), 41 (20)
Olivétolmonométhyléther (6)	61.04	73.6	1697	nd	M ⁺ 194 (16), 152 (8), 138 (100), 137 (18), 107 (8), 77 (10)

L'olivétolmonométhyléther (6), qui d'ailleurs est le composé le plus abondant de l'huile essentielle, a déjà été identifié dans les extraits obtenus par macération ou par extraction au Soxhlet. Concernant l'identification du composé (3b), bien qu'il possède des fragments de masse similaires à l'olivétol (3), il ne peut s'agir de ce produit, puisque l'inconnu (3b) est élué avant l'olivétolmonométhyléther (6), contrairement aux analyses

précédentes (voir Tableau 16 et Tableau 17). De plus l'intensité des fragments obtenus, entre autres celui de $m/z = 137$, n'est pas la même que celle observée pour l'olivétol (3) des extraits obtenus par Soxhlet ou par macération. Les composés monoaromatiques identifiés dans l'huile essentielle, peuvent être formés suite à l'hydrolyse de l'acide perlatolique (13), tel que mentionné pour l'huile essentielle de *Evernia prunastri* [53].

Les autres produits ont été identifiés à leur indice de Kovats d'après ceux rapportés par Adams, R. [84] et à leur spectre de masse en comparant avec la banque de données et la littérature [27,84,100,108]. La Figure 21 présente la structure de quelques composés volatiles.

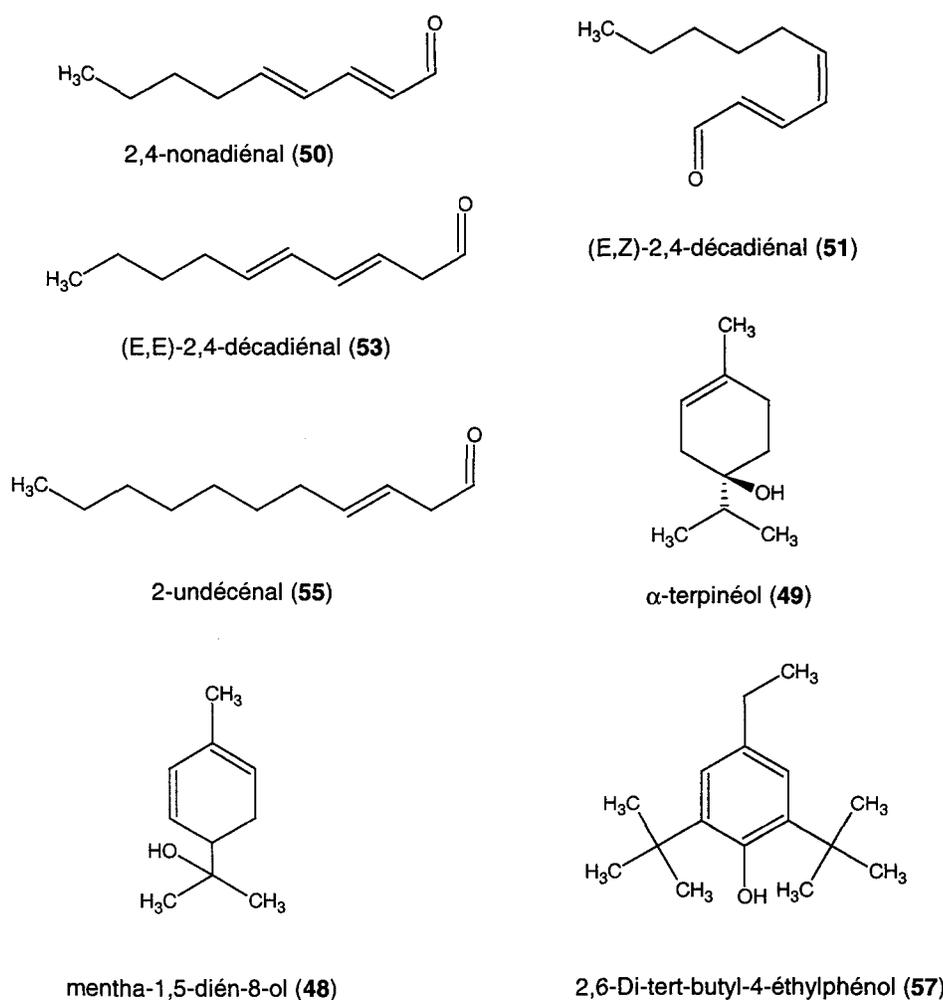


Figure 21 : Structure de quelques composés de l'huile essentielle de *Cladina stellaris*

Parmi les composés identifiés dans l'huile essentielle figurent les dérivés d'acides gras tels que le décén-2-al (37), le 2,4-nonadienal (50), le (E,E)-2,4-décadienal (53) le (E,Z)-2,4-décadienal (51) et le 2-undécenal (55). L'indice de Kovats a permis d'obtenir plus de précision sur la structure du décénal (37), qui a été identifié précédemment (voir Tableau 16). L'huile essentielle contient deux composés monoterpéniques, soient le mentha-1,5-dièn-8-ol (48) et de l' α -terpinéol (49). Le composé (57) élué à 52,38 minutes, mais dont l'indice de Kovats n'est pas disponible, présente les mêmes fragments que le 2,6-

di-tert-butyl-4-éthylphénol (57). Il pourrait s'agir d'un artefact d'analyse, puisque ce composé semble être un dérivé du BHT. Un dérivé aromatique (52) à 36,82 minutes se reconnaît à son fragment $m/z = 77$, qui indique la présence d'un ion phényle.

C'est la première fois, à notre connaissance, que sont rapportés des monoterpènes chez *Cladina stellaris*. Les composés de l'huile essentielle de *Cladina stellaris* sont communs à ceux retrouvés chez *Evernia prunastri*, ce qui permet d'associer leur présence au métabolisme particulier des lichens [27,50,51,53,103,112]. De plus, l'observation de microstructures de type vésiculaire chez certains lichens suggère que les composés identifiés chez *Cladina stellaris* puissent non seulement être biosynthétisés, mais aussi accumulés tout comme les métabolites des plantes vasculaires [113].

4.6. ANALYSE DES COMPOSÉS DE *CLADINA RANGIFERINA*

Les extraits de *Cladina rangiferina* obtenus par extraction au Soxhlet ont été analysés par GC-MS. Les données chromatographiques et spectrales sont rapportées tel que pour *Cladina stellaris*.

4.6.1. Influence de la chaleur sur l'acide atranorique

Dans un premier temps, la sensibilité thermique de l'acide atranorique (14) a été vérifiée. Pour ce faire, le standard d'acide atranorique (14) a été dilué dans le DCM et injecté dans les mêmes conditions que celles décrites à la section 3.7.1. Le Tableau 19 montre les produits résultant de la dégradation thermique de l'acide atranorique (14).

Tableau 19 : Données chromatographiques et MS de l'acide atranorique (14).

T _R (min)	Composé	Abondance (%)	Spectre de masse (m/z, I%)
24.87	Produit non identifié (58)	11.7	M ⁺ ?. 188 (27), 187 (40), 186 (83), 185 (100), 140 (19), 77 (19)
26.85	2,6-dihydroxy-4-méthyl- benzaldéhyde (59)	8.8	M ⁺ 152 (79), 151 (100), 106 (15), 77 (13), 53 (15), 39 (16)
31.41	β-orcinolméthyl- carboxylate (5)	75.8	M ⁺ 196 (36), 165 (24), 164 (80), 136 (100), 107 (18), 77 (18)

Le produit de dégradation thermique le plus abondant correspond au β-orcinolméthylcarboxylate (5), tel qu'identifié par la banque de données. Le 2,6-dihydroxy-4-méthylbenzaldéhyde (59) a été également identifié. Le composé non identifié (58) semble de nature aromatique, comme l'indique la présence de l'ion phényle (77 m/z) [97]. L'absence de l'ion moléculaire (m/z = 374) et du pic de base (m/z = 196) de l'acide atranorique (14), indique que la molécule est dégradée au cours de l'injection, ce qui implique que ce composé n'est pas détectable dans ces conditions chromatographiques.

4.6.2. Analyse des extraits au Soxhlet de *Cladina rangiferina*

Malgré la dégradation du composé majeur de *Cladina rangiferina*, l'analyse des autres composés des extraits par chromatographie gazeuse nécessitait l'utilisation de ces conditions d'opérations (voir section 3.7.1). C'est donc dans ces mêmes conditions que les analyses des extraits de *Cladina rangiferina* ont été effectuées. Les données chromatographiques et les spectres de masse des constituants de l'extrait CHCl₃ sont présentés au Tableau 20

Tableau 20 : Données chromatographiques et MS des composés de l'extrait au CHCl₃ de
Cladina rangiferina

T _R (min)	Composé	Abondance (%)	Spectre de masse (m/z, I%)
27.09	2,4-dihydroxy-6-méthyl- benzaldéhyde (59)	4.7	M ⁺ 152 (79), 151 (100), 106 (15), 77 (13), 55 (13), 53 (15)
30.17	Méthylhaematommate (7)	2.4	M ⁺ 210 (31), 178 (20), 150 (100), 122 (22), 94 (15), 53 (18)
31.82	β-orcinolméthyl- carboxylate (5)	51.1	M ⁺ 196 (36), 164 (80), 136 (100), 135 (12), 79 (19), 77 (18)
32.71	Ethyl haematommate (8)	36.7	M ⁺ 224 (23), 196 (13), 178 (18), 150 (100), 122 (13), 94 (8)
48.16	bis-(2-éthylhexyl)- adipate (26)	0.8	M ⁺ ?, 259 (1), 129 (100), 112 (26), 83 (21), 70 (41), 57 (41), 55(41)

Tel qu'attendu, puisqu'il provient de la dégradation de l'acide atranorique (**14**), le β-orcinolméthylcarboxylate (**5**) est le composé le plus abondant. Le produit sortant après 27,09 minutes correspond au produit de dégradation (**59**), tel qu'observé pour l'analyse du standard d'acide atranorique (**14**). Le composé résolu après 30,17 minutes semble correspondre au méthylhaematommate (**7**), tel que le suggèrent les données de la littérature [27]. Cette identification non formelle est basée sur l'intensité des fragments formés, puisque la littérature rapporte le même patron de fragmentation pour divers composés [27]. La Figure 22 montre la formation de l'ion responsable du pic de base (m/z = 150) du méthylhaematommate (**7**).

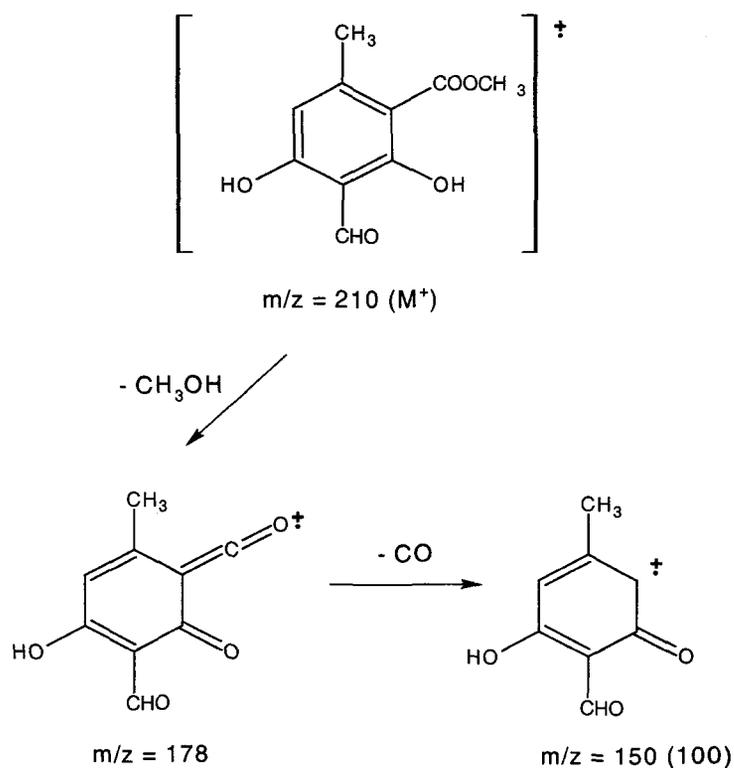


Figure 22 : Fragmentation proposée pour le méthylhaematommate (7) [99]

L'éthylhaematommate (8) a été identifié non seulement par la banque de données, mais également à l'aide de la RMN (voir section 4.9). Finalement, un composé déjà identifié chez *Cladina stellaris*, le bis-(2-ethylhexyl)adipate (26), est aussi observé dans cet extrait. L'acide protocétrarique (18) et l'acide fumarprotocétrarique (19), deux métabolites secondaires rapportés par la littérature, ne sont pas détectés dans ces conditions chromatographiques, en raison de leur trop faible volatilité [45,46,47].

L'extrait à l'acétone présente une composition plus complexe que l'extrait obtenu au CHCl_3 , tel que l'indiquent les données chromatographiques et les spectres de masse présentés au Tableau 21.

Tableau 21 : Données chromatographiques et MS des composés de l'extrait à l'acétone de *Cladina rangiferina*.

T_R (min)	Composé	Abondance (%)	Spectre de masse (m/z, I%)
22.71	Inconnu (60)	1.3	M ⁺ ?, 138 (26), 101 (48), 75 (13), 59 (43), 57 (15), 43 (100)
26.91	2,6-dihydroxy-4-méthylbenzaldéhyde (59)	17.7	M ⁺ 152 (79), 151 (100), 106 (15), 77 (13), 55 (13), 53 (15)
29.95	Méthylhaematommate (7)	1.7	M ⁺ 210 (31), 178 (20), 150 (100), 122 (22), 94 (15), 66 (13)
31.44	β -orcinolméthylcarboxylate (5)	55.2	M ⁺ 196 (36), 165 (24), 164 (80), 136 (100), 107 (18), 77 (18)
33.51	Acide haematommique (11)	1.2	M ⁺ 196 (34), 151 (23), 150 (100), 122 (24), 94 (24), 66 (27)
40.18	Lactone (61)	0.9	M ⁺ 224 (7), 61 (24), 56 (100), 55 (33), 43 (28), 41 (34)
47.63	Dérivé aromatique (62)	1.3	M ⁺ ?, 258 (100), 230 (95), 229 (19), 174 (6), 77 (15), 51 (20)
52.83	Inconnu (63)	0.6	M ⁺ 196 (11), 81(24), 69 (27), 55 (65), 43 (100), 41 (81)
56.61	Inconnu (64)	0.9	M ⁺ ?, 429 (4), 281 (11), 221 (21), 207 (11), 147 (40), 73 (100)
59.03	Inconnu (65)	0.9	M ⁺ ?, 429 (5), 281 (15), 221 (25), 207 (11), 147 (46), 73 (100)
61.26	Inconnu (66)	0.9	M ⁺ ?, 429 (5), 281 (13), 221 (25), 207 (11), 147 (47), 73 (100)
63.37	Inconnu (67)	0.8	M ⁺ ?, 429 (4), 281 (15), 221 (30), 207 (16), 147 (56), 73 (100)
65.35	Inconnu (68)	0.8	M ⁺ ?, 429 (4), 281 (11), 221 (21), 207 (11), 147 (40), 73 (100)
67.24	Inconnu (69)	0.7	M ⁺ ?, 429 (4), 281 (11), 221 (21), 207 (11), 147 (40), 73 (100)
69.03	Inconnu (70)	0.6	M ⁺ ?, 429 (4), 281 (11), 221 (21), 207 (11), 147 (40), 73 (100)

Parmi les composés déjà identifiés, les produits de dégradation de l'acide atranorique (14), soient le β -orcinolméthylcarboxylate (5) et le 2,6-dihydroxy-4-méthylbenzaldéhyde (59), sont les plus abondants. La présence du méthylhaematommate (7) est également observée. Un autre dérivé aromatique élué à 33,51 minutes correspond, selon

les données MS de la littérature, à l'acide haematommique (11). Ce composé peut être formé suite à la dégradation thermique de l'acide atranorique (14). Comme il est instable, il est probable qu'il soit décarboxylé pour former le 2,6-dihydroxy-4-méthyl-benzaldéhyde (59) [27]. Ceci expliquerait pourquoi il n'est pas détecté dans les autres analyses et qu'il soit si peu abondant par rapport au 2,6-dihydroxy-4-méthyl-benzaldéhyde (59) [27]. Le composé (61) à 40,18 minutes pourrait correspondre à une lactone, tel que l'indique le pic de base $m/z = 56$ observé, correspondant à l'ion $C_4H_8^+$ formé suite au clivage de l'hétérocycle [97]. Concernant le composé (62) élué à 47,63 minutes, le fragment peu intense de $m/z = 77$, qui indique la présence de l'ion phényle, pourrait provenir de la décomposition complexe d'un composé polycyclique, tel que l'indique les fragments de masse abondants $m/z = 258$ et $m/z = 230$ [27,97]. Le composé (63) ne présente aucune information utile pour déterminer de quelle famille de molécule il provient. C'est également le cas pour les composés (64,65,66,67,68,69 et 70) élués entre 56 et 69 minutes qui présentent des spectres de masse très similaires.

Les données chromatographiques et MS présentées au Tableau 22 montrent que l'extrait à l'EtOH est très peu complexe par rapport aux analyses précédentes (voir Tableau 20 et Tableau 21).

Tableau 22 : Données chromatographiques et MS des composés de l'extrait à l'EtOH de
Cladina rangiferina.

T_R (min)	Composé	Abondance (%)	Spectre de masse (m/z, I%)
31.52	β -orcinolméthyl- carboxylate (5)	63.3	M^+ 196 (36), 165 (24), 164 (80), 136 (100), 107 (18), 77 (18)
32.44	Ethylhaematommate (8)	33.1	M^+ 224 (23), 196 (13), 178 (18), 150 (100), 122 (13), 94 (8)

Seulement deux composés, soient le β -orcinolméthylcarboxylate (5) et l'éthylhaematommate (8), sont présents et constituent 96,4 % de l'extrait. La dégradation de l'acide atranorique (14) ne semble pas reliée aux conditions chromatographiques, puisque ni l'acide haematommique (11) et ni le 2,6-dihydroxy-4-méthyl-benzaldéhyde (59) ne sont observés. L'absence de ces deux produits de dégradation et la présence de l'éthylhaematommate (8) suggèrent fortement qu'une éthanolyse complète de l'acide atranorique (14) soit survenue après l'extraction (selon l'analyse par CCM présentée à la section 4.4, le composé (14) était présent dans l'extrait à l'EtOH).

4.7. ANALYSE DES EXTRAITS ETOH-H₂O PAR HPLC ET TENTATIVES D'ISOLATION PAR HPLC SEMI-PRÉPARATIF

Les problèmes reliés à la faible volatilité des acides lichéniques ou à leur sensibilité thermique (dégradation en GC) ont pu être contournés par l'analyse HPLC. L'analyse HPLC de l'extrait EtOH-H₂O (4 : 1) de *Cladina rangiferina* a tout d'abord permis de tester la méthode décrite à la section 3.8.4. Suite à l'obtention d'une bonne résolution, la méthode a été appliquée pour analyser et isoler les composantes des extraits

EtOH-H₂O (4 : 1) effectués avec les deux espèces. Les chromatogrammes obtenus pour les analyses en HPLC effectuées avec le chromatographe Shimadzu sont présentés à l'annexe 6. Les données chromatographiques de l'extrait EtOH-H₂O (4 : 1) de *Cladina stellaris* sont présentées au Tableau 23.

Tableau 23 : Données chromatographiques de l'extrait EtOH-H₂O (4:1) de *Cladina stellaris*.

T _R (min)	Abondance relative (%)	
	270 (nm)	370 (nm)
2,91	1,0	1,2
3,17	nd	0,8
3,62	57,1	3,0
5,91	0,1	2,0
21,07	1,8	nd
22,18	1,3	2,9
24,27	2,9	nd
34,70	0,7	nd
35,84	0,7	0,8
36,67	nd	nd
40,09	1,2	nd
42,38	7,2	84,5
42,85	1,5	nd
43,08	1,1	nd
52,58	22,1	4,7

Aucun standard interne n'a été utilisé, c'est pour cette raison que l'analyse HPLC ne permet pas de quantifier l'abondance des composés [83]. L'analyse révèle que 15 composés dont l'intégration est supérieure à 0,5% sont présents dans cet extrait. Comme les extraits aqueux n'ont fait l'objet d'aucune analyse HPLC visant à en déterminer les composantes et ce, à partir des indices de rétention (RI), aucun étalonnage interne n'a été effectué [27,45,46,47,85,86,83]. Il en est de même pour l'analyse de l'extrait EtOH-H₂O (4: 1) de *Cladina rangiferina* (Tableau 24).

Tableau 24 : Données chromatographiques de l'extrait EtOH-H₂O (4:1) de *Cladina rangiferina*

T_R (min)	Abondance relative (%)	
	270 (nm)	370 (nm)
2,83	2,3	nd
2,91	nd	2,3
3,17	nd	2,4
3,6	48,9	7,3
13,18	0,1	2,6
16,29	nd	0,7
21,15	6,8	1,0
21,58	0,5	2,1
22,23	0,4	1,3
24,71	2,5	3,7
26,57	6,5	16,0
31,39	9,9	7,1
32,16	3,4	3,9
32,51	1,9	4,7
34,32	13,8	9,6
42,42	1,8	28,1
43,81	0,5	2,2
66,22	nd	0,8

L'analyse de l'extrait EtOH-H₂O révèle la présence de 18 produits, dont l'intégration est supérieure à 0,5%, dans l'extrait.

À notre connaissance, il n'a jamais été rapporté un nombre aussi élevé de composés chez ces deux espèces [40,41,45,46,47]. Il est possible que la composition réelle des extraits soit surestimée, puisque l'éventualité d'une hydrolyse dans les conditions de l'extraction ne peut être écartée [52]. À l'exception des métabolites primaires, tels que les sucres et les acides aminés, la littérature ne couvre pas la composition des extraits obtenus avec des mélanges aqueux [63,65,66].

D'après la résolution obtenue à l'échelle analytique, il semble possible de récupérer les composés majeurs de ces extraits (voir les chromatogrammes présentés à l'annexe 6). Les conditions chromatographiques pourraient être utilisées pour la séparation tel que décrit à la section section 3.8.4.

4.8. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT À L'ÉTOH ET ANALYSES DES FRACTIONS OBTENUES PAR CCM ET HPLC

Afin d'obtenir une séparation primaire des composés extraits, le fractionnement par solubilité différentielle ou par partition a été mis à l'essai. Parmi les extraits qui ont été fractionnés, c'est la séparation des composantes de l'extrait à l'ÉtOH qui nous a semblé la plus intéressante. En effet, l'analyse GC-MS a révélé que l'extrait était constitué d'un mélange complexe, formé de composés volatiles et moins volatiles (voir section 4.5.1). Le fractionnement de l'extrait à l'ÉtOH a été effectué tel que décrit par Hui *et al* [80] et présenté à la section 3.6.2. La Figure 23 présente les étapes du fractionnement ainsi que les quantités de produits obtenues pour les fractions organiques.

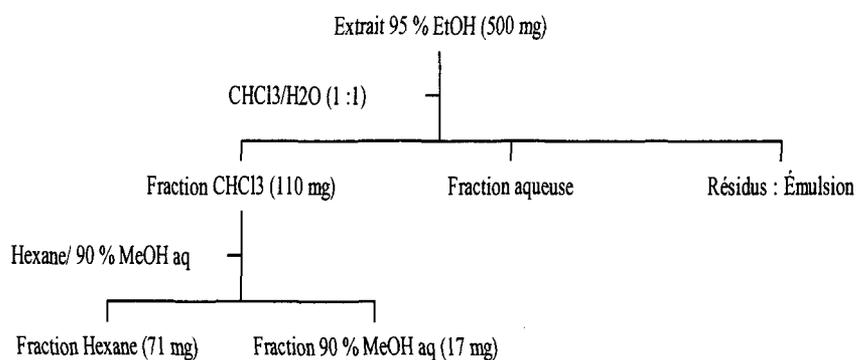


Figure 23 : Partition de l'extrait à l'ÉtOH de *Cladina stellaris*

Le fractionnement par le mélange $\text{CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$ résulte en l'obtention d'une faible proportion de composés solubles dans la phase organique. Il semble que les composés se retrouvent majoritairement dans la phase aqueuse et dans le résidu. La formation d'un précipité important et d'une émulsion est probablement responsable de la faible partition des composés de l'extrait dans la phase organique. Le fractionnement de la phase organique par le mélange Hexane/90 % MeOH aq. montre que la majeure partie des composés contenus dans la fraction CHCl_3 se retrouve dans l'hexane.

La Figure 24 représente la séparation obtenue par CCM suite à la partition dans le mélange $\text{CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$. L'éluion implique l'utilisation de l'éluant B : Hexane-diéthyléther-acide formique (13 : 8 : 2) et la révélation est effectuée avec le CAM (voir section 3.4).

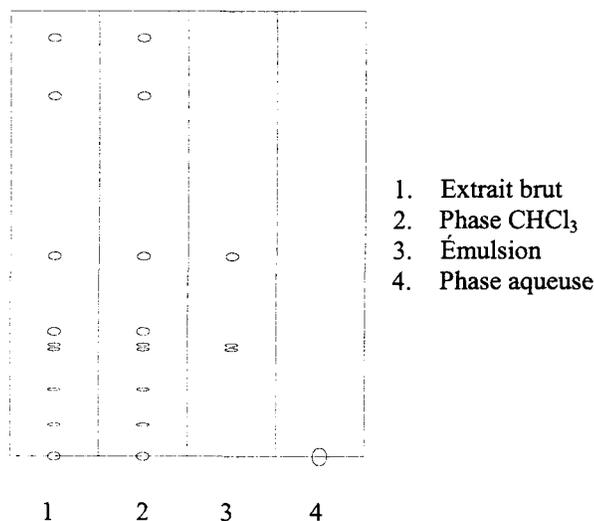


Figure 24 : Partition de l'extrait à l'EtOH dans le mélange $\text{CHCl}_3\text{-H}_2\text{O}$

La séparation correspond de gauche à droite à l'extrait brut (Figure 24, #1), à la phase organique (Figure 24, #2), aux composés solubles de l'émulsion (Figure 24, #3) et à la phase aqueuse (Figure 24, #4). La tache unique et diffuse pour la fraction aqueuse peut contenir plusieurs produits, probablement trop polaires pour être élués dans ces conditions. Tel que l'indique la Figure 24, les composés solubles de l'émulsion (Figure 24, #3) sont communs à la phase CHCl_3 . Cette observation confirme que l'émulsion a restreint la distribution des composés dans la phase organique.

La séparation de la phase organique après partition dans le mélange hexane-90 % MeOH aq. est représentée à la Figure 25. L'éluion implique également l'utilisation de l'éluant B et la révélation est effectuée avec la CAM (voir section 3.4).

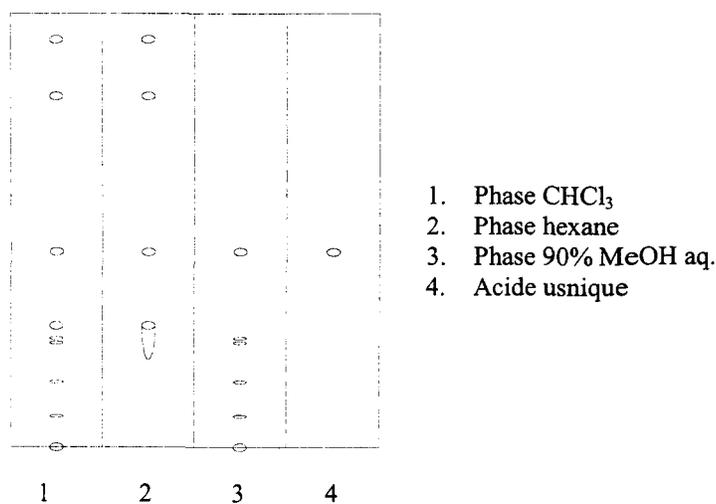


Figure 25 : Partition dans le mélange hexane-90 % MeOH aq.

Comme le montre la Figure 25, la partition de la fraction obtenue avec le CHCl_3 (Figure 25, #1) effectuée entre autre avec l'hexane (Figure 25, #2) et la solution 90 % MeOH aq. (Figure 25, #3) a permis de séparer davantage les composés fortement retenus de ceux faiblement retenus. L'acide usnique (**21**) (Figure 25, #4) est présent autant dans la phase hexane (Figure 25, #2), que dans la phase 90 % MeOH aq. (Figure 25, #3).

La fraction 90 % MeOH aq. a été analysée par HPLC sur le chromatographe Perkin Elmer, selon les conditions décrites à la section 3.8.4. Afin de procéder à l'identification des composés par leurs indices de rétention (RI) tel que décrit à la section 3.8.4, l'acide benzoïque et le bis-(2-éthylhexyl)phthalate ont été utilisés comme standards internes. Le Tableau 25 rapporte les données chromatographiques pour la fraction 90 % MeOH aq. tirées du chromatogramme présenté à l'annexe 7.

Tableau 25 : Données chromatographiques de l'extrait à la fraction 90 % MeOH aq

T_R (min)	RI	Abondance (%)	Composés
2.47	-0.36	4.9	Inconnu
2.71	-0.36	6.7	Inconnu
3.28	-0.35	4.0	Inconnu
13.13	-0.19	2.4	Inconnu
14.57	-0.16	5.1	Inconnu
23.09	-0.02	10.8	Inconnu
29.36	0.08	1.0	Inconnu
31.15	0.11	6.9	Inconnu
35.28	0.18	1.7	Inconnu
39.51	0.25	2.2	Inconnu
41.88	0.28	1.2	Inconnu
42.85	0.30	16.9	Inconnu
44.36	0.32	7.6	Inconnu
45.89	0.35	2.2	Inconnu
46.91	0.37	1.9	Inconnu
48.60	0.39	1.5	Inconnu
50.35	0.42	1.3	Inconnu
56.85	0.53	1.5	Inconnu
59.77	0.58	1.9	Inconnu
65.89	0.68	0.8	Inconnu
68.40	0.72	2.4	Inconnu
69.71	0.74	0.6	Inconnu
73.65	0.80	14.4	A. usnique

La présence de 23 produits abondants à plus de 0,5 % met en évidence la sous-estimation par GC-MS concernant la composition réelle de l'extrait à l'EtOH (voir Tableau 15). Puisque l'absorption des composés varie en fonction de la longueur d'onde utilisée pour la détection, l'abondance réelle ne peut être déterminée [27]. Il est intéressant de souligner que, selon la littérature, les extraits organiques de *Cladina stellaris* sont principalement composés d'acide usnique (21) et d'acide perlatolique (13). En fonction du chemotype rencontré, l'acide psoromique (20) et l'acide O-déméthylpsoromique peuvent aussi être observés [46,47,45]. Cette différence remarquable concernant la composition des extraits de *Cladina stellaris* peut être reliée au type d'extraction utilisé et à la formation de

nouveaux composés par éthanolyse, tel qu'il a été discuté à la section 4.4. Le nombre de composantes peut également être influencé par les conditions environnementales précédant l'extraction et l'origine des lichens [45,46,47,52,54].

L'analyse du standard d'acide usnique (**21**) dans les mêmes conditions a permis de confirmer sa présence dans la phase 90 % MeOH aq. Par ailleurs, il figure parmi les composés les plus abondants (14,4%), ce qui indique que la partition n'a pas très bien fonctionné, puisque ce composé (**21**) présente normalement une très faible solubilité dans le MeOH et dans l'eau [27]. Cependant, il est intéressant de souligner que l'acide usnique (**21**), selon l'analyse GC-MS de l'extrait à l'EtOH, est présent à plus de 40 % dans l'extrait brut (voir Tableau 15).

Aucun composé n'a pu être identifié selon la méthode des indices de rétention, en raison d'un écart important entre la valeur du RI obtenu pour l'acide usnique (**21**) (RI = 0,80) et celui rapporté par la littérature (RI = 0,74) [27,47]. Le pH de la phase mobile pourrait être en cause.

4.9. SÉPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE ÉCLAIR

La mise à l'essai de nombreuses conditions d'isolation par chromatographie éclair a conduit à l'isolation de l'acide usnique (**21**) chez *Cladina stellaris*, ainsi qu'à celle de deux composés chez *Cladina rangiferina*, soient l'éthylhaematommate (**8**) et le β -orcinolméthylcarboxylate (**5**). Ces composés ont été isolés selon les conditions décrites à la section 3.6.1. Chez *Cladina stellaris*, l'utilisation de l'éluant B : Hexane-diéthyléther-acide

formique (5 : 4 : 1) pour l'élution, semble avoir favorisé la séparation de l'acide usnique (21) des autres composés de l'extrait à l'hexane obtenu par Soxhlet fractionné. Par contre, ce mélange, qui contient de l'acide formique, est susceptible d'engendrer la dégradation de certains composés. C'est d'ailleurs ce qui semble s'être produit pour la séparation sur gel de silice des composantes de l'extrait au CHCl_3 de *Cladina rangiferina*. Contrairement aux résultats attendus, l'acide atranorique (14) étant le composé le plus abondant chez cette espèce, cette séparation a conduit à l'isolation du β -orcinolméthylcarboxylate (5) et de l'éthylhaematommate (8). Il est important de souligner que l'acide atranorique (14) a été détecté par CCM après la chromatographie éclair [46]. Ceci suggère qu'une hydrolyse partielle du depside (14), ait eu lieu pendant ce premier fractionnement, ce qui expliquerait la formation du β -orcinolméthylcarboxylate (5) et la détection de l'acide atranorique (14). En ce qui concerne l'éthylhaematommate (8), sa présence peut être difficilement attribuée à une réaction hydrolytique avec l'acide atranorique (14) dans ces conditions. En effet, la formation de ce dérivé nécessite que le clivage de l'ester se fasse en présence d'EtOH, tel qu'illustré à la Figure 26.

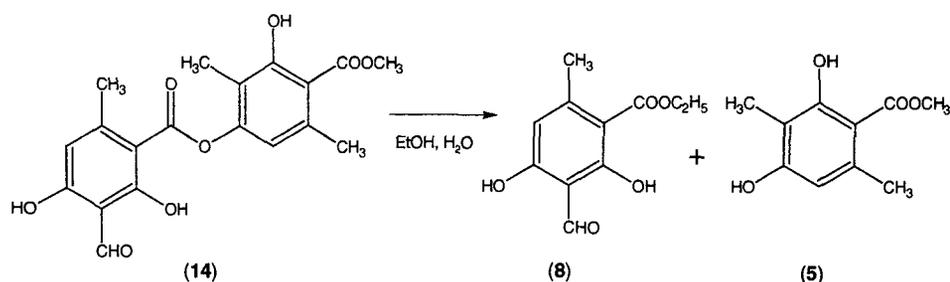


Figure 26 : Éthanolyses de l'acide atranorique (14)

La possibilité d'une contamination des solvants utilisés pour l'élution avec de l'EtOH, pourrait toujours expliquer la formation de l'éthylhaematommate (8), mais il peut tout aussi bien être le résultat de l'activité enzymatique chez ce lichen [54,94].

4.10. RMN DE L'ACIDE USNIQUE ISOLÉ CHEZ CLADINA STELLARIS

Tel que mentionné précédemment, l'acide usnique (21) a été isolé par chromatographie éclair (voir section 3.6.1), puis caractérisé par RMN (voir section 3.9). Les données RMN (^1H et ^{13}C à 300MHz) du produit isolé correspondent parfaitement à celle du standard Aldrich. Une assignation sommaire a tout de même été effectuée. Le Tableau 26 montre les signaux et les déplacements chimiques observés pour les spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé isolé. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C de l'acide usnique (21) sont présentés à l'annexe 4.

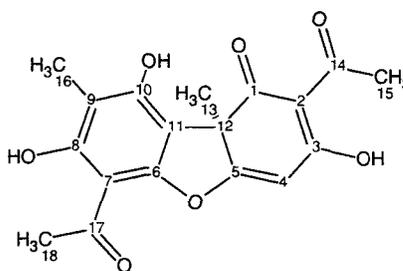


Figure 27 : Acide usnique (21)

Tableau 26 : Assignment des signaux observés en RMN ^1H et RMN ^{13}C de l'acide usnique

(21)

H	δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	C	δ (ppm)
H sur C ₄	5.66	1H	s	1	198.05
OH sur C ₈	13.31	1H	s	2	179.36
OH sur C ₁₀	11.05	1H	s	3	155.20
H sur C ₁₃	1.78	3H	s	4 et 6	98.30
H sur C ₁₅ et C ₁₈	2.68	3H	s	5	101.52
H sur C ₁₆	2.12	3H	s	7	109.33
				8	157.5
				9	103.94
				10	163.89
				11	105.23
				12	59.06
				13	27.83
				14	200.29
				15	32.09
				16	7.50
				17	201.74
				18	31.22

Il est à noter que la proton du groupement hydroxyle du carbone 3 n'est pas visible sur le spectre ^1H dans les conditions de l'analyse [115].

4.11. ANALYSE PAR RMN DES PRODUITS ISOLÉS CHEZ *CLADINA RANGIFERINA*

L'éthylhaematommate (8) et le β -orcinolméthylcarboxylate (5) isolés par chromatographies éclair, tel que décrit à la section 3.6.1, ont été identifiés à l'aide de la RMN. Afin de pouvoir assigner les signaux aux protons et aux carbones correspondants, la Figure 28 montre la structure avec les carbones numérotés pour les deux composés isolés. Les signaux RMN ^1H , RMN ^{13}C et du DEPT de l'éthylhaematommate (8) sont rapportés au Tableau 27. Les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C de ce produit sont présentés à l'annexe 4.

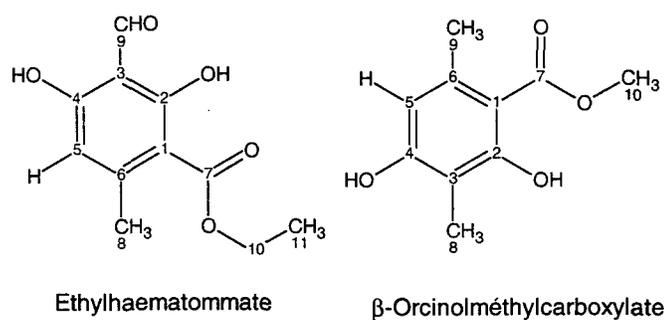


Figure 28 : Structure de l'éthylhaematommate (8) et du β -orcinolméthylcarboxylate (5)

Tableau 27 : Assignation des signaux observés en RMN ^1H et RMN ^{13}C de l'éthylhaematommate (8).

H	δ (ppm)	Intégration	J (Hz)	Multiplicité	C	δ calculé ^a (ppm)	δ observé (ppm)	C(Dept)
H sur C ₅	6.29	1H		s	1	108.1	108.87	C
H sur C ₈	2.54	3H		s	2	161.8	166.91	C
H sur C ₉	10.34	1H		s	3	104.1	104.36	C
H sur C ₁₀	4.45	2H	7.16	q	4	163.4	168.74	C
H sur C ₁₁	1.44	3H	7.12	t	5	109.6	112.45	CH
					6	146.7	152.8	C
					7	170.1	171.97	C
					8	23.0	25.66	CH ₃
					9	192.9	194.30	CH
					10	62.0	62.28	CH ₂
					11	15.0	14.56	CH ₃

^a Déplacements chimiques calculés avec le programme ACD/NMR spectrum.

Parmi les 13 signaux visibles sur le spectre RMN ^{13}C découplé, seulement 11 correspondent à la molécule soupçonnée. Le calcul des déplacements chimiques a permis d'assigner certains carbones, puisque les signaux relatifs au RMN ^{13}C ne sont pas rapportés. L'assignation des signaux observés en RMN ^1H a pu être confirmée par comparaison des signaux RMN ^1H de l'éthylhaematommate (8) rapportés par la littérature

[27]. Les signaux excédentaires peuvent être causés par la présence de trace de solvant. À partir du DEPT, il a été établi que la molécule était constituée de 6 carbones quaternaires, puis d'un méthylène et de 4 signaux pouvant être attribués à des CH₃ ou des CH. La nature aromatique de la molécule est évidente (signaux entre 108,87 et 152,80 ppm) et le signal observé à 194,50 ppm est caractéristique des aldéhydes aromatiques [97]. La présence de l'aldéhyde aromatique est validée par un signal à 10,34 ppm en RMN ¹H [97]. De plus, un signal typique des protons aromatiques (6,29 ppm) est présent sur le spectre RMN ¹H [97]. Le signal à 112 ppm observé en RMN ¹³C semble correspondre au carbone attaché à ce proton. Parmi les 6 carbones quaternaires un signal très déblindé à 171,97 ppm correspond à celui du carbonyle de l'ester (C₇) [97]. Finalement, la corrélation des constantes de couplage des hydrogènes sur le méthyle C₁₁ et sur le méthylène C₁₂ confirme leur voisinage.

En ce qui concerne le β-orsinolméthylcarboxylate (**5**), une analyse GC-MS dans les conditions décrites à la section 3.7.1. a d'abord permis d'identifier ce composé, qui d'ailleurs est retrouvé à 94 % dans les fractions obtenues suite à la séparation par chromatographie éclair (voir section 3.6.1). L'analyse RMN confirme l'identité de la molécule, soit le β-orsinolméthylcarboxylate (**5**), isolée par chromatographie éclair (voir section 4.9). Comme les données spectrales correspondent parfaitement à celles rapportées par la littérature, seule une assignation sommaire a été effectuée [27]. Le Tableau 28 présente les signaux RMN ¹H, RMN ¹³C et DEPT observés pour le β-orsinolméthylcarboxylate (**5**).

Tableau 28 : Assignation des signaux observés en RMN ^1H et RMN ^{13}C du β -orcinolméthylcarboxylate (5)

H	δ (ppm)	Intégration	Multiplicité	C	δ (ppm)
H sur C ₅	6.23	1H	s	1	105.58
H sur C ₈	2.47	3H	s	2	158.56
H sur C ₉	2.12	3H	s	3	108.99
H sur C ₁₀	3.94	3H	s	4	163.53
				5	110.98
				6	140.52
				7	173.02
				8	8.02
				9	24.46
				10	52.19

Les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C sont présentés à l'annexe 4. Les signaux excédentaires sur le spectre RMN ^{13}C sont attribuables à la présence de trace de solvant. De plus, les hydrogènes phénoliques ne sont pas visibles dans les conditions de l'analyse RMN ^1H [115].

4.12. ÉVALUATION DE L'EFFET SUR LA CROISSANCE CELLULAIRE (IC₅₀) D'EXTRAITS DE *CLADINA STELLARIS* ET *CLADINA RANGIFERINA*

En vue d'étudier le potentiel d'inhibition de la croissance cellulaire des extraits EtOH-H₂O, l'activité biologique a été évaluée par des tests de cytotoxicité *in vitro* tel que décrit à la section 3.10. L'effet sur la croissance cellulaire des trois mélanges EtOH-H₂O a été évalué sur la lignée MCF-7. Les résultats obtenus pour les extraits de *Cladina stellaris* sont présentés au Tableau 29.

Tableau 29 : Cytotoxicité des extraits EtOH-H₂O de *Cladina stellaris*.

Extrait	IC ₅₀ (µg/ml)	
	Hoechst	Résazurine
EtOH-H ₂ O (1:4)	> 100	> 100
EtOH-H ₂ O (1:1)	> 100	> 100
EtOH-H ₂ O (4:1)	74	100

Tel que rapporté au Tableau 29, seul l'extrait EtOH-H₂O (4 : 1), contenant 80 % d'EtOH, est actif. L'IC₅₀ obtenu avec le test de quantification de l'ADN (Hoechst) est inférieure à celui obtenu avec le test avec la résazurine. Il est possible que plusieurs cellules se soient détachées pendant l'élimination de la résazurine.

Selon l'analyse HPLC, cet extrait contient de l'acide usnique (**21**) (voir Tableau 23). La cytotoxicité de l'acide usnique (**21**) a déjà été démontrée sur trois lignées tumorales humaines [68]. Il pourrait être en partie responsable de l'effet observé, mais la sensibilité des MCF-7 à l'acide usnique (**21**) n'est pas rapportée. L'étude des polysaccharides retrouvés chez les lichens, incluant ceux étudiés, montre qu'ils peuvent être isolés à partir d'extraits obtenus avec 80 % d'EtOH [65]. Certains de ces polysaccharides sont connus pour leur potentiel antitumoral, tel que mis en évidence par les travaux de Nishikawa *et al* [64]. L'effet observé pourrait être aussi relié à la présence de ces sucres.

Les résultats obtenus suite à l'évaluation de la cytotoxicité des extraits de *Cladina rangiferina* sont rapportés au Tableau 30.

Tableau 30 : Cytotoxicité des extraits EtOH-H₂O de *Cladina rangiferina*

Extrait	IC ₅₀ (µg/ml)	
	Hoechst	Résazurine
EtOH-H ₂ O (1:4)	100	> 100
EtOH-H ₂ O (1:1)	> 100	> 100
EtOH-H ₂ O (4:1)	> 100	> 100

L'effet de trois extraits de *Cladina rangiferina* sur la croissance des cellules MCF-7 a été évalué. Les résultats montrent que seul l'extrait EtOH-H₂O (1 : 4) est actif. Aucun composé n'a été identifié dans cet extrait. Contrairement à celui de *Cladina stellaris*, aucun effet n'a été observé avec l'extrait EtOH-H₂O (4 : 1) de *Cladina rangiferina*, ce qui suggère que la lignée MCF-7 soit insensible aux polysaccharides.

Peu d'informations sur les composés solubles dans les mélanges EtOH-H₂O permettent de proposer quels pourraient être les composés responsables de l'activité, à l'exception de l'acide usnique (21) [40,45,47]. Un fractionnement par solubilité différentielle suivi de l'évaluation de l'IC₅₀ pour chaque fraction obtenue, permettrait tout d'abord de simplifier les composantes de ces extraits. Il serait ensuite possible d'isoler par HPLC semi-préparative les composés potentiellement actifs, pour finalement les identifier et évaluer leur activité individuellement.

L'évaluation du potentiel inhibiteur des extraits EtOH-H₂O sur la lignée MCF-7 révèle que les extraits aqueux sont susceptibles d'inhiber la croissance cellulaire. Par contre, le modèle cellulaire utilisé et la nature des extraits, qui sont très éloignés du milieu écologique, ne permettent pas de répondre à notre hypothèse. Pour ce faire, il faudrait

tester les extraits aqueux obtenus par macération dans l'eau, d'abord sur des culture *in vitro* de cellules d'épinette noire, puis sur des plants cultivés en serres. Il est encore trop tôt pour établir la relation allélopathique entre les lichens du genre *Cladina* et l'épinette noire. Pour y arriver, il faudra faire une caractérisation complète des composés hydrosolubles et la démonstration de leur activité sur différents systèmes se rapprochant du milieu naturel. Une isolation par HPLC semi-préparative assistée par l'évaluation de l'activité serait encore une fois une bonne stratégie pour conduire à l'identification des composés bioactifs [38,80,91,93].

D'après la revue de littérature, il demeure tout de même certaines évidences, qui faute de pouvoir affirmer que l'épinette noire subit l'action négative des métabolites secondaires des *Cladina*, ne permettent pas de l'écarter [22,23,28,29,30,68]. Il y a tout lieu de croire qu'il existe une corrélation entre l'activité des métabolites ou des extraits aqueux et la croissance végétale, d'autant plus que l'étude des mécanismes d'action possible, laisse entrevoir plusieurs voies susceptibles d'affecter le métabolisme des végétaux. D'abord, certaines substances semblent contrôler la perméabilité membranaire du partenaire photosynthétique, assurant ainsi la régulation métabolique du symbiote [27]. Ceci suggère que l'absorption au niveau des racines des plantes, puisse être perturbée en présence de ce type de modulateur. Cet effet pourrait avoir une répercussion sur le transport des éléments nutritifs. Outre l'absorption des nutriments, les métabolites pourraient affecter la production énergétique. Le β -orcinolméthylcarboxylate (5), un inhibiteur de la photosynthèse, agirait sur le transport électronique à travers les deux photosystèmes [29]. Les propriétés antioxydantes des depsides et depsidones [72], pourraient avoir un impact

sur la photosynthèse, le photosystème II étant constitué de β -carotène [14]. Finalement, l'acide usnique (**21**) pourrait intervenir sur la division cellulaire par perturbation de la synthèse d'ARN [70].

CHAPITRE 5
CONCLUSION

5.1. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

D'après la revue de la littérature, il semble que les lichens offrent une pléthore d'activités biologiques, tel que la cytotoxicité et la phytotoxicité. Le potentiel inhibiteur de la croissance cellulaire des métabolites secondaires et d'extraits aqueux provenant de divers lichens, dont ceux étudiés au cours de ce travail, a été démontré à plusieurs reprises. Plusieurs observations suggèrent que les *Cladina* pourraient avoir un impact négatif sur l'établissement des semis ou sur la croissance de l'épinette.

L'état d'avancement des connaissances sur les composés retrouvés chez les *Cladina* étant insuffisant pour aborder directement la problématique écologique, le cœur de ce travail a principalement porté sur la caractérisation des métabolites secondaires des deux espèces les plus répandues, soit *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina*. Pour ce faire, les composés ont d'abord été extraits des lichens par Soxhlet et par macération avec des solvants organiques et des mélanges de solvants, incluant l'eau. Puis, les composantes volatiles ont été obtenues par entraînement à la vapeur. Les meilleurs rendements ont été obtenus avec les solvants organiques mais ceux-ci diminuent considérablement lorsque l'eau est utilisée. En plus du type de solvant utilisé, les principaux facteurs pouvant faire varier la quantité de métabolites pourraient être liés aux conditions environnementales et à l'origine des lichens.

Les analyses par CCM, utilisées pour évaluer la composition des extraits, révèlent que la complexité des extraits de *Cladina stellaris* et *Cladina rangiferina* est peut-être sous-

estimée par la littérature. Par contre, certains facteurs susceptibles de modifier la composition réelle des extraits doivent être considérés. En effet, le type d'extraction, les produits de dégradation des composés des lichens, les conditions environnementales et l'origine géographique pourraient être responsables de cette divergence avec la littérature.

Les analyses par GC-MS ont permis d'identifier plusieurs composés obtenus par extraction dans les solvants organiques. La majorité des molécules identifiées sont de nature aromatique. La présence de plusieurs d'entre elles a été associée à une dégradation de depsides, tels que l'acide perlatolique (13) et l'acide atranorique (14), causées par les conditions chromatographiques utilisées. Les autres composés n'ont pu être identifiés en raison d'une trop faible volatilité. C'est probablement ce qui explique que les métabolites connus chez les espèces étudiées n'ont pu être détectés, à l'exception de l'acide usnique (21), retrouvé en abondance chez *Cladina stellaris*.

L'analyse par HPLC des composés hydrosolubles contenus dans les extraits EtOH-H₂O des deux espèces, a révélé une complexité insoupçonnée. L'identification des extractibles n'a pu être effectuée par cette méthode. L'analyse par HPLC a permis de contourner les problèmes des artefacts liés à la dégradation thermique et au manque de mobilité en conditions de chromatographie gazeuse, des composés en raison de leurs propriétés physico-chimiques. Il est sans aucun doute possible d'isoler de nouveaux composés par cette méthode. Les tentatives d'isolation par HPLC n'ont malheureusement pas conduit à l'isolation des composés des extraits EtOH-H₂O.

La séparation par chromatographie éclair a permis d'isoler l'acide usnique (21) chez *Cladina stellaris*, l'éthylhaematommate (8) et le β -orcinolméthylcarboxylate (5) chez *Cladina rangiferina*. Ce dernier composé semble être un produit de dégradation, formé au cours de la séparation. Le fractionnement par solubilité différentielle semble une bonne approche pour la séparation des composés polaires et des composés très peu polaires, mais ne permet pas d'obtenir une sélectivité suffisante pour séparer l'acide usnique (21).

Les essais effectués sur la lignée tumorale de carcinome mammaire (MCF-7), indiquent que l'effet inhibiteur sur la croissance cellulaire de l'extrait EtOH-H₂O de *Cladina stellaris* pourrait être relié à l'acide usnique (21), tel que rapporté dans la littérature. Cependant, la présence d'autres composés dans cet extrait doit être aussi considérée. En ce qui a trait à *Cladina rangiferina*, l'effet inhibiteur sur la croissance cellulaire réside dans la fraction susceptible de contenir les composés les plus hydrosolubles. Ces résultats mettent en relief le potentiel d'activité biologique des extraits aqueux, mais ne permettent pas d'extrapoler au niveau écologique en raison des différences trop importantes entre le modèle cellulaire utilisé et le monde végétal.

5.2. PERSPECTIVES FUTURES

Ce projet exploratoire, qui est né d'un besoin d'informations sur les lichens présents dans les pessières ouvertes, visait prioritairement l'identification des composés susceptibles d'être libérés dans le milieu naturel. C'est pourquoi une grande partie du travail a été consacrée à l'identification des composantes de ces lichens. Ces travaux

préliminaires montrent qu'il sera intéressant de poursuivre les études sur l'isolation et l'identification des composés hydrosolubles d'extraits de lichens afin de mieux comprendre leur rôle dans le milieu naturel ainsi que leur potentiel allélopathique.

À la lumière des résultats obtenus, l'extraction au Soxhlet, l'analyse par GC et l'isolation par chromatographie éclair ne sont pas les meilleures méthodes pour caractériser les composantes des *Cladina* ou de tout autre lichen. La labilité dont font preuve certains depsides nécessite des méthodes d'extraction d'une extrême douceur, comme le CO₂ supercritique ou la macération en milieu inerte (anhydre, atmosphère d'azote ou d'argon) afin de préserver l'intégrité des molécules. Le fractionnement et l'isolation par HPLC semi-préparative en phase inverse semblent être les approches les mieux adaptées aux composés polaires des lichens, puisque les étapes de purification peuvent être assistées par des tests d'activité biologique. Ainsi les efforts d'isolation seront consacrés aux composés susceptibles d'agir sur des modèles se rapprochant du milieu naturel, comme des cellules d'épinette noire mises en culture, des graines ou des plantules d'épinette. Il faudra aussi démontrer leur présence en quantité suffisante dans le sol. Finalement après ce long travail, l'interaction allélopathique, si présente, des lichens du genre *Cladina* avec l'épinette noire pourra être en partie élucidée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Ordre des Ingénieurs Forestier de Québec; 1997, Manuel de foresterie, Les presses de l'Université de Laval.
2. Foster, D. R.; 1985, Vegetation development following fire in *Picea mariana* (Black spruce)-Pleurozium forests of south-eastern Labrador, Canada, *Journal of Ecology*, 73, 517-534.
3. Viereck, L. A.; 1983, The effects of the fire in black spruce ecosystems of Alaska and Northern Canada. In: The role of fire in Northern Circumpolar ecosystems, John Wiley and Sons Ltd., pages 201-220.
4. Payette, S.; 1992, Fire as a controlling process in the north American boreal forest. In: A systems analysis of the global boreal forest, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 144-169.
5. St-Pierre, H.; Gagnon, R. & Bellefleur, P.; 1992, Régénération après feu de l'épinette noire (*Picea mariana*) et du pin gris (*Pinus banksiana*) dans la forêt boréale, Québec, *Canadian Journal of Forest Research*, 22, 474-481.
6. Riverin, S. & Gagnon, R.; 1996, Dynamique de la régénération d'une pessière à lichen dans la zone de la pessière noire à mousses, nord du Saguenay-Lac-St-Jean (Québec), *Canadian Journal of Forest Research*, 26, 1504-1509.
7. Morneau, C. & Payette, S.; 1988, Postfire lichen-spruce woodland recovery at the limit of the boreal forest in northern Quebec, *Canadian Journal of Botany*, 67, 2770-2782.

8. Treter, U.; 1995, Fire-induced succession of lichen-spruce woodland in Central Labrador-Ungava, Canada, *Phytocoenologia*, 25 (2), 161-183.
9. Cowles, S.; 1982, Preliminary result investigating the effect of lichen ground cover on the growth of black spruce, *Naturaliste Canadien*, 109, 573-581.
10. Kershaw, K. A.; & Rouse, W. R.; 1971, Studies on lichen-dominated systems. II. The growth pattern of *Cladonia alpestris* and *Cladonia rangiferina*, *Canadian Journal of Botany*, 49, 1401-1410.
11. Sirois, L. & Payette, S.; 1991, Reduced postfire tree regeneration along a boreal forest forest-tundra transect in Northern Quebec, *Ecology*, 72, 619-627
12. Gagnon, R *et al*; 1999, Nouvelles connaissances sur la dynamique naturelle des forêts d'épinette noire au Québec, *L'Aubelle*, 10-14.
13. Kershaw, K. A. & Field, G. F.; 1975, Studies on lichen-dominated system. XV. The temperature and humidity profiles in a *Cladonia alpestris* mat, *Canadian Journal of Botany*, 53, 2614-2620.
14. Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E.; 1992, Biology of plants, 5^e Édition, North Publishers, New York, 223 pages.
15. Molisch, H.; 1937, Der einfluss einer pflanze auf die andere-Allelopathie, Jena, 106 pages.

16. Fisher, R.F.; 1979, Possible allelopathic effects of reindeer-moss (Cladonia) on jack pine and white spruce, *Forest science*, 25 (2), 256-260.
17. Whittaker, R. H., & Feeney, P. P.; 1971, Allelochemics: Chemical interactions between species, *Science*, 171 (3973), 757-769.
18. Fisher, R. F.; 1980, Allelopathy: a potential cause of regeneration failure, *Society of American Foresters*, june, 346-350.
19. Muller, F. H.; 1980, Allelopathy, an update, *The Botanical Review*, 17-109
20. Chamber, K. L.; 1970, Biochemical Coevolution, Oregon State University Press, 117 pages.
21. Peterson, E. B.; 1965, Inhibition of black spruce primary roots by water-soluble substance in *Kalmia angustifolia*, *Forest science*, 11 (4), 473-478.
22. Arsenault, P.; 1978, Effets allélopathiques causés par des lichens fruticuleux terricoles sur *Picea mariana*, Thèse, Université de Laval, 215 pages.
23. Goldner, W. R.; Hoffman, F. M. & Medve, R. J.; 1985, Allelopathic effects of *Cladonia cristatella* on ectomycorrhizal fungi common to bitumous strip-mine spoils, *Canadian Journal of Botany*, 64, 1586-1590.
24. Brown, R. T. & Mikola, P.; 1974, The influence of fructicose soil lichens upon the mycorrhizae and seedling growth of forest trees, *Acta Forestalia Fennica*, 141, 1-22.

25. Ramaut, J. L. & Corvoisier, M.; **1975**, Effets inhibiteurs des extraits de *Cladonia impexa* Harm., *C. gracilis* (L.) Wild. et *Cornicularia muricata* (Ach.) Ach. sur la germination des graines de *Pinus sylvestris* L., *Oecologia Plantarum*, 10 (3), 295-299.
26. Huneck, S.; **1999**, The significance of lichens and their metabolites, *Naturwissenschaften*, 86, 559-570.
27. Huneck, S. & Yoshimura, I.; **1996**, Identification of lichen substances, Springer-Verlag, Berlin, 493 pages.
28. Dayan, F. E. & Romagni, J. G.; **2001**, Lichens as a potential source of pesticides, *Pesticide Outlook*, 229-232.
29. Rojas, I. S.; Lotina-Hennsen, B. & Mata, R.; **2000**, Effect of lichen metabolites on thylakoid electron transport and photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts, *Journal of Natural Products*, 63, 1395-1399.
30. Nishitoba, Y.; Nishimura, H.; Nishiyama, T. & Mizutani, J.; **1987**, Lichens acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*, *Phytochemistry*, 26 (12), 3181-3187.
31. Ouzilleau, J. & Payette, S.; **1975**, Croissance de quelques lichens à caribou du genre *Cladonia* (sous-genre *Cladina*) en milieu subarctique, Nouveau-Québec, *Naturaliste canadien*, 102, 597-602.
32. Brodo, I. M.; Sharnoff, S. D.; Sharnoff, S.; **2001**, Lichens of North America, Yale University Press, New Haven, 795 pages.

33. Thomson, J. W.; 1968, The lichen genus *Cladonia* in North America, University of Toronto Press, Toronto, 172 pages.
34. Culberson, C. F.; 1969, Chemical and botanical guide to lichen products, University of North Carolina Press, 628 pages.
35. Hammer, S.; 1997, Branching dynamics in *Cladina subtenuis*, *Mycologia*, 89 (3), 461-467.
36. Hale, M. E.; 1969, How to know the lichens , 2^e Édition, Wm. C. Brown Company Publishers, Dubuque, 246 pages.
37. Bruice, P. Y.; 1998, Organic Chemistry, 2^e Édition, Prentice Hall, New York, 1256 pages.
38. Stead, P.; Silva, G. I.; Lee, I. S.; Kinghorn, D. A.; & Wright, A. E.; 1998, Natural products isolation, (éd. Canell, R. J. P.); Humana Press, Totowa, 473 pages.
39. Bruneton, P.; 1999, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^e édition, Édition Médicales Internationales Cachan, France, 1120 pages.
40. Fahselt, D.; 1981, Lichen product of *Cladonia stellaris* and *C. rangiferina* maintained under artificial conditions, *Lichenologist*, 13 (1), 87-91.
41. Culberson, C. F. & Ahmadjian, V.; 1980, Artificial reestablishment of the lichens. II. Secondary products of resynthesized *Cladonia cristatella* and *Lecanora chrysoleuca*, *Mycologia*, 72, 90-109.

42. Fahselt, D.; 1994, Secondary biochemistry of lichens, *Symbiosis*, 16, 117-165.
43. Rowe, J. G.; Saenz, M. T.; Garcia, M. D. & Gil, A. M.; 1991, Nouvelle contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne et identification des substances lichéniques de quelques lichens de sud de l'Espagne, *Annales Pharmaceutiques françaises*, 49 (5), 278-285.
44. Culberson, C. F. & Elix, J. A.; 1989, Lichens Substances, *Methods in Plant Biochemistry*, 1, 309-535.
45. Huovinen, K.; 1985, Variation of lichen acids in *Cladina stellaris* and *Cladina rangiferina* in Finland and north Norway, *Acta Pharmaceutica Fennice*, 94, 113-123.
46. Huovinen, K. & Ahti, T.; 1986, The composition and contents of aromatic lichen substances in the genus *Cladina*, *Annales Botanica Fennici*, 23, 93-106.
47. Huovinen, K; Hiltunen, R. & Von Scharz, M.; 1985, A high performance liquid chromatographic method for the analysis of lichen compounds from the genera *Cladina* and *Cladonia*, *Acta Pharmaceutica Fennice*, 94, 99-112.
48. Huovinen, K. & Ahti, T.; 1982, Biosequential patterns for the formation of depsides, depsidones and dibenzofurans in the genus *Cladonia* (lichen-forming ascomycetes), *Annales Botanica Fennici*, 19, 225-234.

49. Heide, R.; Provatoroff, N.; Taas, P. C.; Valois, J.; Plasse, N.; Wobben, H. J. & Timmer, R.; **1975**, Qualitative analysis of the odoriferous fraction of oakmoss (*Evernia prunastri* (L.) Ach.), *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 23 (5), 950-957.
50. Nicollier, G. & Tabacchi, R; **1975**, Contribution to the knowledge of the chemical composition of oakmoss (*Evernia prunastri* (L.) Ach.), *Helvetica Chimica Acta*, 113, 384-387.
51. Gavin, J. & Tabacchi, R.; **1975**, Isolement et identification de composés phénoliques et monoterpéniques de la mousse de chêne (*Evernia prunastri* (L.) Ach.), *Helvetica Chimica Acta*, 58 (24), 190-194.
52. Culberson, C. F.; Culberson, W. L. & Johnson, A.; **1977**, Thermally induced chemical artifacts in lichens, *Phytochemistry*, 16, 127-130.
53. Guenther, E.; **1976**, The Essential Oils, IV, Krieger Publishing Company, Malabar, 700 pages.
54. Mirando, M. & Fahselt, D.; **1978**, The effects of thallus age and drying procedure on extractable lichen substances, *Canadian Journal of Botany*, 56, 1499-1504.
55. Elix, J. A.; **1984**, Recent progress in the chemistry of the lichen substances, *Progress in the chemistry of organic natural products*, 45c, 103-234.

56. Shibata, S. & Taguchi, H.; **1967**, Occurrence of isousnic acid in lichens with reference the "isodihydrousnic acid" derived from dihydrousnic acid, *Tetrahedron letters*, 48, 4867-4871.
57. Bruun, T.; **1954**, Triterpenoids in lichens. I. The occurrence of friedelin and epiFriedelinol, *Acta Chemica Scandinavica*, 8 (1), 71-75.
58. Lajide, L.; **1984**, Lichen depsides, depsidones and diphenylether: isolation, structure determination and synthesis, *Thèse*, Département de Chimie, Faculté des science, Australian National University, 226 pages.
59. Rezanka, t. & Dembitsky, V.; **1999**, Novel brominated lipidic compounds from the lichens of Central Asia, *Phytochemistry*, 51, 963-968.
60. Anderson, H. A.; Thomson, R. H. & Wells, J. W.; **1966**, Naturally occurring quinones. Part VIII. Solorinic acid and Norsolorinic acid, *Journal of Chemical Society*, 6 (534), 1727-1729.
61. Czeżuga, B.; **1994**, Carotenoids in certain lichens of Białowieża Forest, *Acta Societatis botanicorum*, 63 (1), 21-24.
62. Czeżuga, B. & Kristinnsson, H.; **1992**, Investigations on carotenoids in lichens. XXXIII. Carotenoids in lichens from heathland in Iceland, *Acta Botanica Islandica*, 11, 3-8.

63. Iacomini, M. & Scheider, C. L.; **1985**, Comparative studies on the polysaccharides of *Cladonia alpestris* (Reindeer moss), *Cladonia confusa*, and *Cladonia amaurocraea*, *Carbohydrates Research*, 142, 237-251.
64. Nishikawa, Y.; Ohki, K.; Takashi, K.; Kurono, G.; Fukuoka, F. & Emori, M.; **1974**, Studies on the water soluble constituents of lichens. II. Antitumor polysaccharides of *Lasallia*, *Usnea* and *Cladonia* species, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 22 (11), 2692-2702.
65. Pueyo, G.; **1965**, Polyalcools chez *Cladonia rangiferina* (L.) Web., *The Bryologist*, 68, 334-336.
66. Olafsdottir, E. S. & Ingolfsdottir, K.; **2000**, Polysaccharides from lichens: Structural characteristics and biological activity, *Planta medica*, 67, 199-208.
67. Kumar, S. K. C. & Muller, K.; **1999**, Lichen metabolites. I. Inhibitory action against leukotriene B4 biosynthesis by a non-redox mechanism, *Journal of Natural Products*, 62, 817-820.
68. Cardarelli, M.; Serino, G.; Campanella, L.; Ercole, P.; Nardone, F.; Alesiani, O. & Rossiello, F.; **1997**, Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53, 667-672.
69. Kupchan, M. & Kopperman, H.; **1975**, 1-Usnic acid: Tumor inhibitors isolated from lichens, *Experientia*, 31 (6), 625-752.

70. Al-Bekairi, A. M. & Qureshi, S.; **1991**, Mitodepressive Clastogenic and biochemical effects of (+)-usnic acid in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, 33, 217-220.
71. Kumar, S. K. C. & Muller, K.; **1999**, Lichen metabolites. II. Antiproliferative and cytotoxic activity of gyrophoric, usnic, and diffractaic acid on human keratinocyte growth, *Journal of Natural Products*, 62, 821-823.
72. Hidalgo, M. E.; Fernandez, E.; Quilhot, W. & Lissi, E.; **1994**, Antioxydant activity of depsides and depsidones, *Phytochemistry*, 37 (6), 1585-1587.
73. Yamamoto, Y.; Miura, Y.; Kinoshita, Y.; Higuchi, M.; Yamada, Y.; Murakami, A.; Ohigashi, H. & Koshimizu, K.; **1995**, Screening of tissue cultures and thalli of lichens and some of their active constituents for inhibition of tumor promoter-induced Epstein-barr virus activation, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 43 (8), 1388-1390.
74. Li, C. Y.; Lu, K. C.; Trappe, J. M. & Bollen, W. B.; **1970**, Separation of phenolic compounds in alkali hydrolysates of a forest soil by thin-layer chromatography, *Canadian Journal of Soil Science*, 50, 458-460.
75. Li, C. Y.; **1974**, Phenolic compounds in understory species of alder, conifer, and mixed alder-conifer stands of coastal Oregon, *Lloydia*, 37 (4), 603-607.
76. Wiliams, R. D. & Hoagland, R. E.; **1982**, The effects of naturally occurring phenolic compounds on seed germination, *Weed Science*, 30, 206-210.

77. Glass, A. D. M.; 1973, Influence of phenolic acids on ion uptake. 1. Inhibition of phosphate uptake, *Plant physiology*, 51, 1037-1041.
78. Culberson, C. F.; 1972, Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method, *Journal of Chromatography*, 72, 113-125.
79. Culberson, C. F. & Kristinsson, H.; 1970, A standardized method for the identification of the lichen products, *Journal of Chromatography*, 46, 85-93.
80. Hui, Y. H.; Rupprecht, J. K.; Liu, Y. M.; Anderson, J. E.; Smith, D. L.; Chang, C. J. & McLaughlin; 1989, Bullatacin and bullatacinone: two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*, *Journal of Natural Products*, 52, 463.
81. Bertsch, W.; Jennings, W. G. & Kaiser, R. E.; 1987, Capillary gas chromatography in essential oil analysis, Huethig Verlag, New York, 435 pages.
82. Lee, M. L.; Yang, F. J. & Bartle, K. D.; 1984, Open tubular column gas chromatography, theory and practice, John Wiley & Sons, New York, 445 pages.
83. Rouessac, F. & Rouessac, A.; 1997, Analyse chimique, Méthodes et techniques instrumentales modernes, 3^e édition, Masson, Paris, 372 pages.
84. Adams, R. P.; 2001, Interpretation of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectra, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 456 pages.

85. Strack, D.; Feige, G. B. & Kroll, R.; **1979**, Screening of aromatic secondary lichen substances by high performance liquid chromatography, *Zeitschrift Naturforschung*, 34c, 695-698.
86. Gonzalez, A. G.; Barrera, J. B.; Perez, E. & Padron, C. E. H.; **1991**, Chemical constituents of the lichen *Cladina macaronesica*, *Zeitschrift Naturforschung*, 46c, 12-18.
87. Houghton, P. J.; **2000**, Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. Review article, *Phytotherapy Research*, 14, 419-423.
88. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S. & Boyd, M. R.; **1990**, New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *Journal of National Cancer Institute*, 82 (13), 1107.
89. Dhar, S.; Nygren, P.; Csoka, K.; Botling, J.; Nilsson, K. & Larsson, R.; **1996**, Anti-cancer drug characterisation using a human cell lines panel representing defined types of drug resistance, *British Journal of Cancer*, 74, 888-896.
90. Rat, P.; Korwin-Zmijowska, C.; Warnet, J. M & Adolphe, M.; **1994**, New fluorimetric microtitration assays for toxicological screening of drugs, *Cell Biology and Toxicology*, 10, 329-337.
91. Richards, W. L.; Song, M. K.; Krutzch, H.; Evarts, R. P.; Marsden, E. & Thorgeirsson, S. S.; **1985**, Measurement of cell proliferation in microculture using Hoechst 33342 for

- semiautomated microfluorimetric determination of chromatin DNA, *Experimental Cell Research*, 159, 235-246.
92. Legault, J.; Dahl, W.; Pichette, A.; Debiton, E. & Madelmont, J. C.; **2002**, Anticancer activity of the essential oil of *Abies balsamea*: Gluthathione depletion as possible mechanism of cytotoxicity, *Planta medica*, Article à publier.
93. Maier, A.; Maul, C.; Erlin, M.; Sattler, I.; Grabley, S. & Thiericke, R.; **1999**, Biomolecular-chemical screening , a novel approach for the discovery of biological active secondary metabolites. I. Screening strategy and validation, *Journal of Antibiotics*, 52 (11), 945-951.
94. Schultz, J. & Mosbach, K.; **1971**, Studies on lichen enzymes. Purification and properties of an orcellinate depside hydrolase obtained from *Lassallia pustulata*, *Journal of European Biochemistry*, 22, 153-157.
95. Stephenson, N. L. & Rundel, P. W.; **1979**, Quantitative variation and the ecological role of vulpinic acid and atranorin in the thallus of *Letharia vulpina*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 7, 263-267.
96. Lambert, J. B.; Shurvell, H. F.; Lihtner, D. A. & Cooks, R. G.; **1998**, Organic structural spectroscopy, Prentice Hall, Upper Saddle River, 568 pages.

97. Silverstein, M. R.; Morill, T. C. & Basler, G. C.; **1998**, Identification spectrophotométrique de composés organiques, 5^e édition, De Boeck Université, Paris, 420 pages.
98. McLafferty, F. W.; **1980**, Interpretation of mass spectra, 3^e édition, University Science Books, Mill Valley, 303 pages.
99. Budzikiewicz, H.; **1992**, Mass spectrometry of organic compounds, UMI, Bell & Howell Information Company, Michigan, 689 pages.
100. Sydow, E.; **1963**, Mass spectrometry of terpenes. II. Monoterpene alcohols, *Acta Chemica Scandinavica*, 17(9), 2504-2512.
101. Huneck, S.; Djerassi, C.; Becher, D.; Barber, M.; Von Ardenne, M.; Steinfelder, K. & Tümmler, R.; **1967**, Flechteninhaltsstoffe-XXXI. Massenspektrometrie und anwendung auf strukturelle und stereochemische probleme.CXXXIII. Massenspektrometrie von depsiden, depsidonen, depsonen, dibenzofuranen und diphenylbutadienen mit positiven und negativen ionen, *Tetrahedron*, 24, 2707-2755.
102. Huneck, S.; Schreiber, K. & Sundholm, G.; **1980**, Ovosäure, ein neues tridepsid aus der flechte *Parmelia substygia*, *Phytochemistry*, 19, 885-887.
103. Nicollier, G. & Tabacchi, R.; **1979**, Triterpènes de la «mousse de chêne» (*Evernia prunastri* (L.) Ach.), *Helvetica Chimica Acta*, 62 (81), 807-810.

104. Quilhot, W.; Didyk, B.; Gambaro, V. & Garbarino, J. A.; **1983**, Studies on Chilean lichens. VI. Depsidones from *Erioderma chilense*, *Journal of Natural Products*, 46 (6), 942-943.
105. Santesson, J.; **1969**, Chemical studies on lichens. 10. Mass spectrometry of lichens, *Arkiv for Kemi*, 30, 363-377.
106. Hites, R. A.; **1985**, Mass spectra of environmental contaminants, CRC Press, Boca Raton, 433 pages.
107. Ryphage, R. & Sydow, E.; **1963**, Mass spectrometry of terpenes. I. Monoterpene hydrocarbons, *Acta Chemica Scandinavica*, 17 (7), 2025-2035.
108. Honkanen, E. & Moisio, T.; **1963**, Mass spectra of seven isomeric hexen-1-ols, *Acta Chemica Scandinavica*, 17 (7), 2051-2054.
109. Solberg, Y.; **1986**, Chemical constituents of the lichen species *Cetraria islandica*, *Journal of Hattori Botanical Laboratory*, 60, 391-406.
110. Rycroft, D. S.; Cole, J. W.; Aslam, N.; Lamont, Y. M. & Gabriel, R.; **1999**, Killarniensolide, methyl orsellinates and 9,10-dihydrophenanthrenes from the liverwort *Plagiochila killarniensis* from Scotland and the Azores, *Phytochemistry*, 50, 1167-1173
111. Rycroft, D. S.; Cole, W. J. & Rong, S.; **1997**, Highly oxygenated naphthalenes and acetophenones from the liverwort *Adelanthus decipiens* from the British Isles and South America, *Phytochemistry*, 48 (8), 1351-1356.

112. Tabacchi, R. & Nicollier, G.; **1975**, Contribution to the knowledge of the chemical composition of oakmoss (*Evernia prunastri* (L.) Ach), *Journal of American Chemical Society*, 384-387.
113. Brown, D. H.; Hawksworth, D. L. & Bailey, R. H.; **1976**, Lichenology : Progress and problems, Academic press, London, 551 pages.
114. Ernst-Russell, M. A.; Chai, C. L.; Wardlaw, J. H. & Elix, J. A.; **2000**, Euplectin and coneuplectin, new naphthopyrones from the lichen *Flavoparmelia euplecta*, *Journal of Natural Products*, 63, 129-131.
115. Günther, H; **1992**, La spectroscopie de RMN, 2^e tirage, Masson, Paris, 557 pages.

ANNEXE 1

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	<u>a</u> cide <u>d</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
Aq	aqueux
CAM	<u>m</u> olybdate d' <u>a</u> mmonium <u>c</u> érique
CaOCl	hypochlorure de calcium
CCM	<u>c</u> hromatographie sur <u>c</u> ouche <u>m</u> ince
CDCl ₃	chloroforme deutéré
CHCl ₃	chloroforme
DCM	<u>d</u> ichloro <u>m</u> éthane
DMSO	<u>s</u> ulfo <u>x</u> ide de <u>d</u> iméthyle
EI	<u>i</u> onisation <u>é</u> lectronique
EtOAc	<u>a</u> cétate d' <u>é</u> thyle
EtOH	éthanol
GC	<u>c</u> hromatographie gazeuse
HPLC	<u>c</u> hromatographie <u>l</u> iquide <u>h</u> aute performance
Ho	hoechst 33342
H ₂ O	eau
H ₂ SO ₄	acide sulfurique
IC ₅₀	<u>c</u> oncentration <u>i</u> nhibant <u>50</u> % de la croissance cellulaire
KOH	hydroxyde de potassium
MeOH	méthanol
MoO ₄ (NH ₄) ₂	molybdate d'ammonium
PD	para-phénylène <u>d</u> iamine
MS	<u>s</u> pectrométrie de <u>m</u> asse
Na ₂ SO ₄	sulfate de sodium
Nd	<u>n</u> on <u>d</u> isponible
Rz	<u>r</u> ésaz <u>u</u> rine
R _f	<u>f</u> acteur de <u>r</u> étention
RI	<u>i</u> ndice de <u>r</u> étention
RMN	<u>r</u> ésonance <u>m</u> agnétique <u>n</u> ucléaire

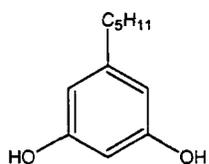
T_R	temps de rétention
UV	ultraviolet

Abréviation pour la RMN

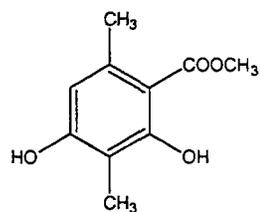
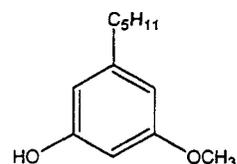
δ	déplacement chimique
J	constante de couplage
s	singulet
t	triplet
C	carbone quaternaire
CH	méthène
CH ₂	méthylène
CH ₃	méthyle

ANNEXE 2

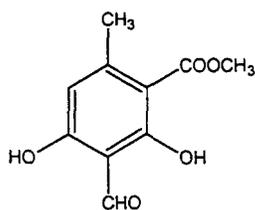
STRUCTURES DES COMPOSÉS IDENTIFIÉS EN GC-MS



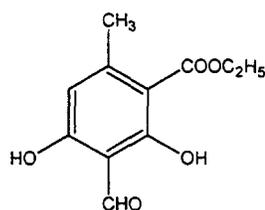
Olivétol (3)

 β -orninolméthylcarboxylate (5)

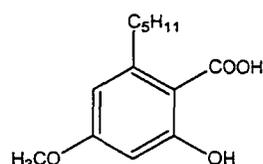
Olivétolmonométhyléther (6)



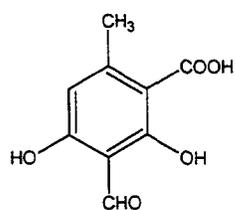
Méthylhaematommate (7)



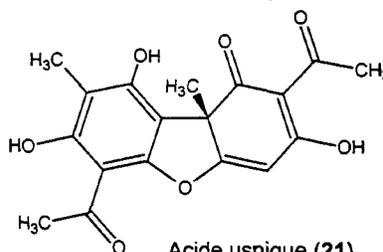
Ethylhaematommate (8)



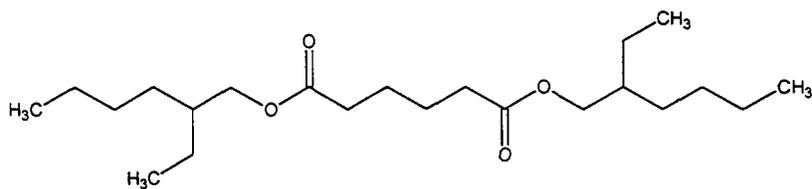
Ac. 4-O-méthylolivétolcarboxylique (9)



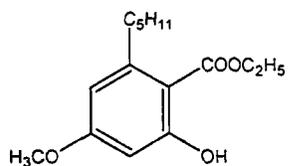
Acide haematommique (11)



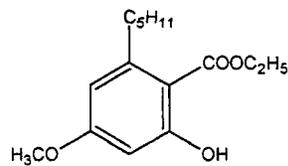
Acide usnique (21)



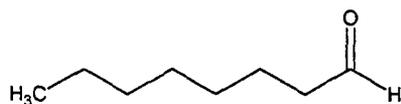
bis-(2-éthylhexyl)adipate (26)



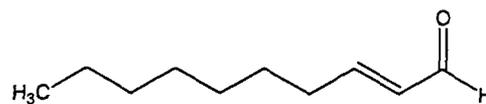
Acide olivétolcarboxylique (29)



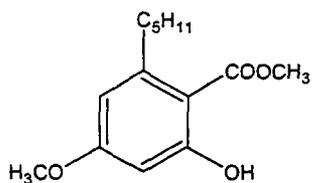
4-O-méthylolivétoléthylcarboxylate (31)



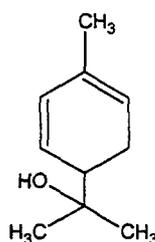
Nonanal (36)



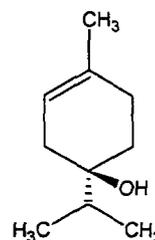
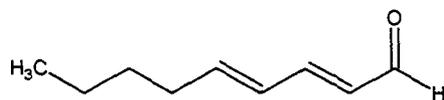
Décénal (37)



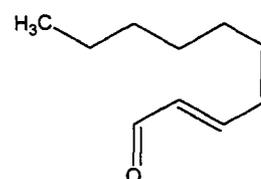
4-O-méthylolivétolméthylcarboxylate (39)



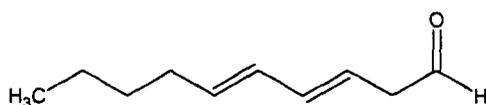
mentha-1,5-diène-8-ol (48)

 α -terpinéol (49)

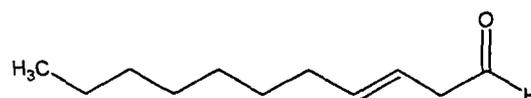
2,4-nonadiénal (50)



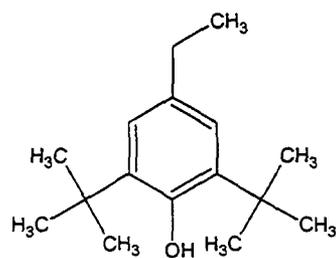
(E,Z)-2,4-décadiénal (51)



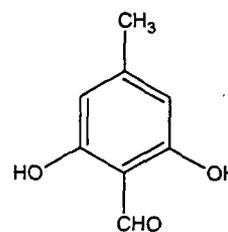
(E,E)-2,4-décadiénal (53)



2-undécénal (55)



2,6-Di-tert-butyl-4-éthylphénol (57)

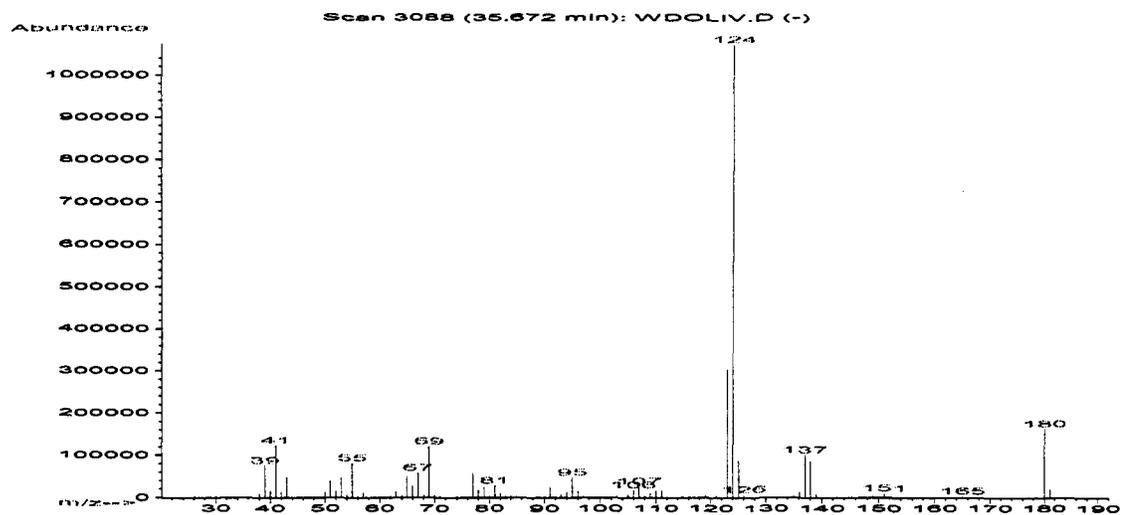


2,6-dihydroxy-4-méthyl-benzaldéhyde (59)

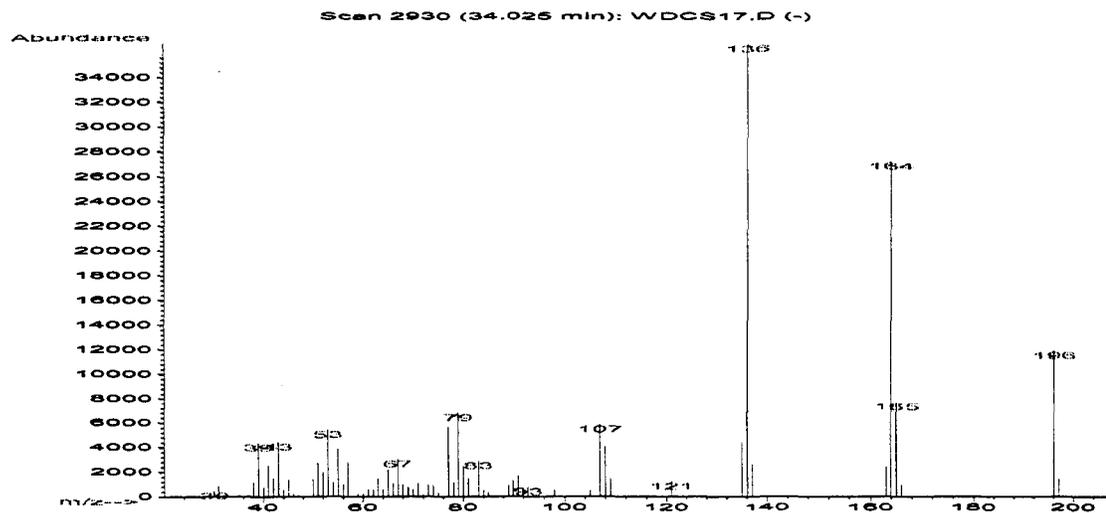
ANNEXE 3

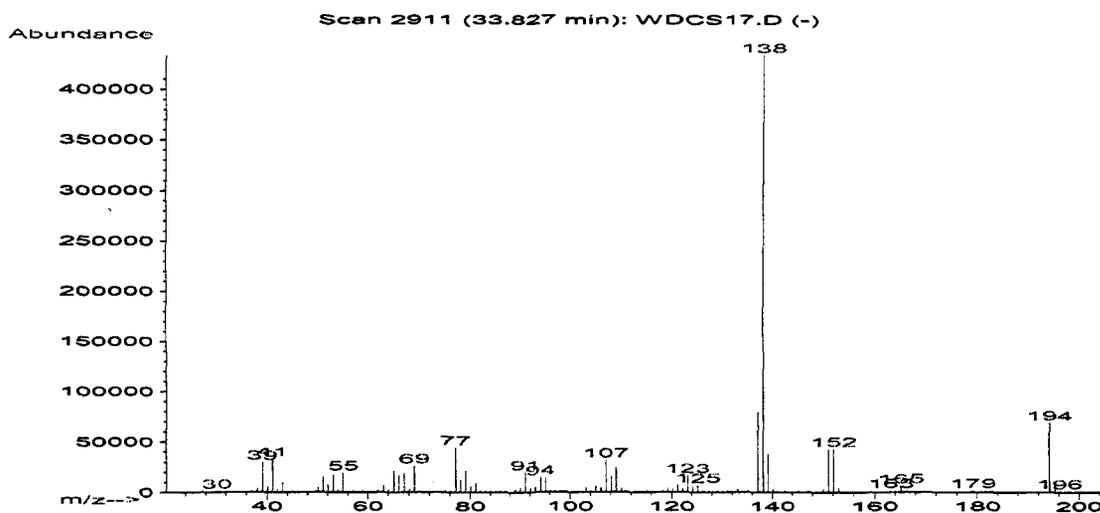
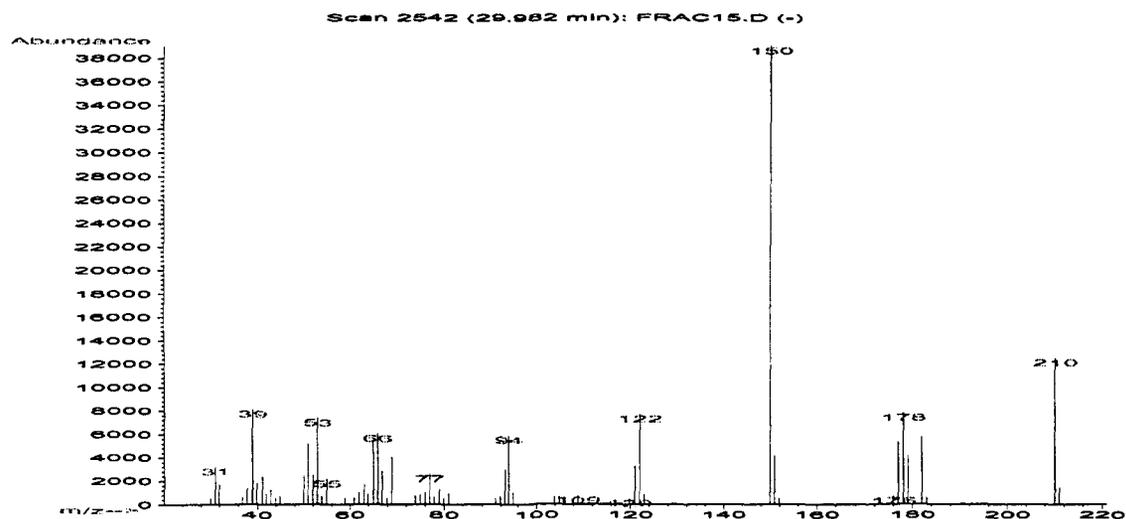
SPECTRES DE MASSE DES COMPOSÉS

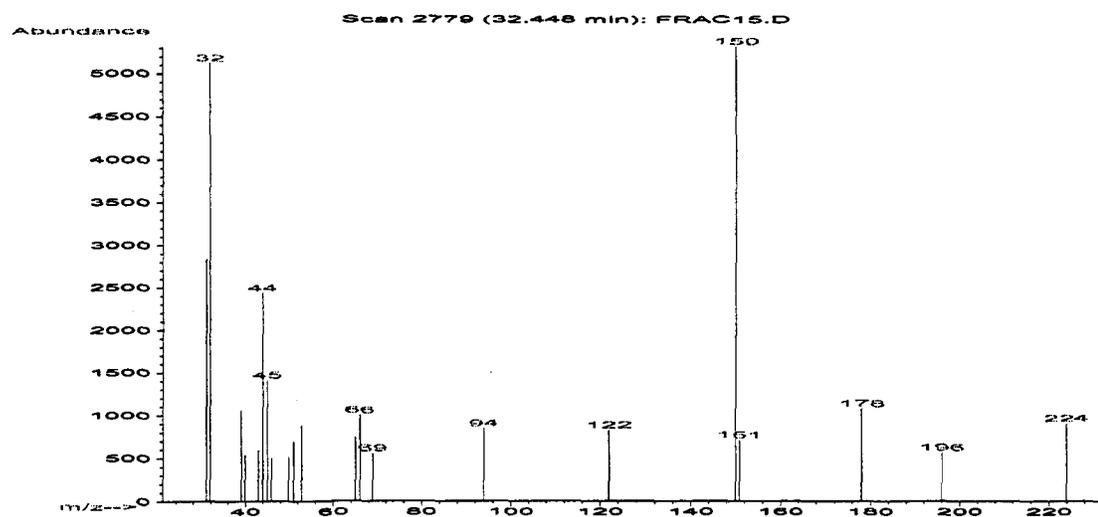
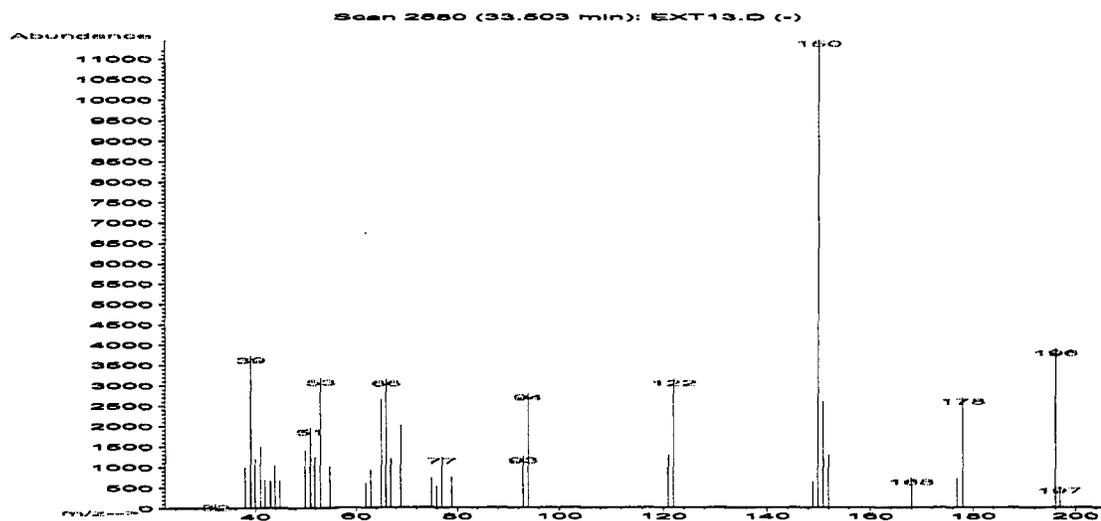
Olivétol (3)

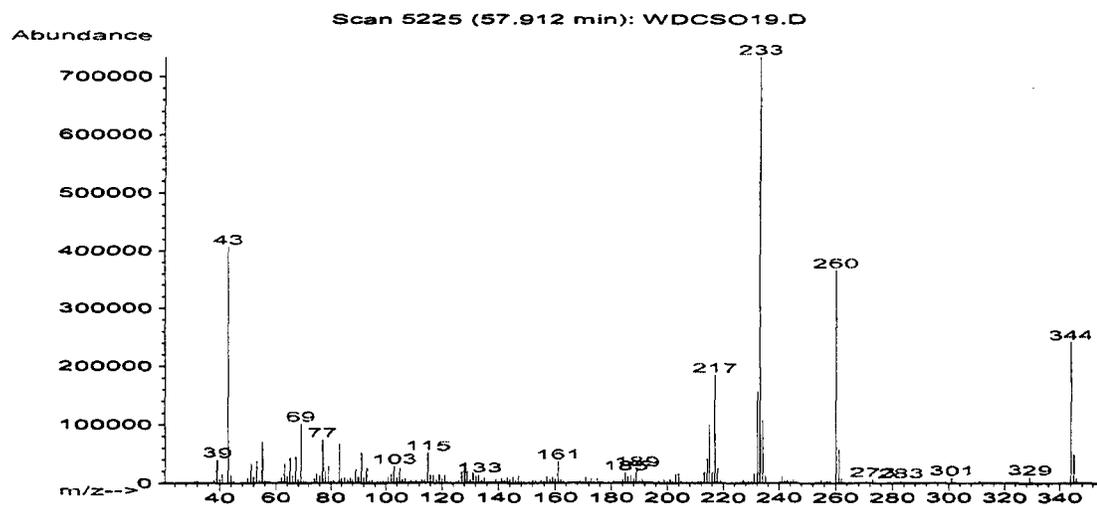
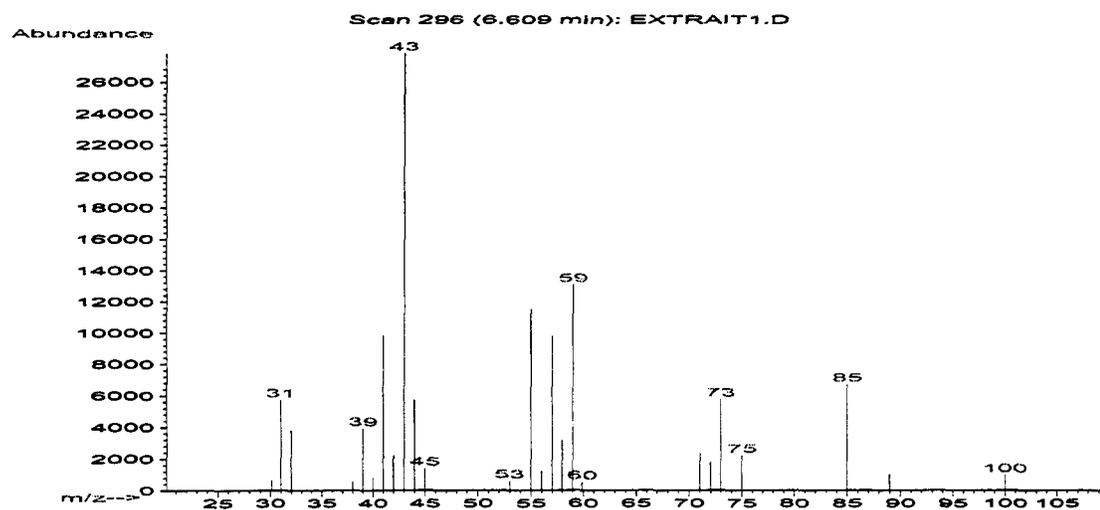


β -orcinolméthylcarboxylate (5)

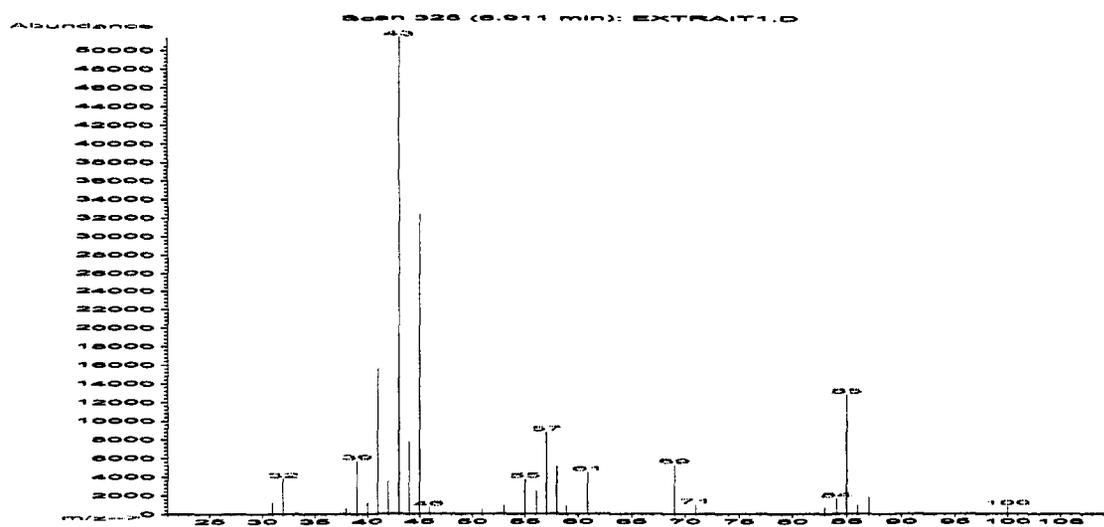


Olivétolmonométhyléther (6)**Méthylhaematommate(7)**

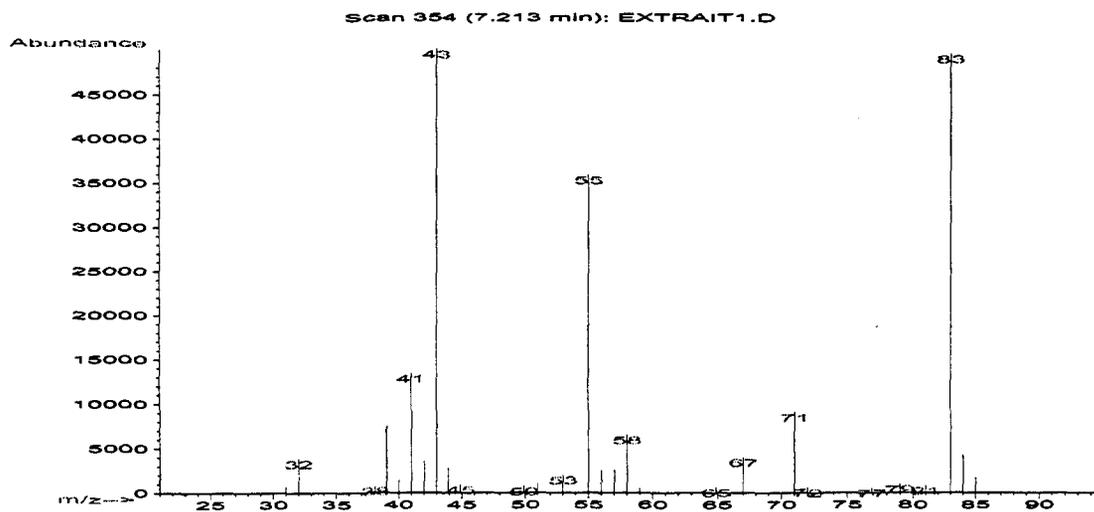
Éthylhaematommate (8)**Acide haematommique (11)**

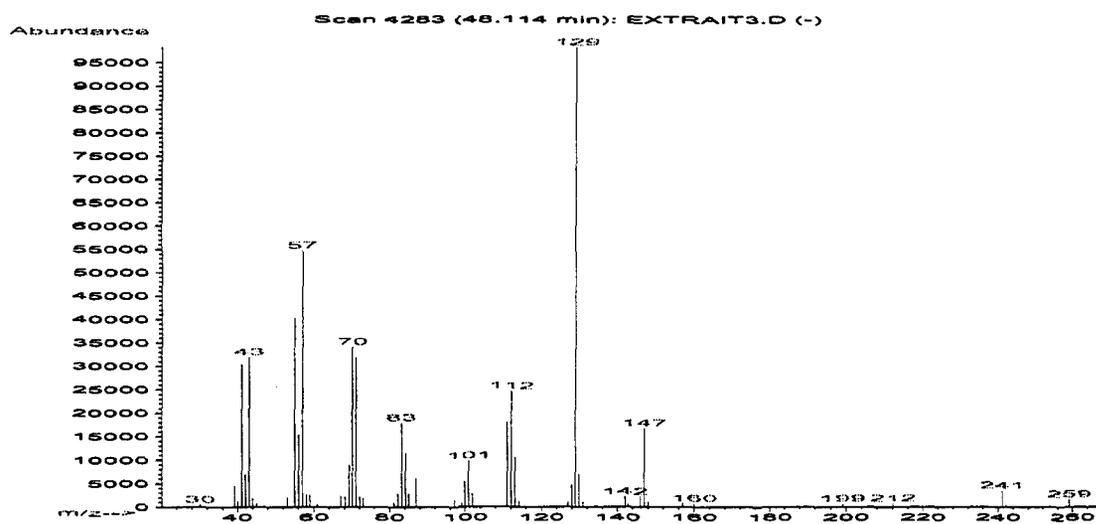
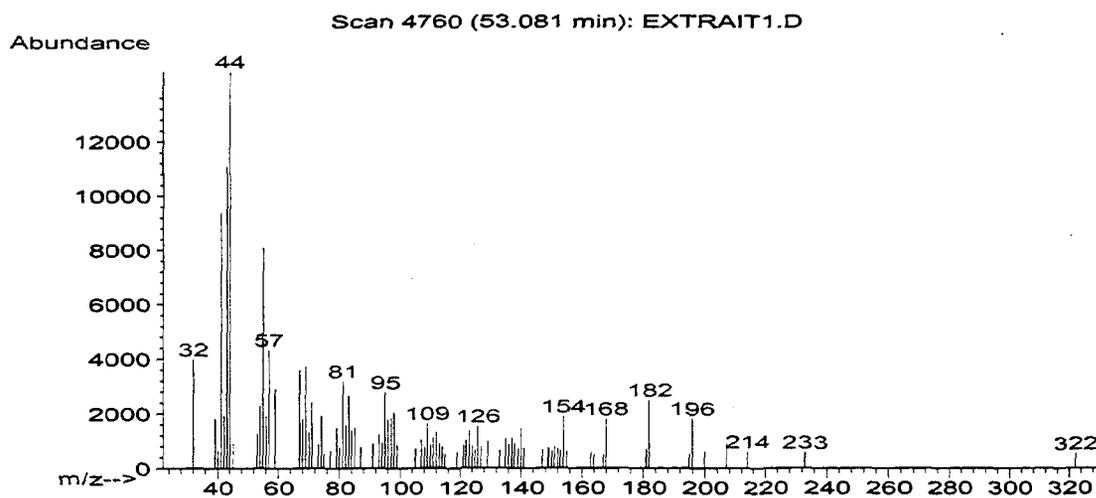
Acide usnique (21)**Hydrocarbure oxygéné (23)**

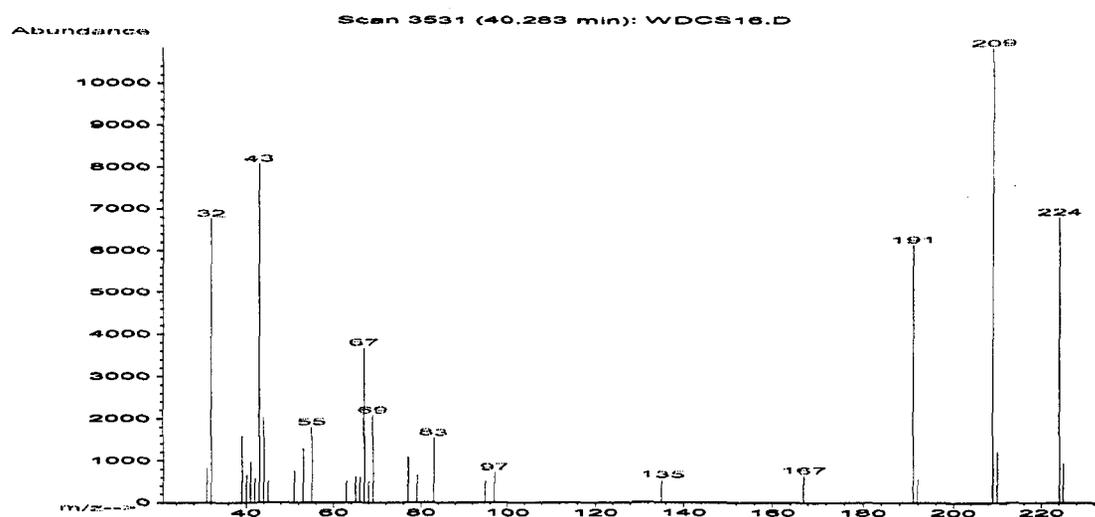
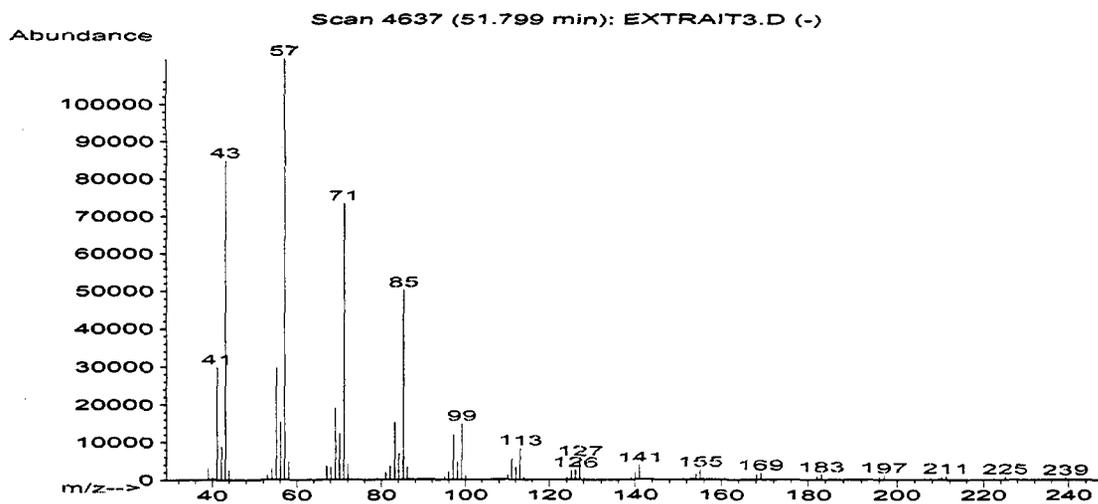
Hydrocarbure oxygéné (24)

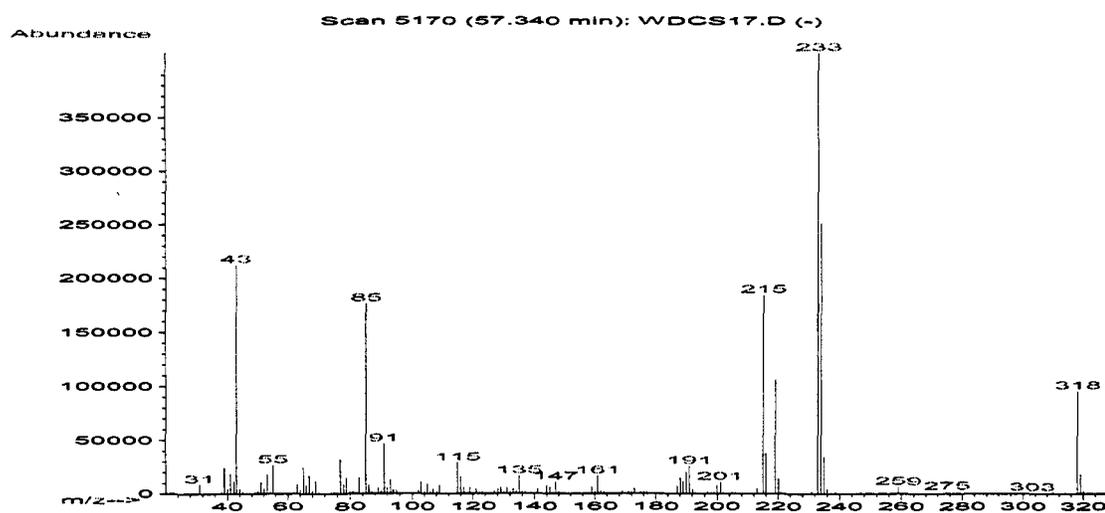
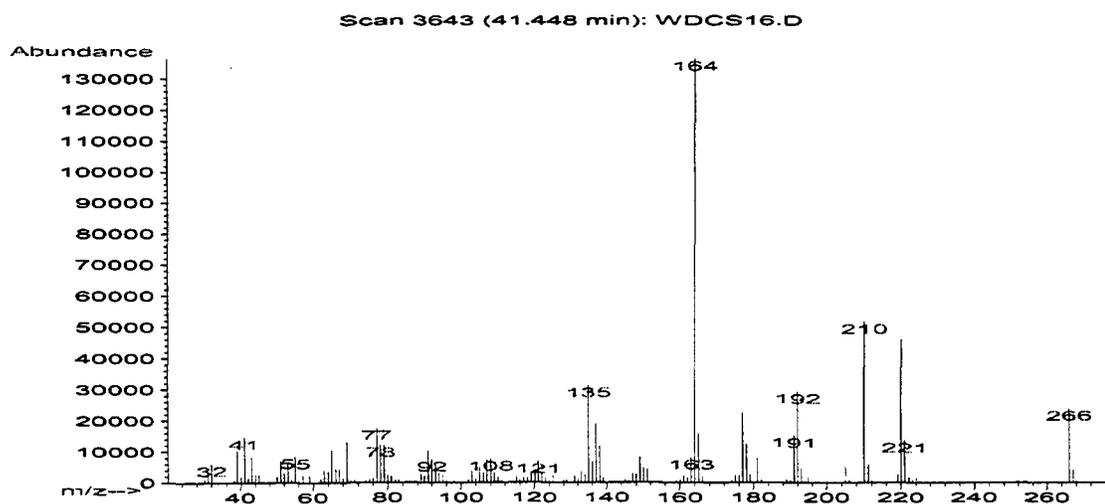


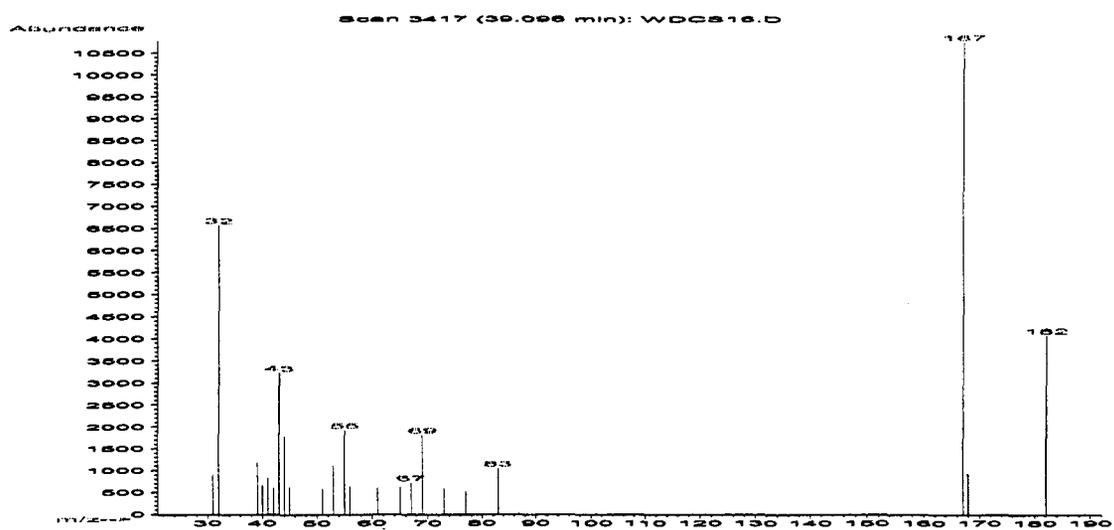
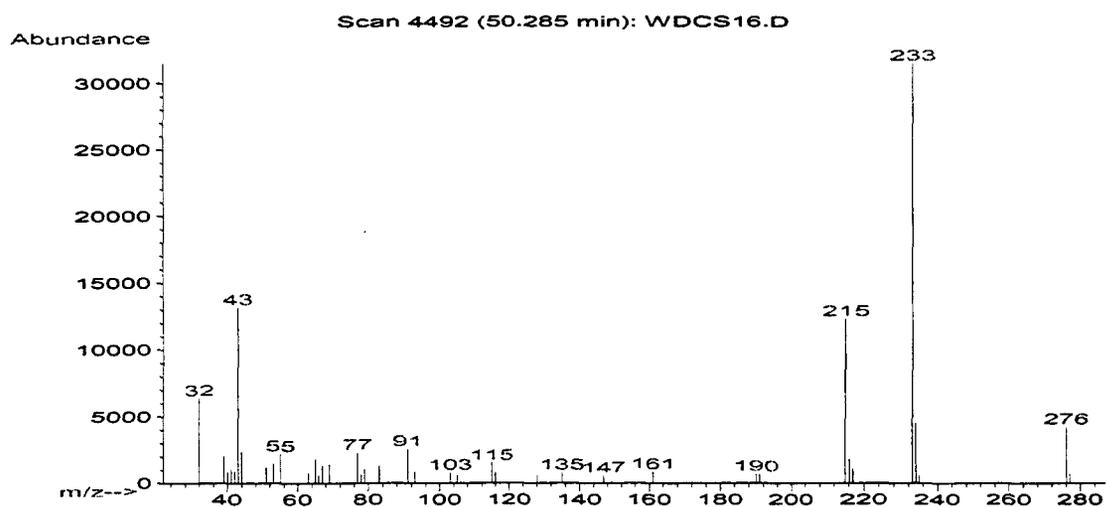
Hydrocarbure oxygéné (25)



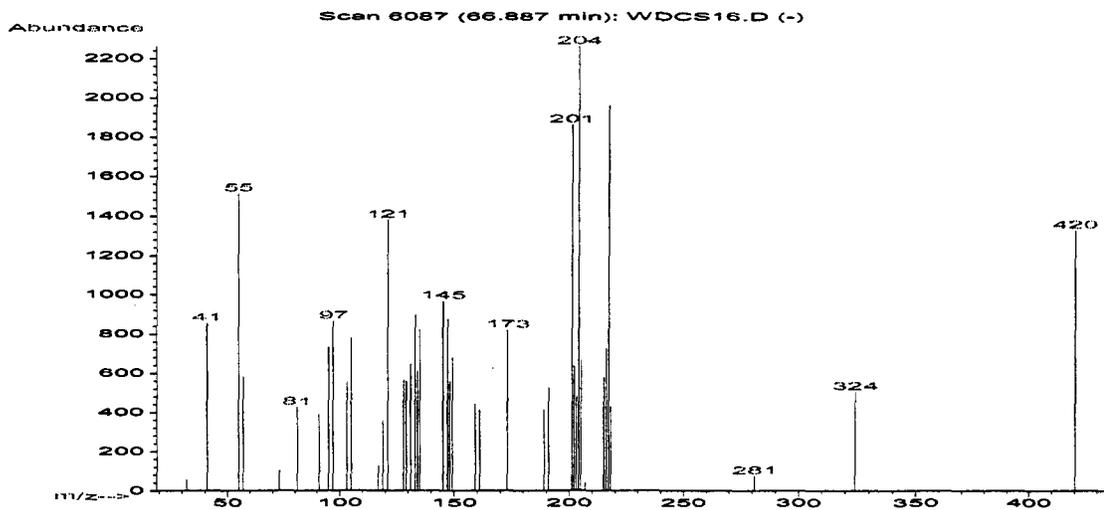
bis-(2-éthylhexyl)adipate (26)**Inconnu (27)**

Acide olivétolcarboxylique (28)**Hydrocarbure (29)**

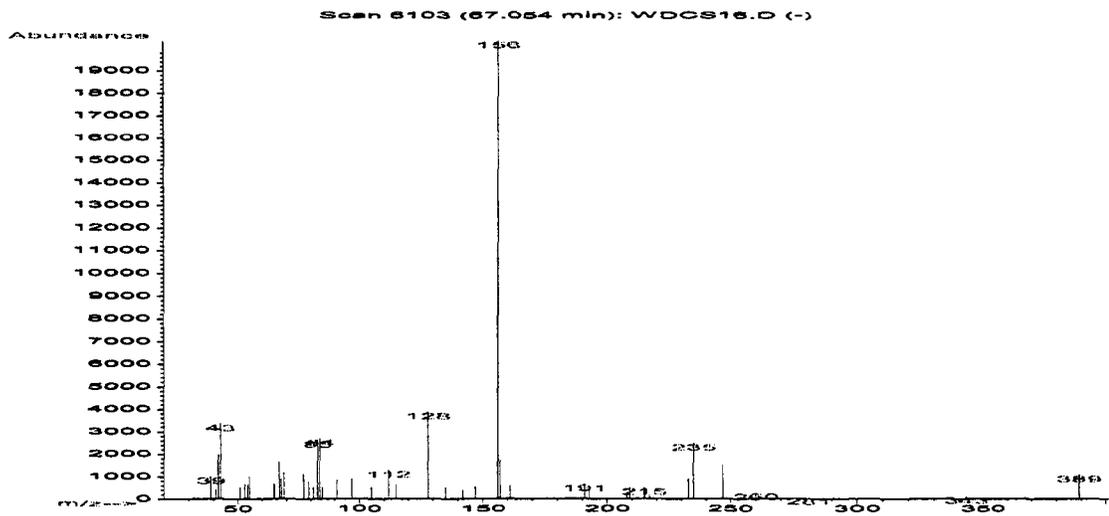
Inconnu (30)**4-O-méthylolivétoléthylcarboxylate (31)**

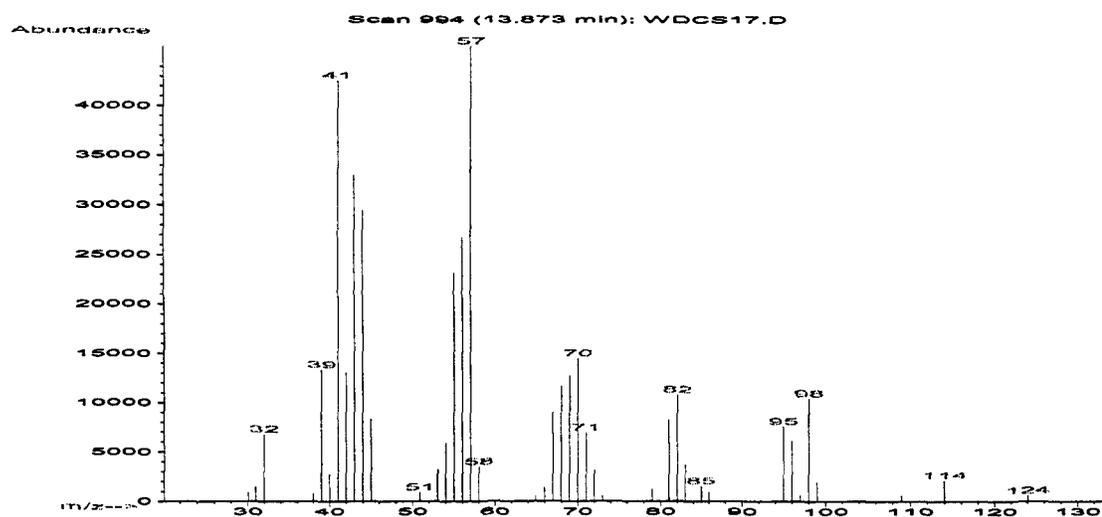
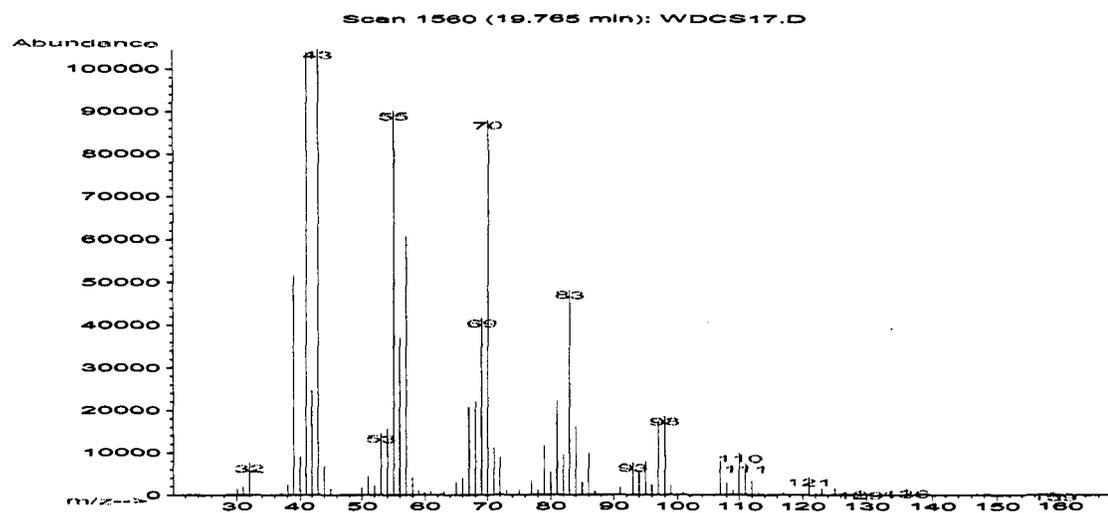
Dérivé aromatique (32)**Dérivé aromatique polycyclique (33)**

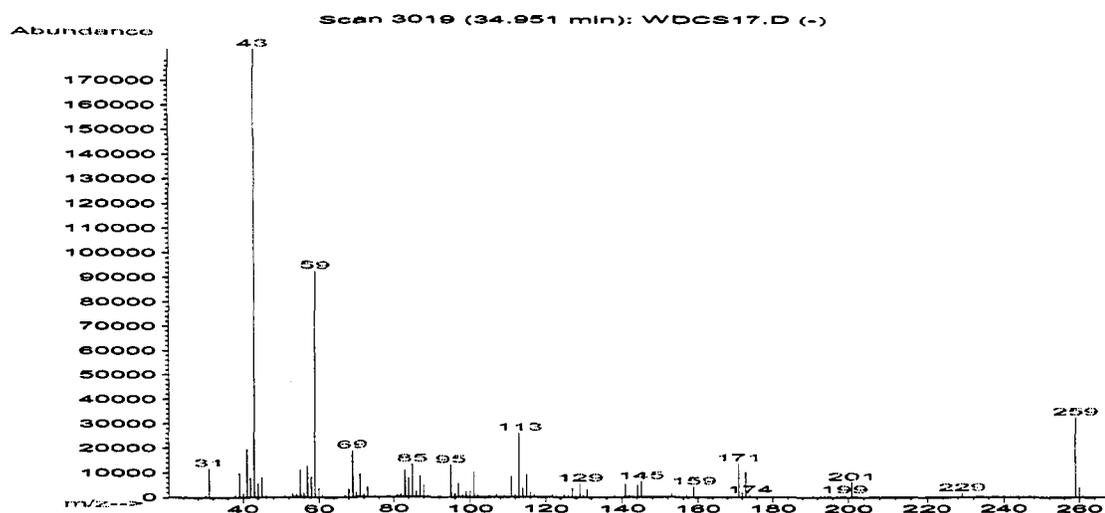
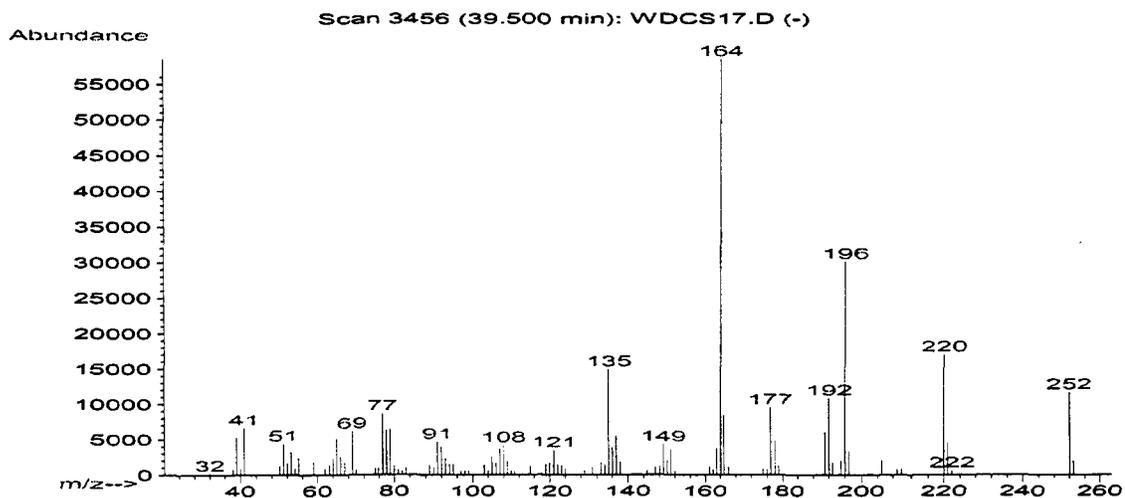
Inconnu (34)

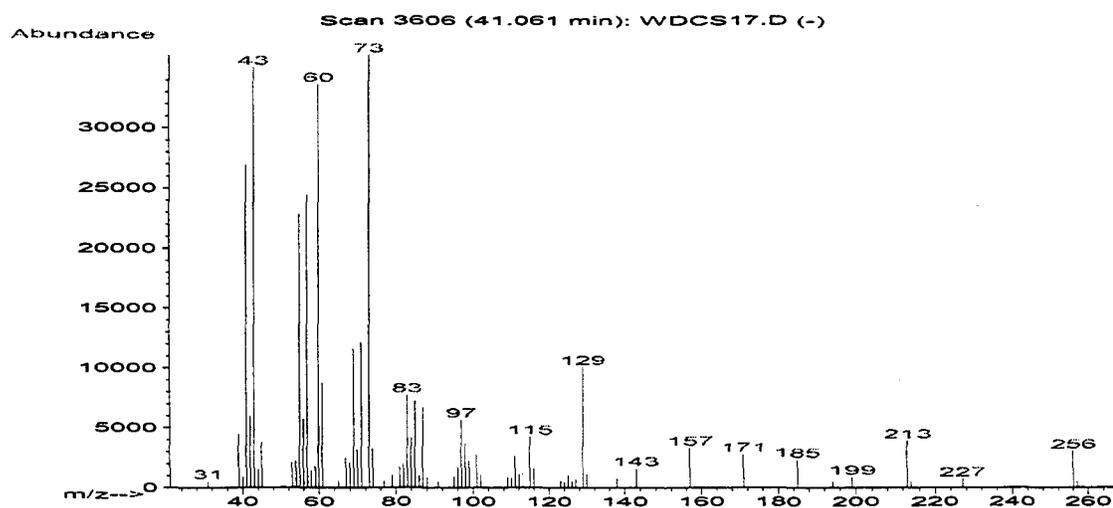
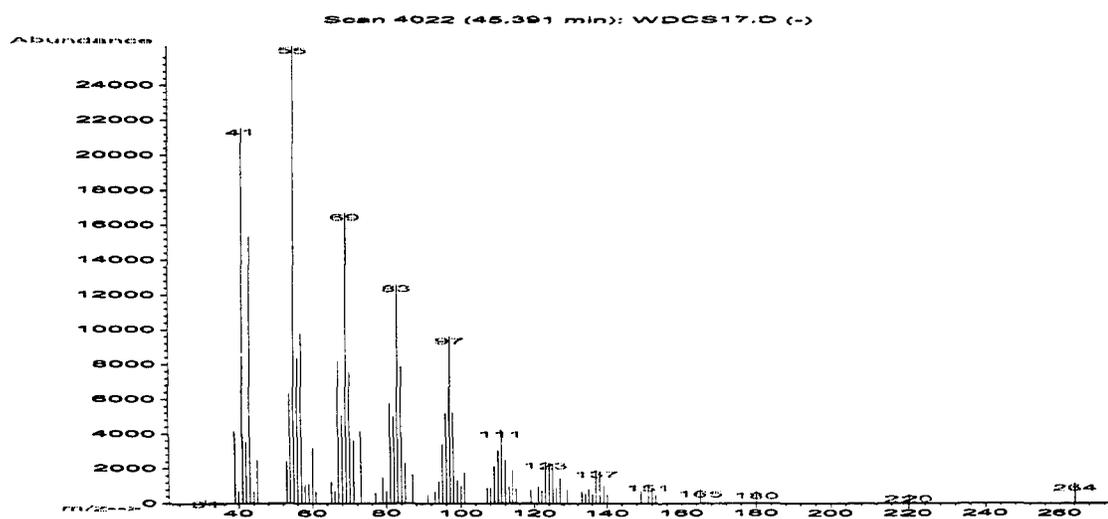


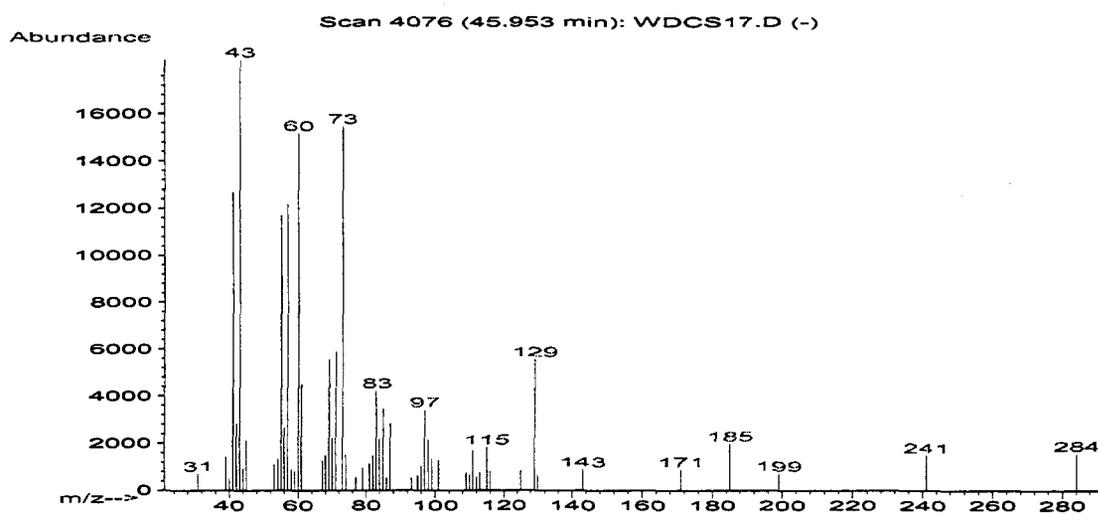
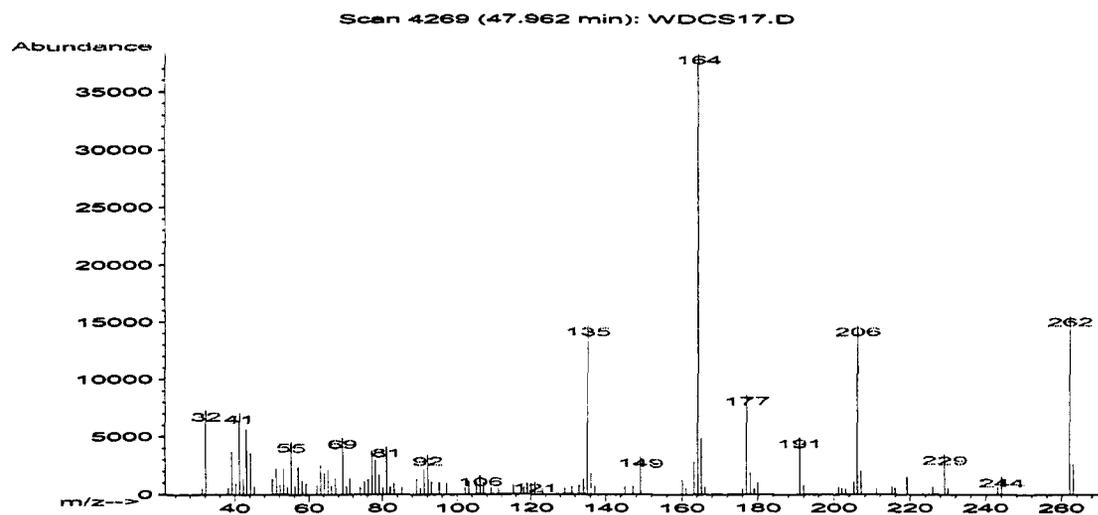
Inconnu (35)

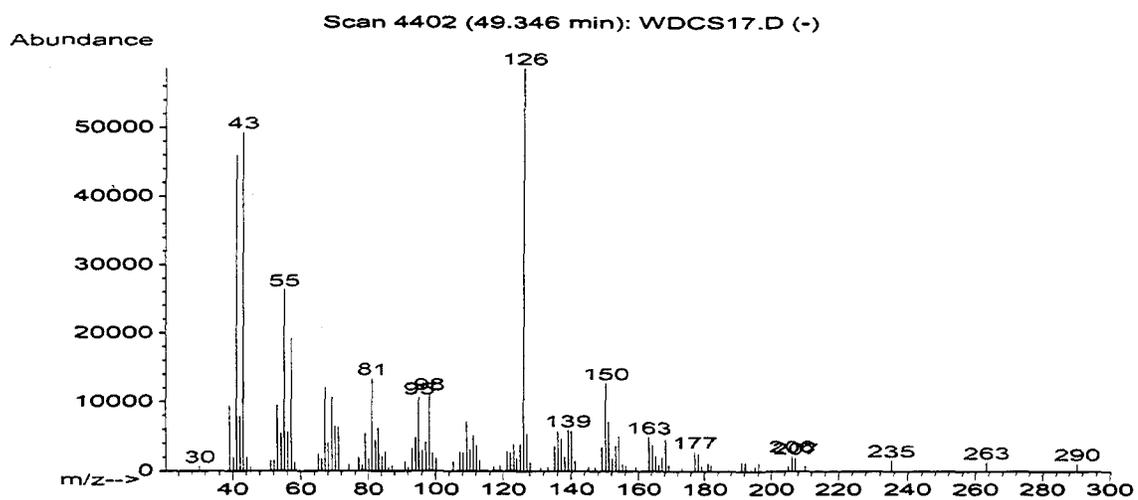
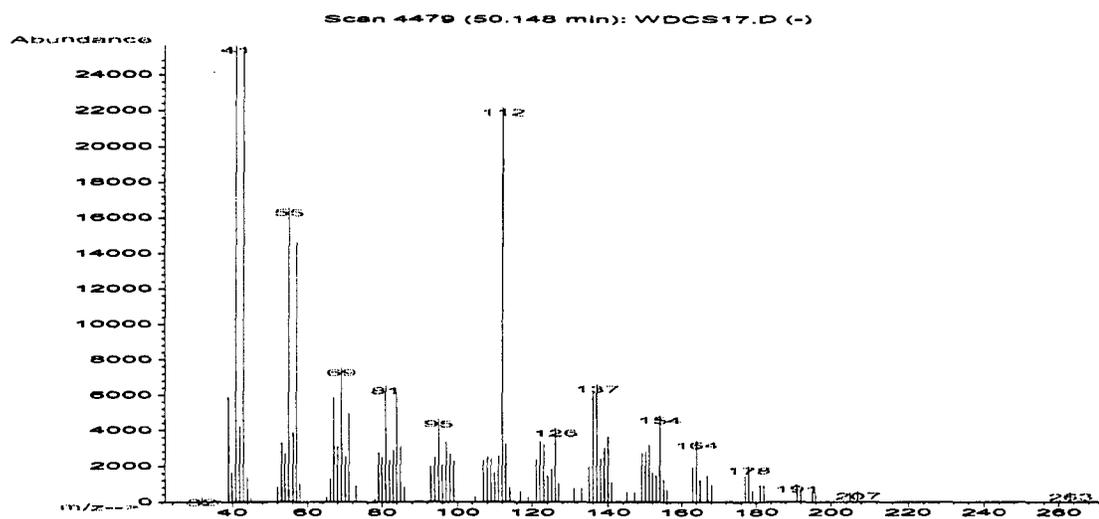


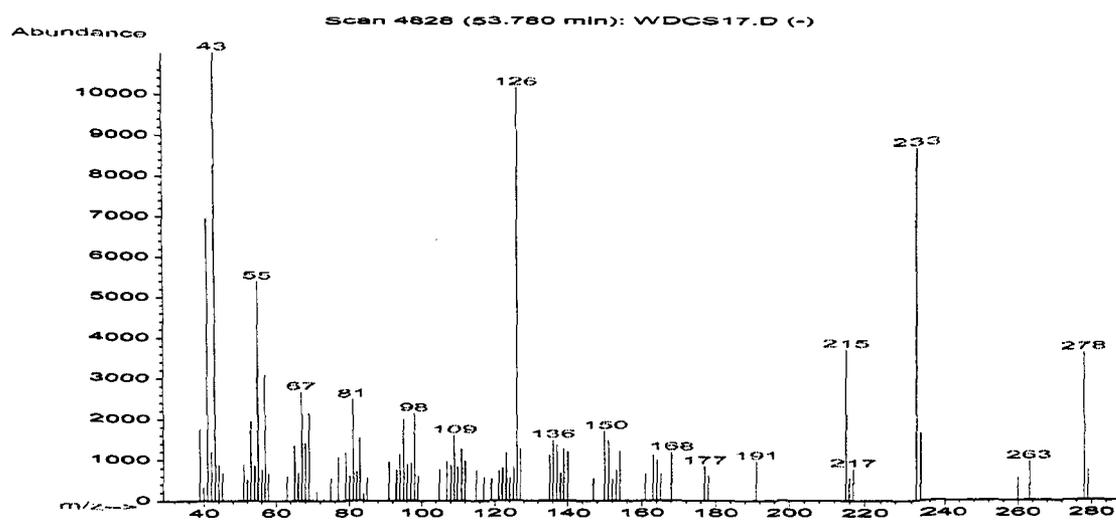
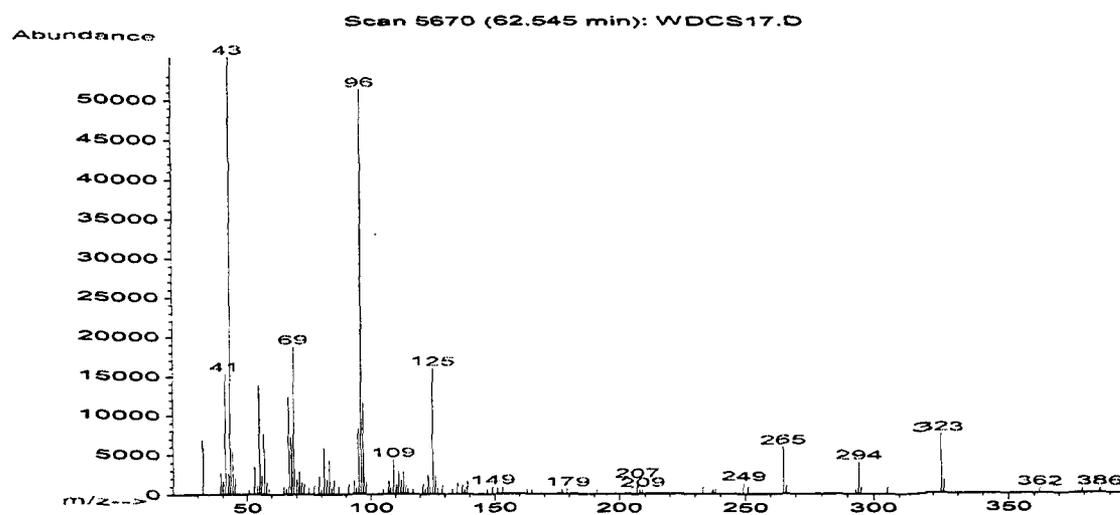
Nonanal (36)**Décenal (37)**

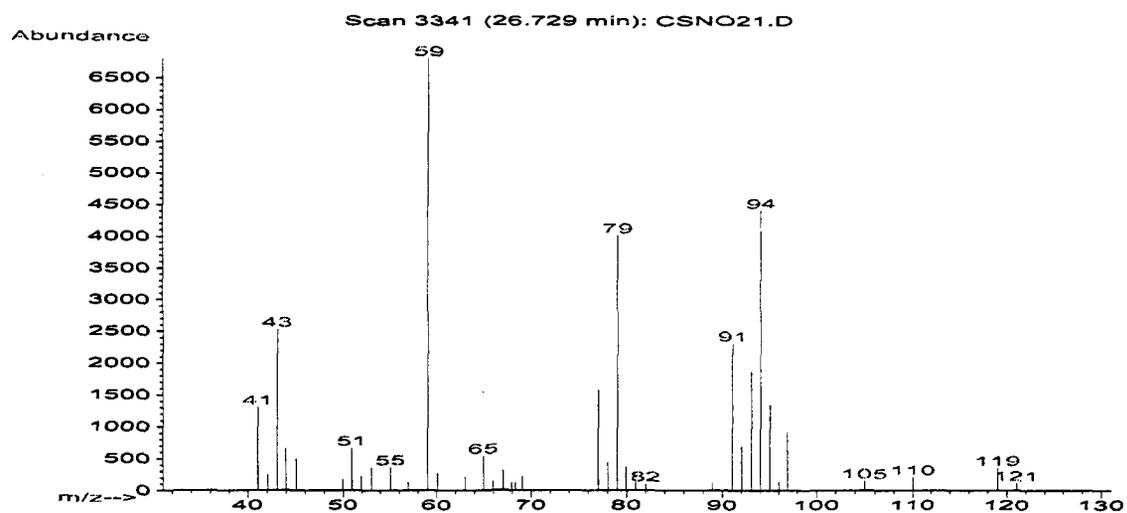
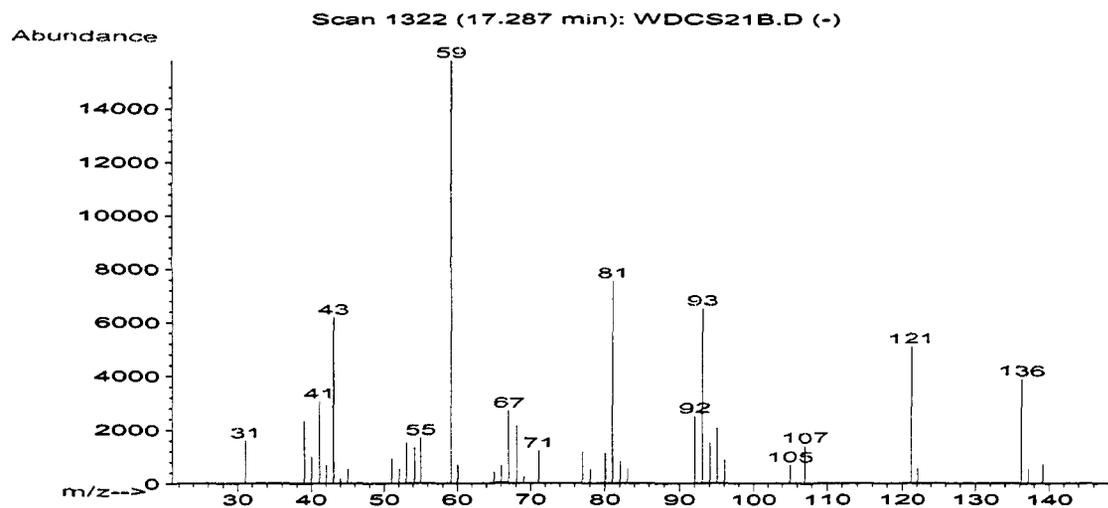
Inconnu (38)**4-O-méthylolivetolméthylcarboxylate (39)**

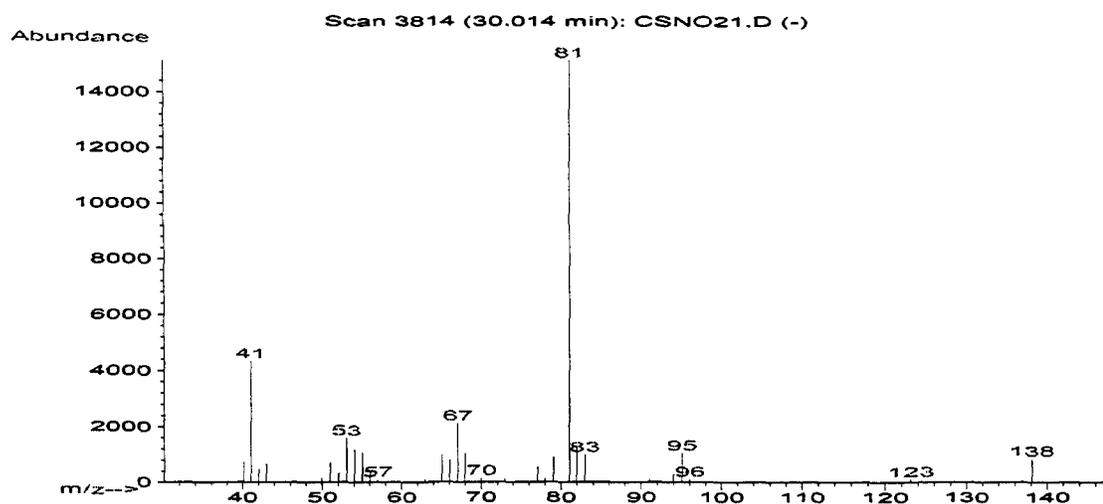
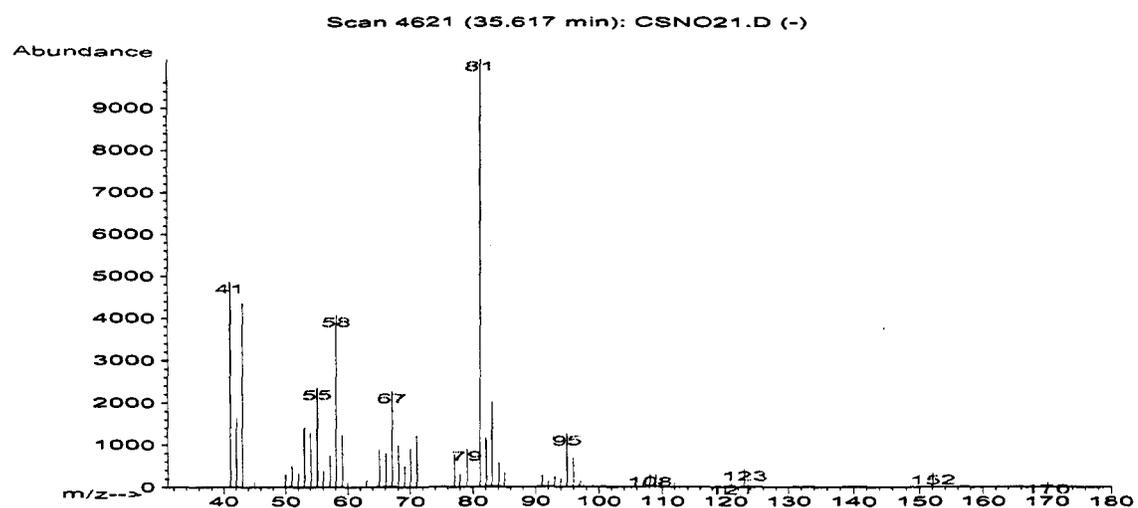
Dérivé d'acide aliphatique (40)**Inconnu (41)**

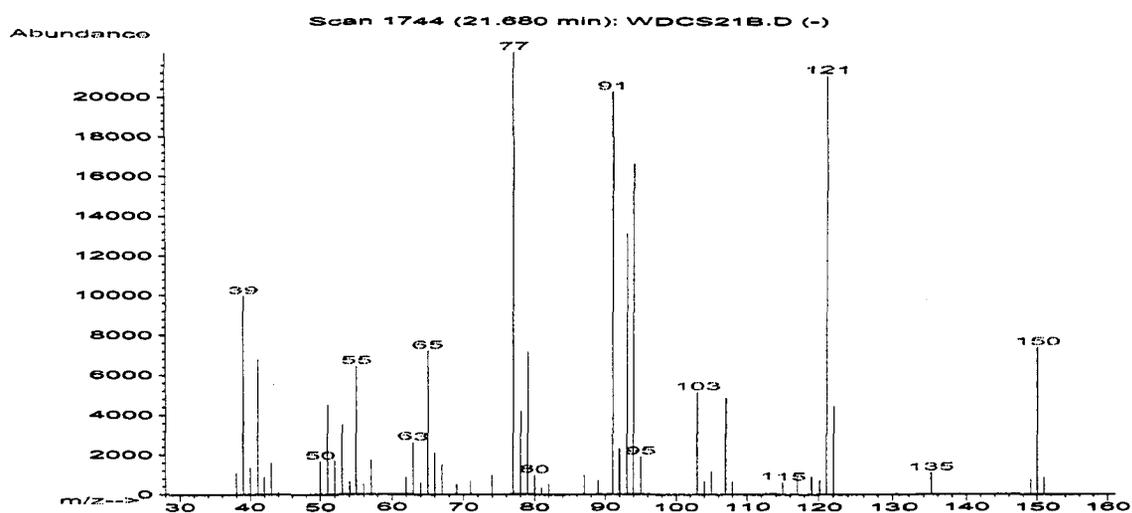
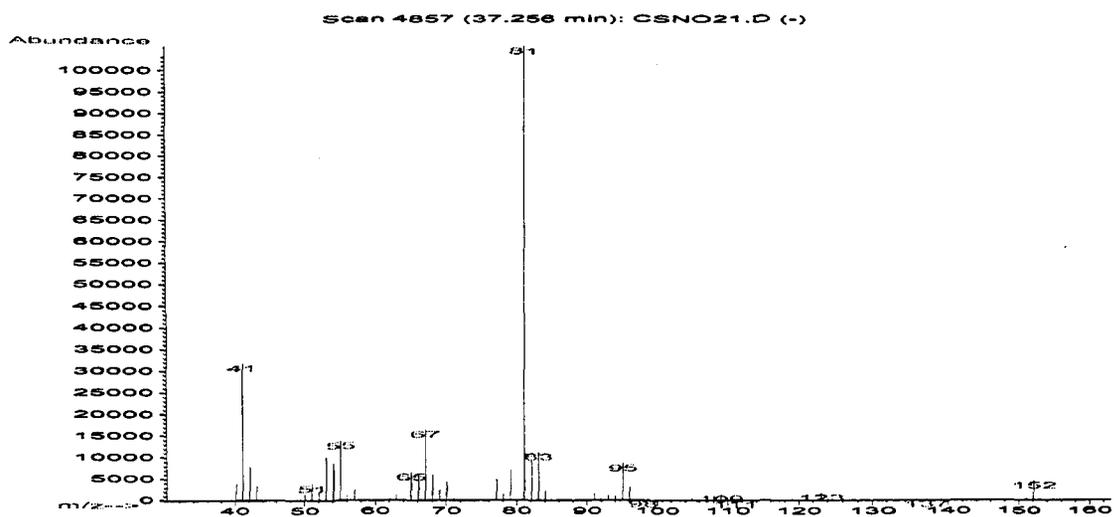
Dérivé d'acide aliphatique (42)**Dérivé aromatique (43)**

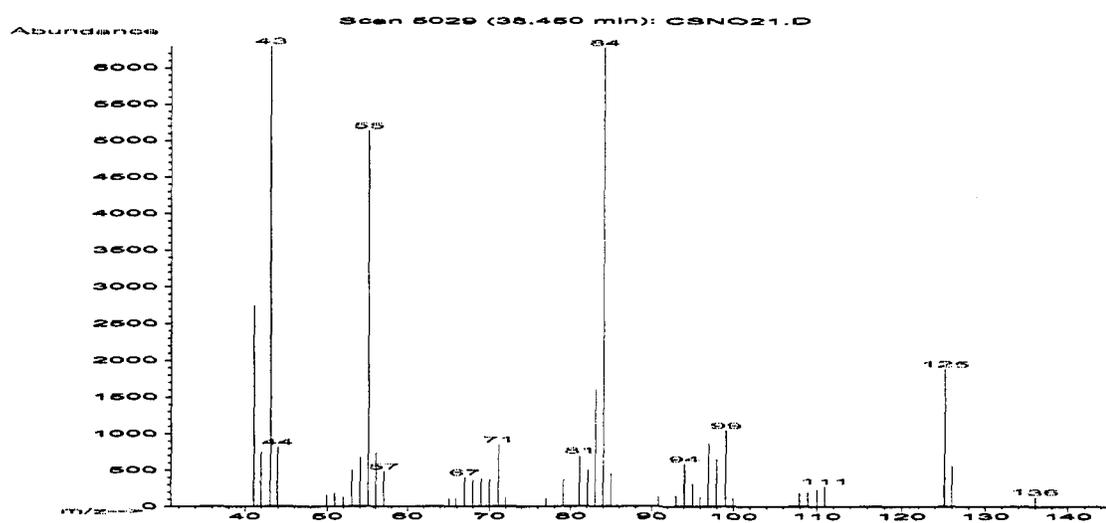
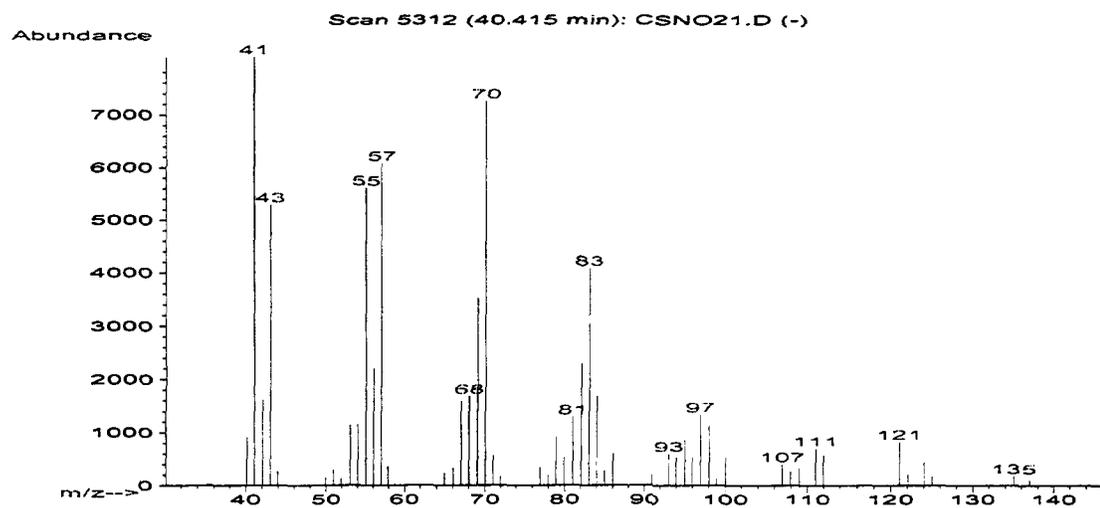
Inconnu (44)**Inconnu (45)**

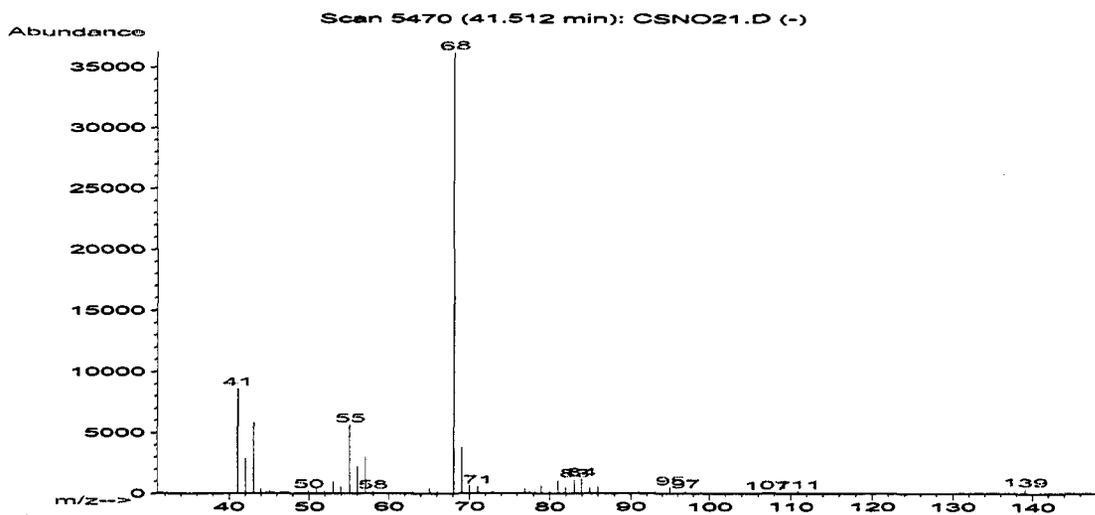
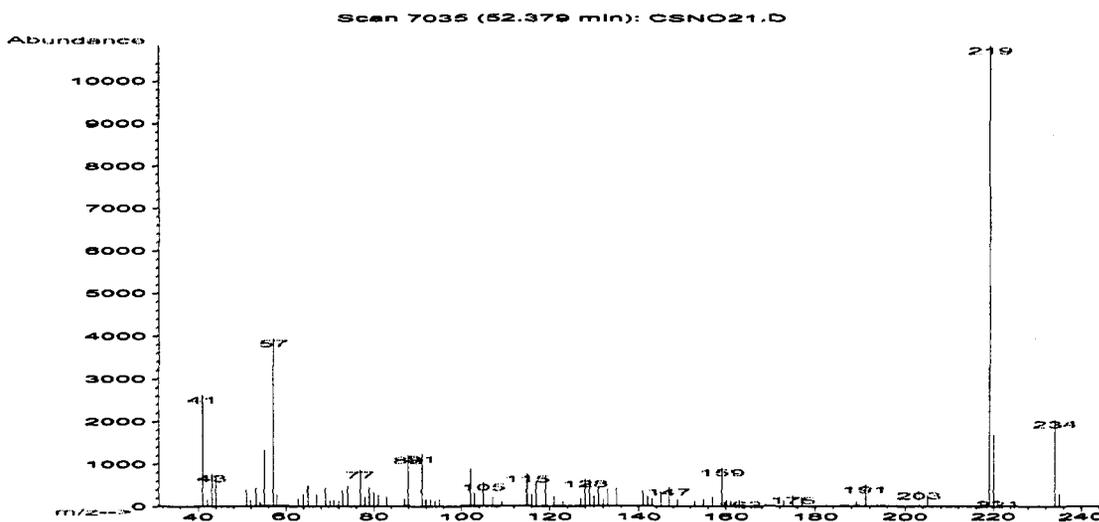
Dérivé aromatique polycyclique (46)**Inconnu (47)**

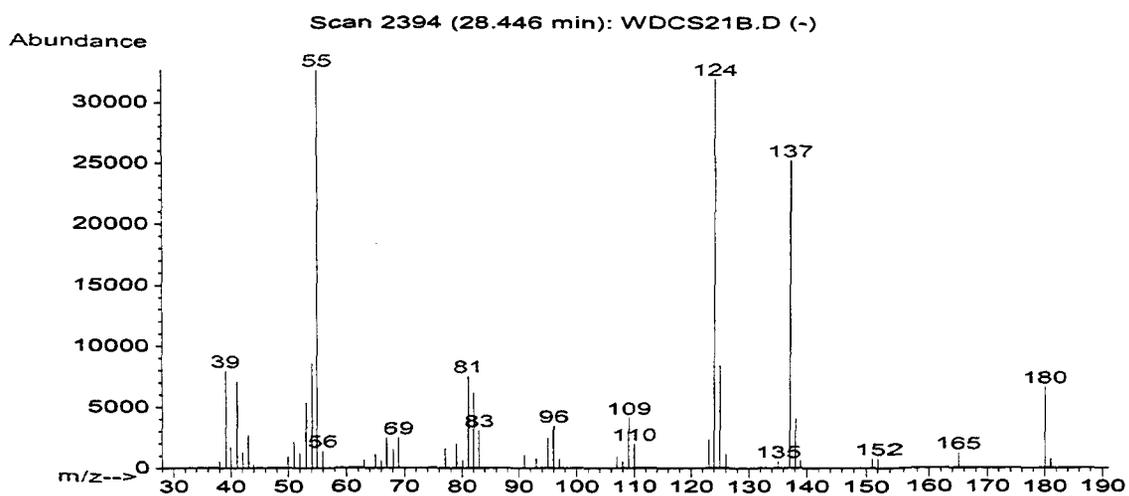
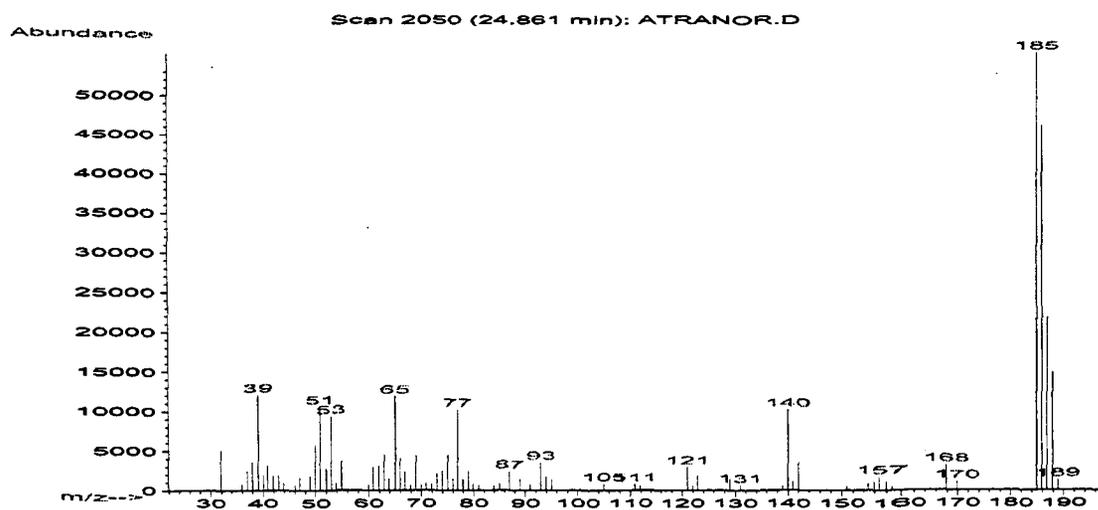
Mentha-1,5-diène-8-ol (48) **α -Terpinéol (49)**

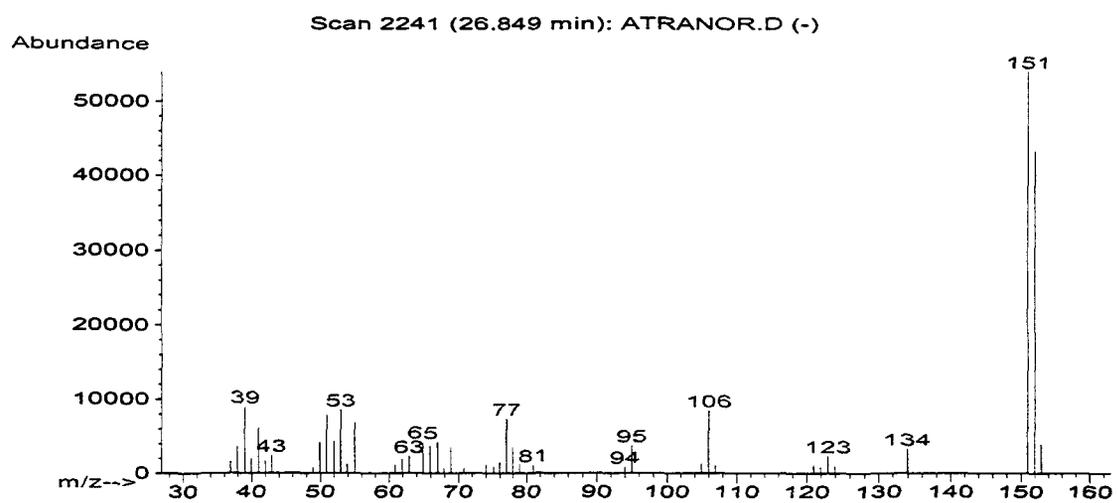
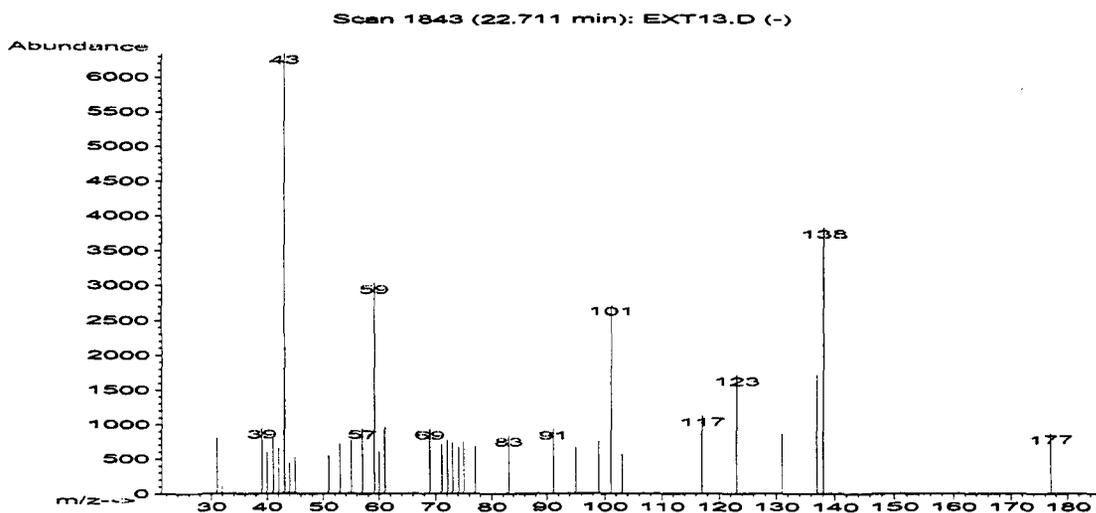
2,4-nonadienal (50)**(E,Z)-2,4-décadienal (51)**

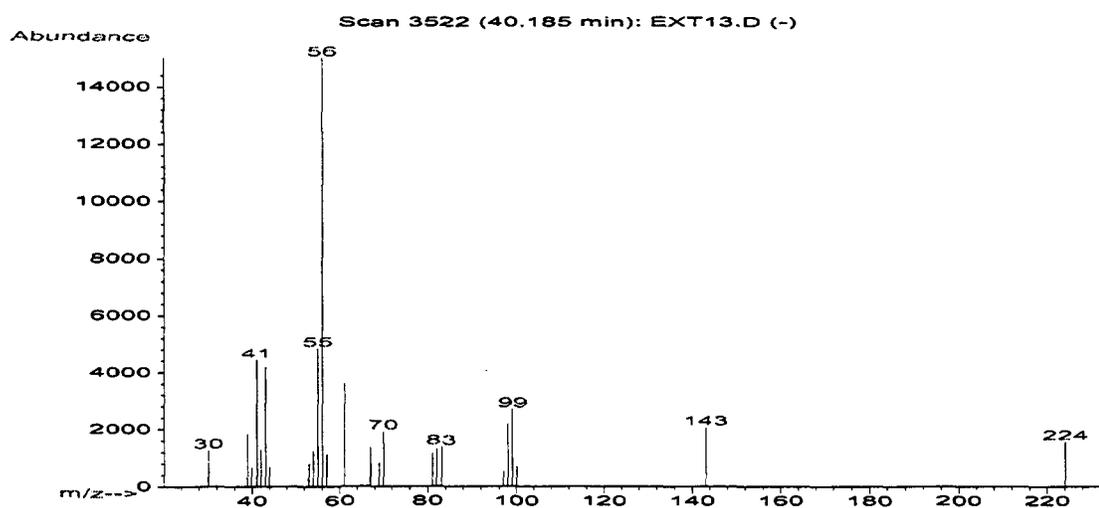
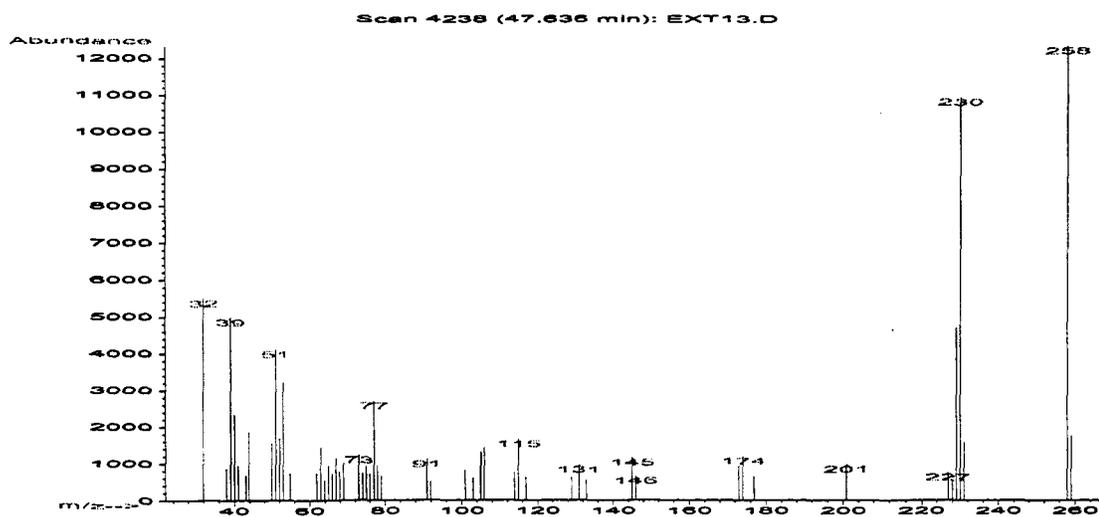
Dérivé aromatique (52)**(E,E)-2,4-décadiénel (53)**

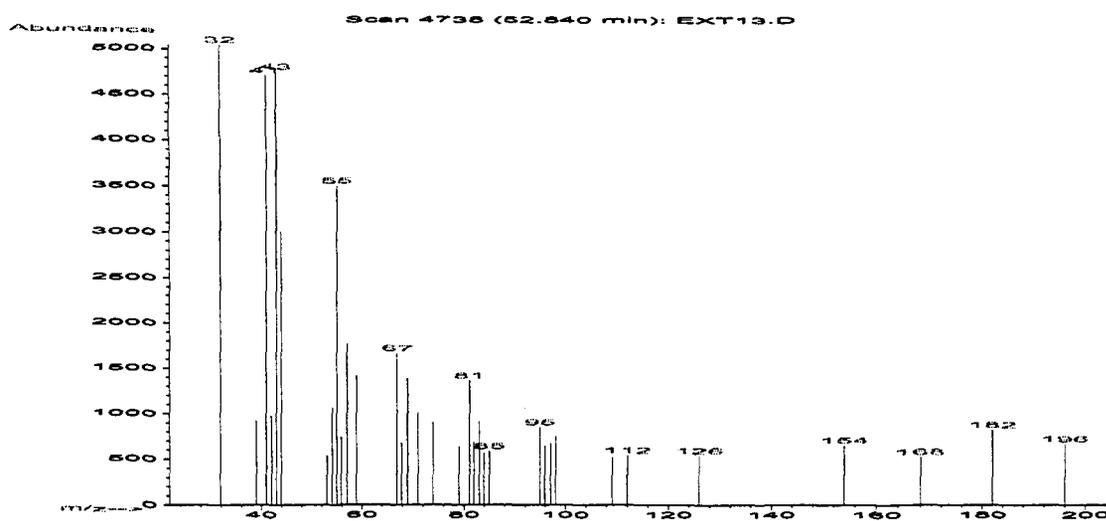
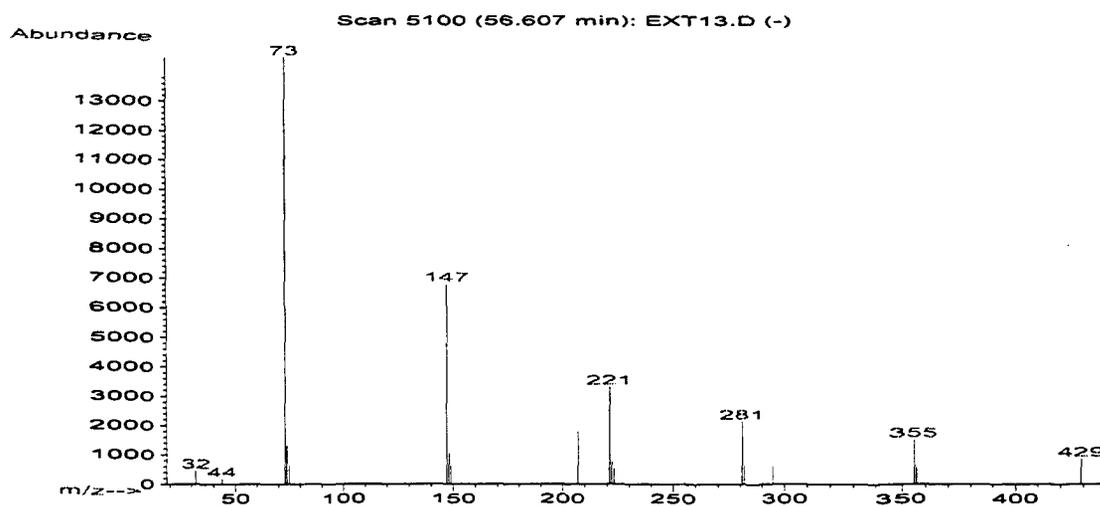
Inconnu (54)**2-undécénal (55)**

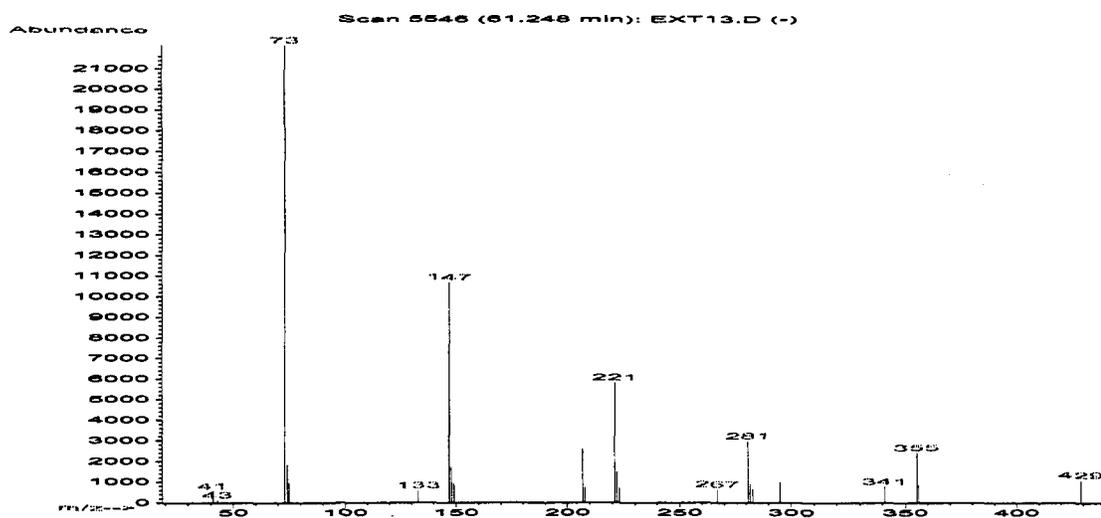
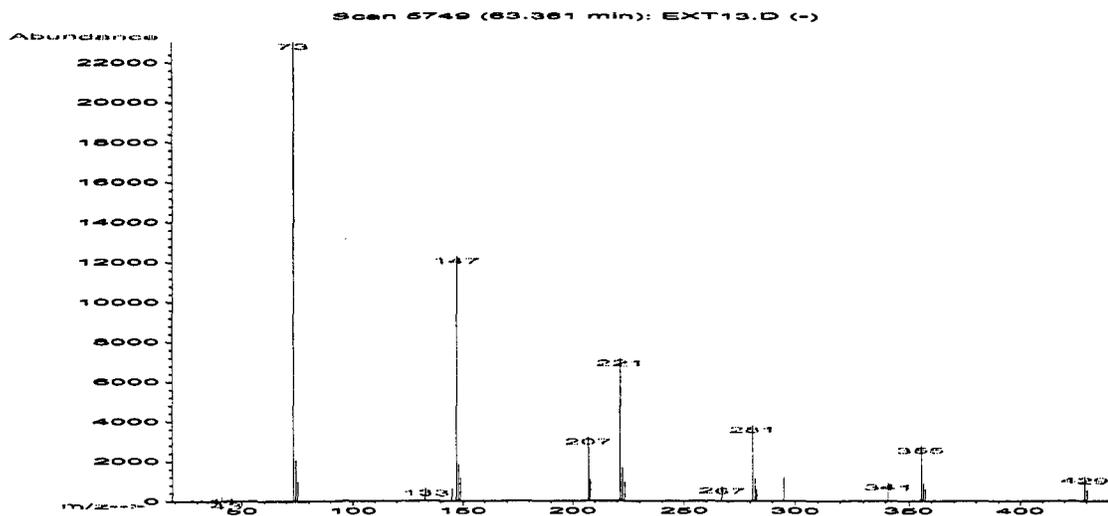
Inconnu (56)**2,6-di-tert-butyl-4-éthylphénol (57)**

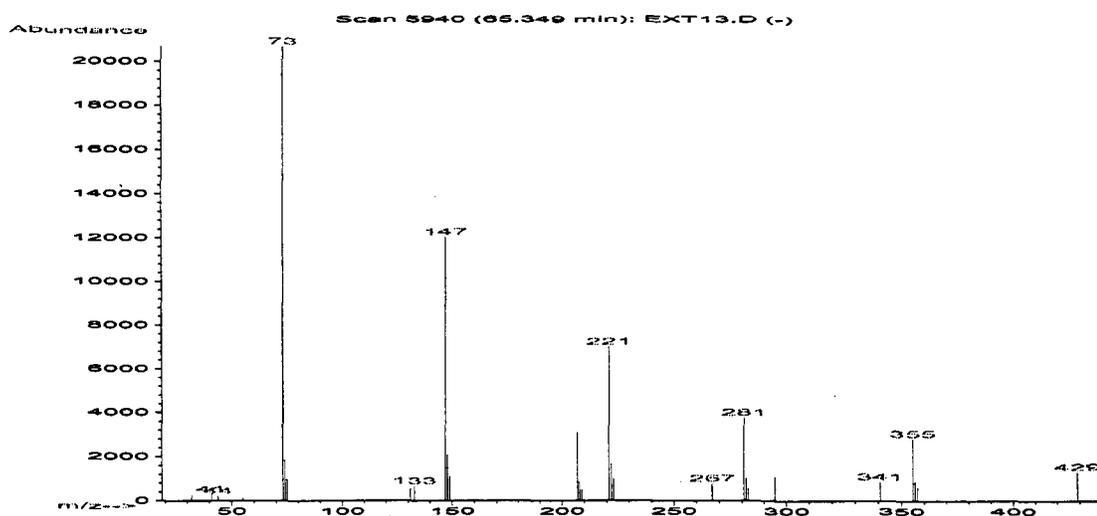
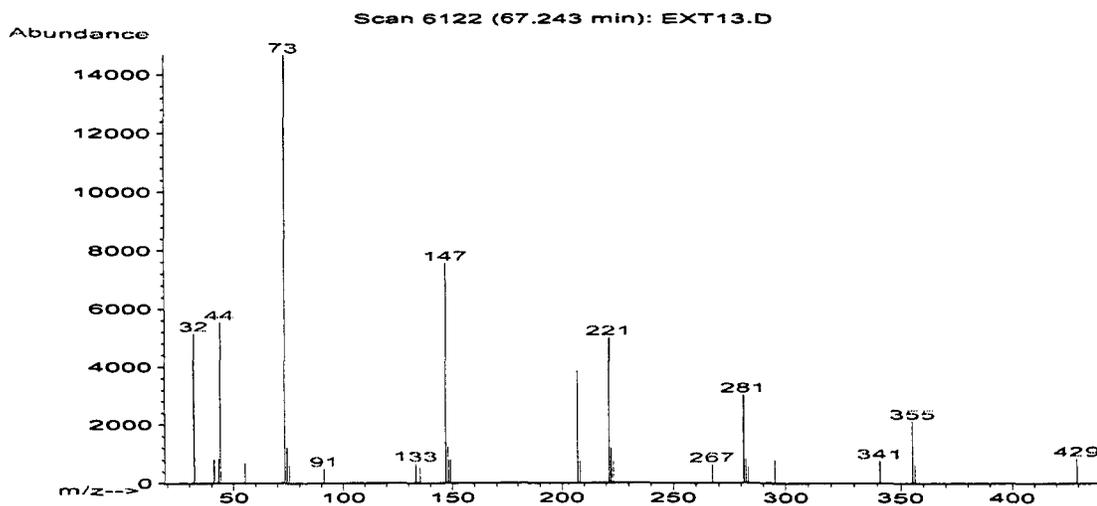
Inconnu (3b)**Produit non identifié de (58)**

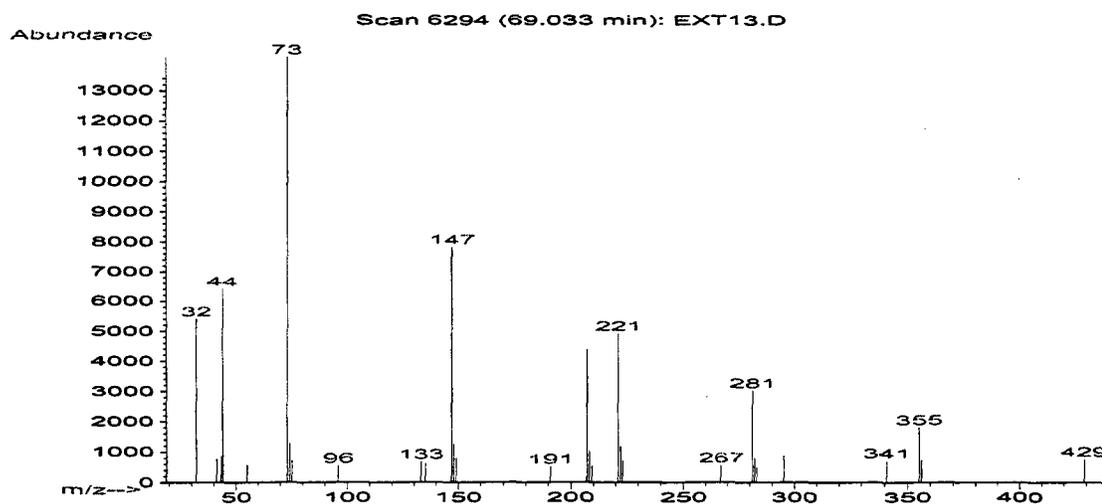
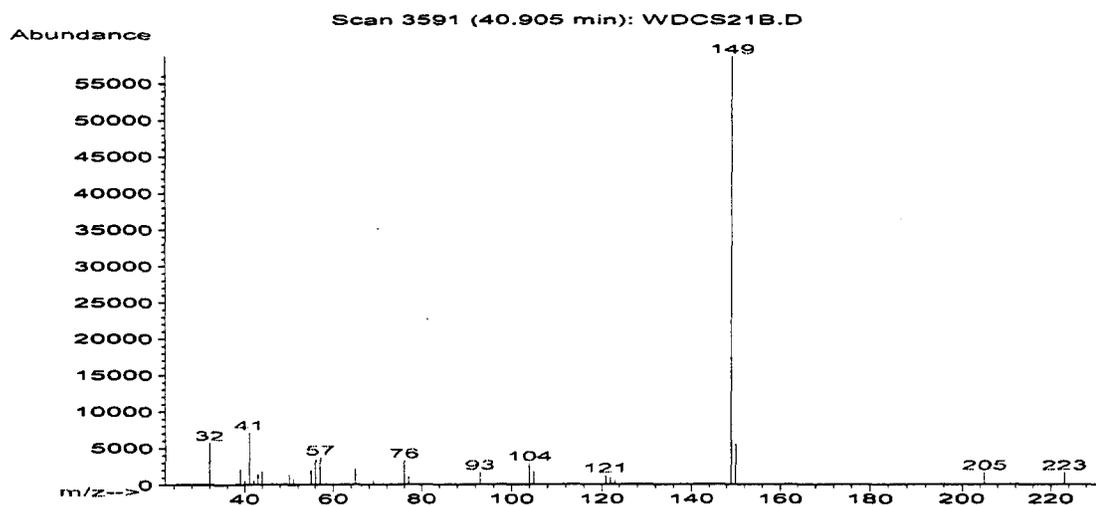
2,4-dihydroxy-6méthyl-benzaldéhyde (59)**Inconnu (60)**

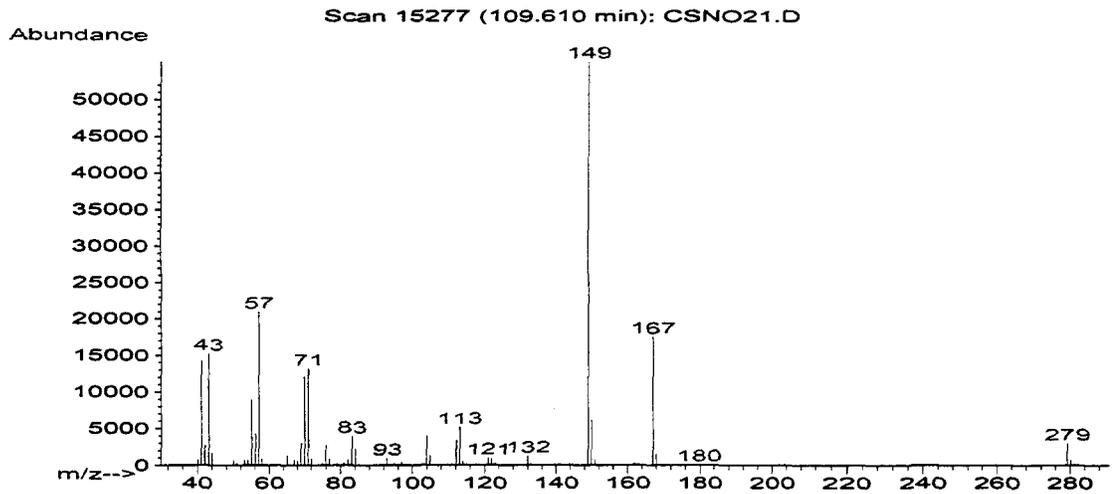
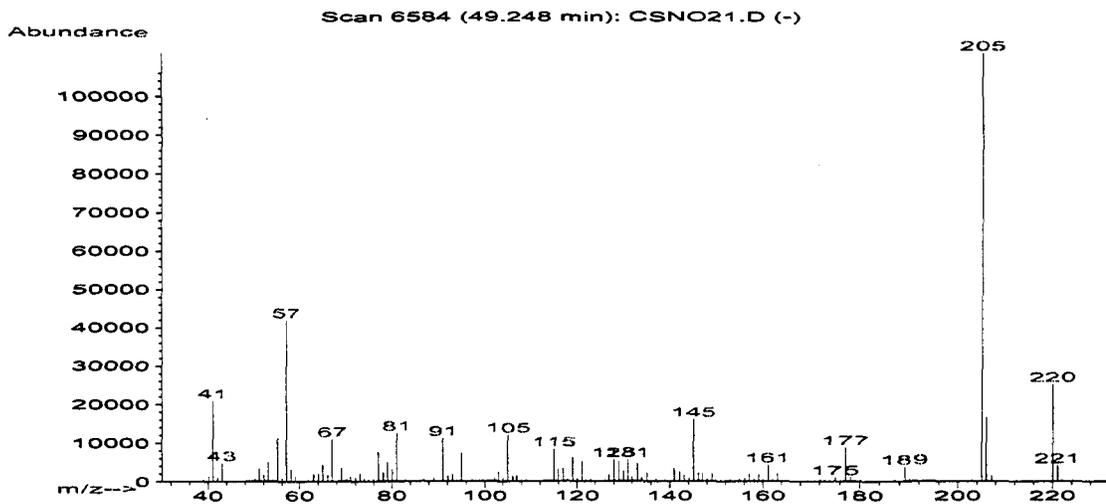
Lactone (61)**Inconnu (62)**

Inconnu (63)**Inconnu (64)**

Inconnu (65,66)**Inconnu (67)**

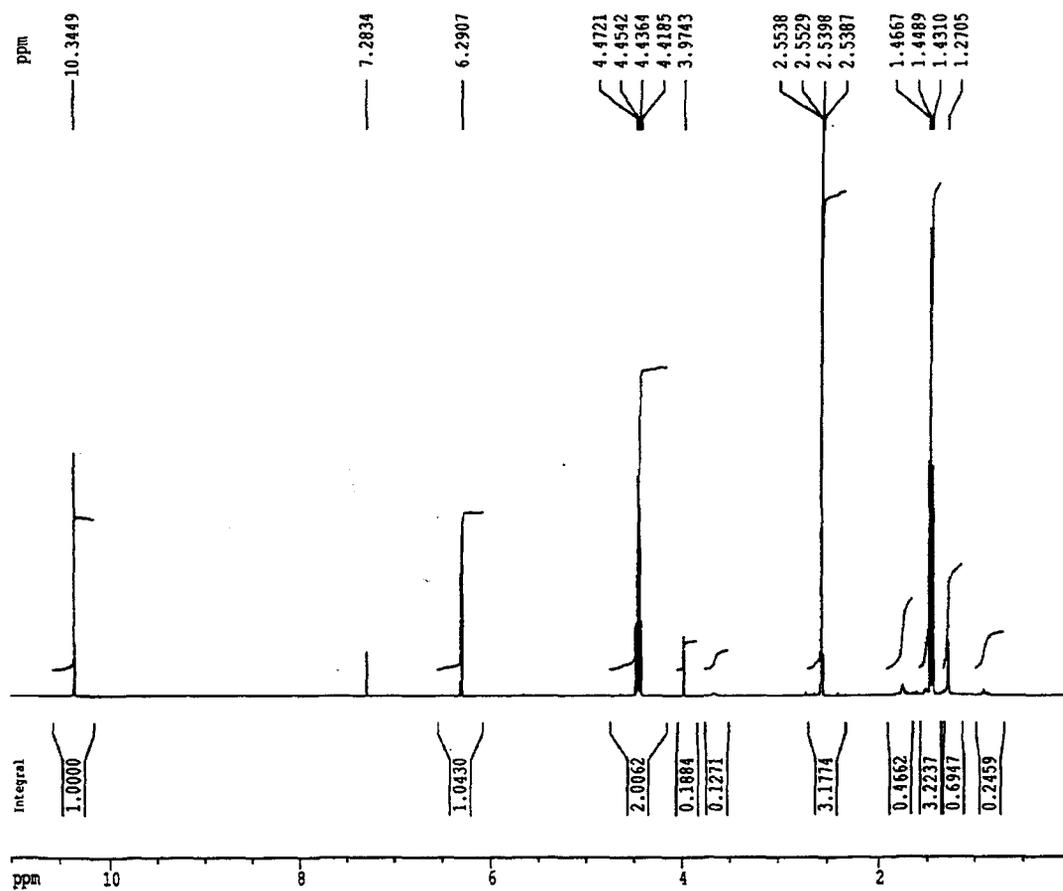
Inconnu (68)**Inconnu (69)**

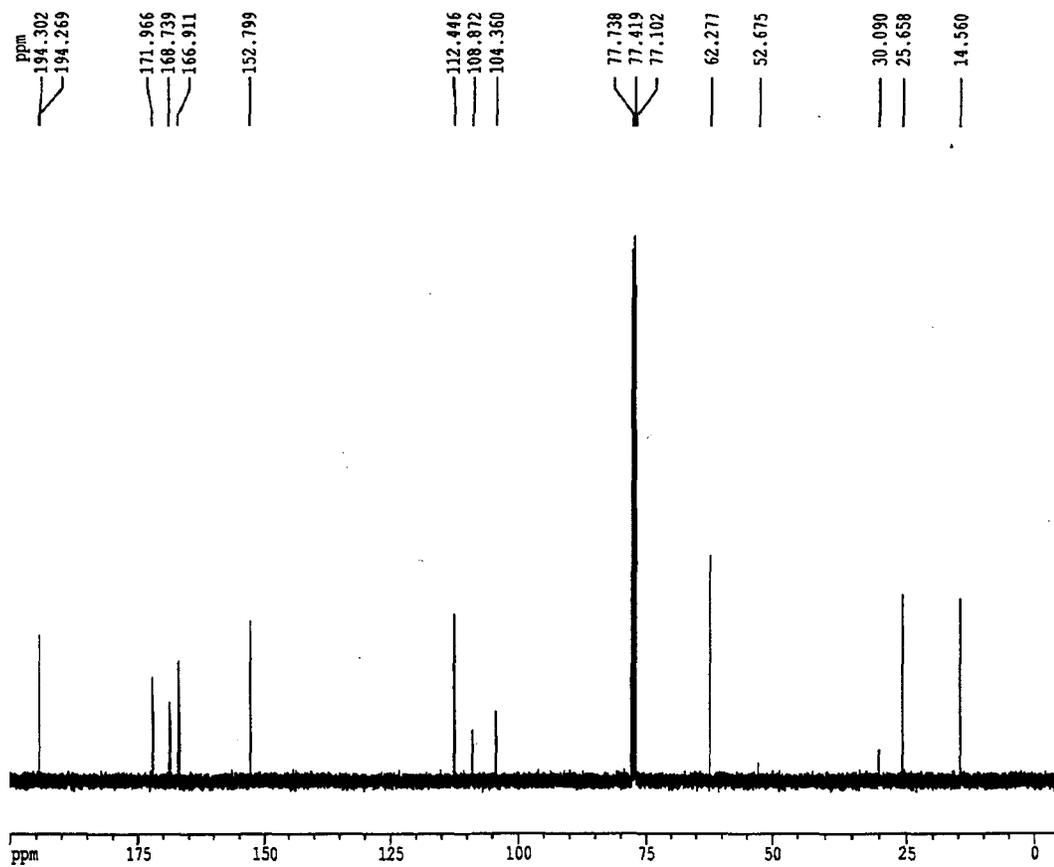
Inconnu (70)**Dibutylphthalate**

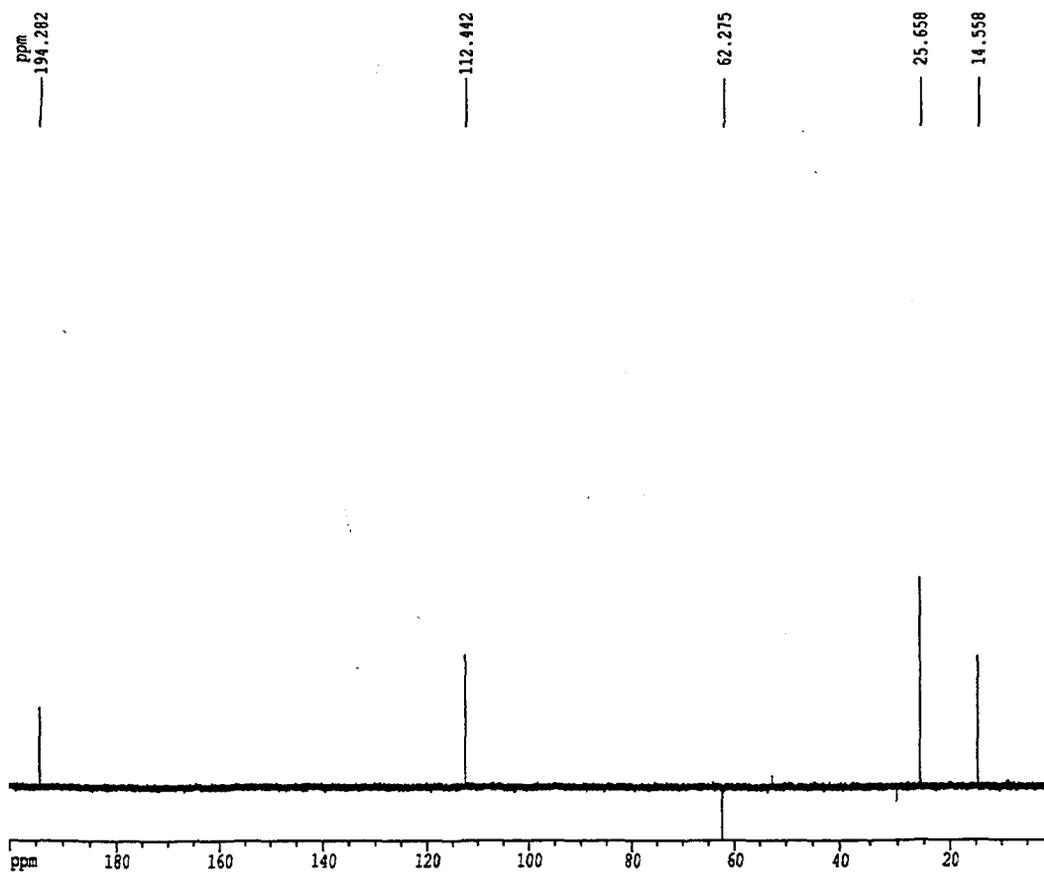
Bis-(2-éthylhexyl)phthalate**Dibutylhydroxytoluène (BHT)**

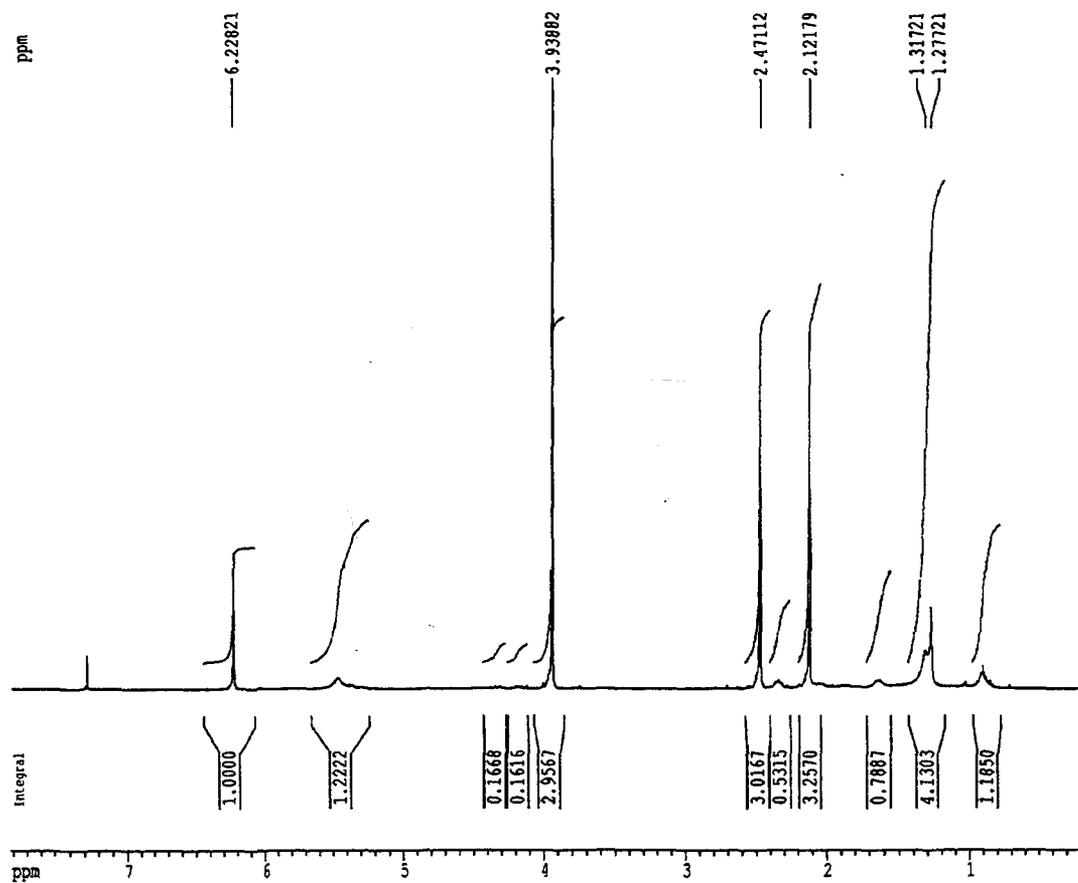
ANNEXE 4

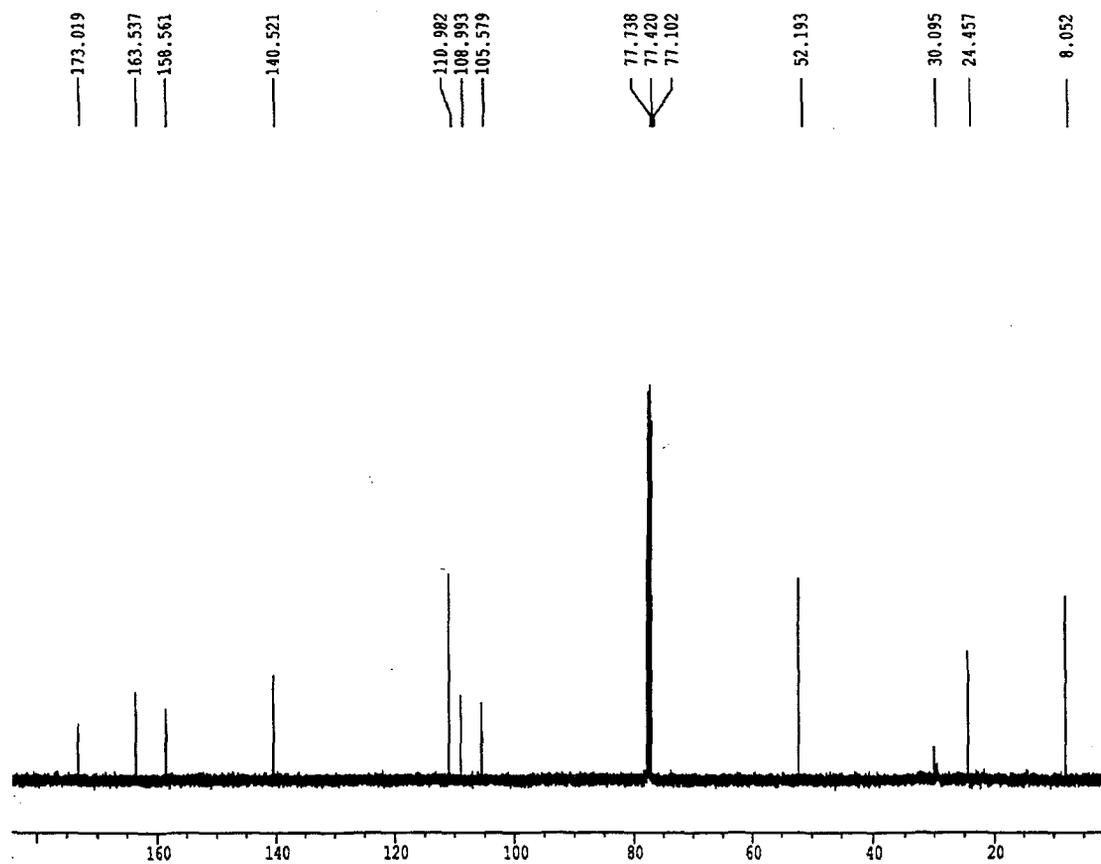
SPECTRES RMN DES DÉRIVÉS

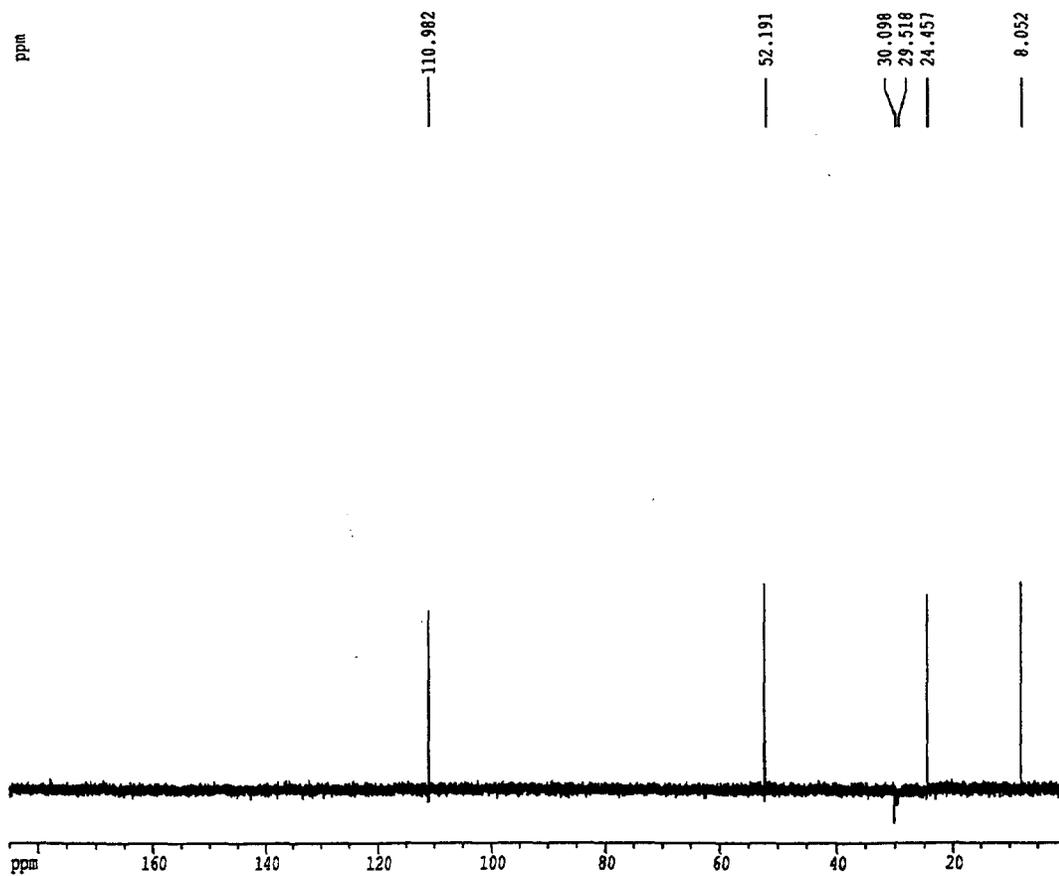
RMN ¹H de l'éthylhaematommate (8)

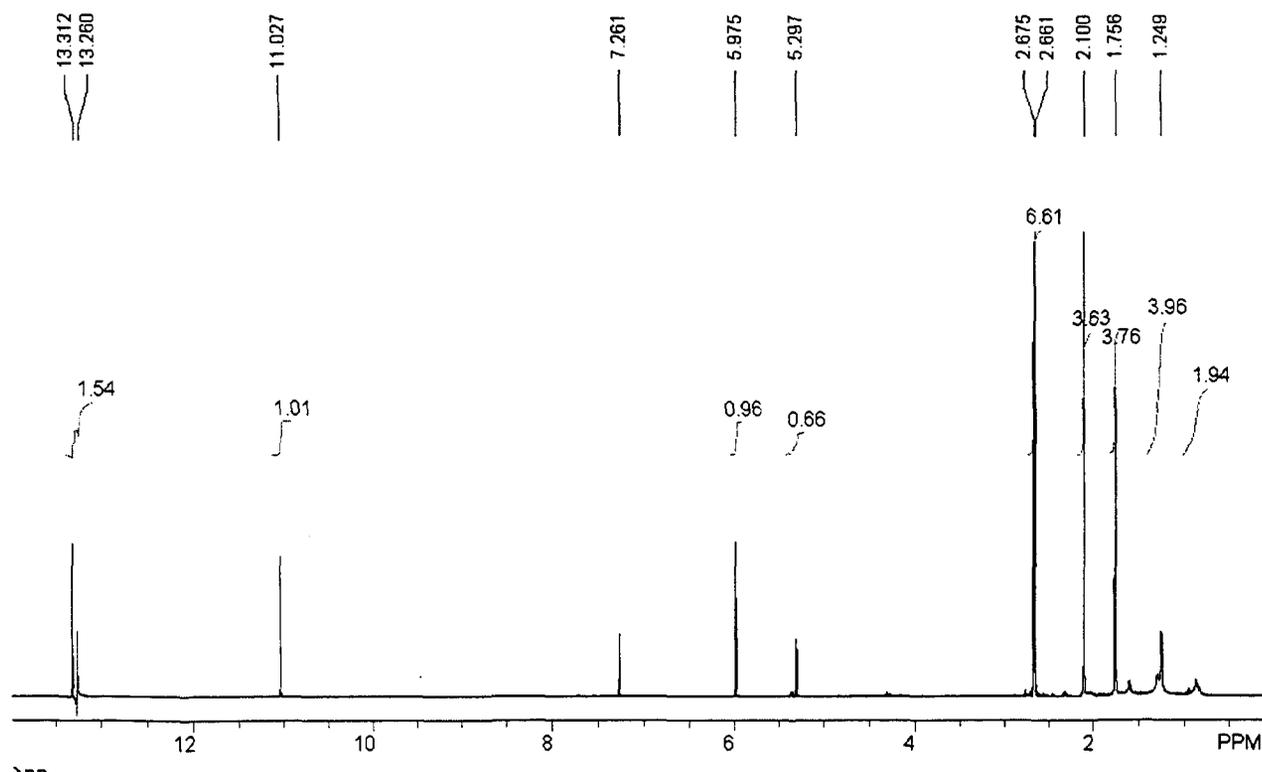
RMN ^{13}C de l'éthylhaematommate (8)

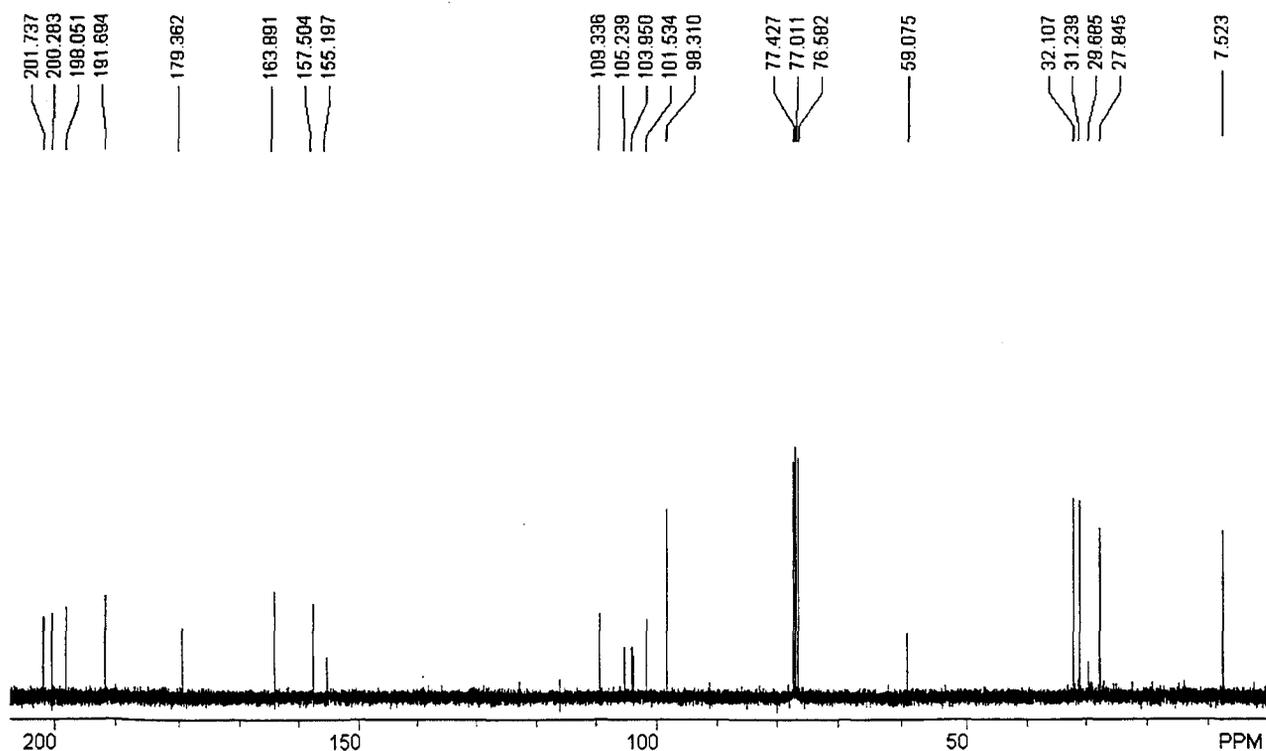
RMN ^{13}C (Dept) de l'éthylhaematommate (8)

RMN ^1H du β -orcinolméthylcarboxylate (5)

RMN ^{13}C du β -orcinolméthylcarboxylate (5)

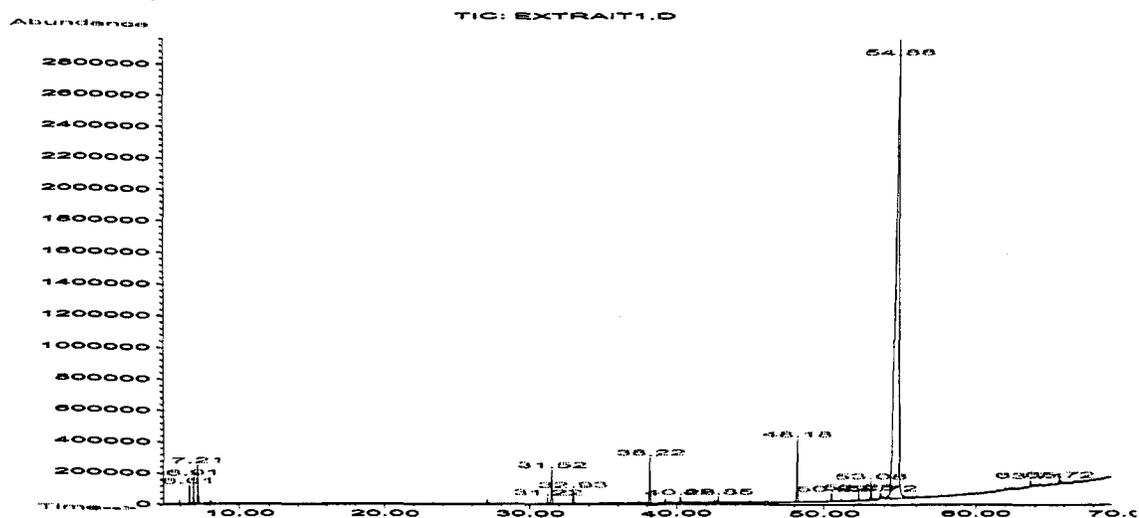
RMN ^{13}C (Dept) du β -orcinolméthylcarboxylate (5)

RMN ^1H de l'acide usnique (21)

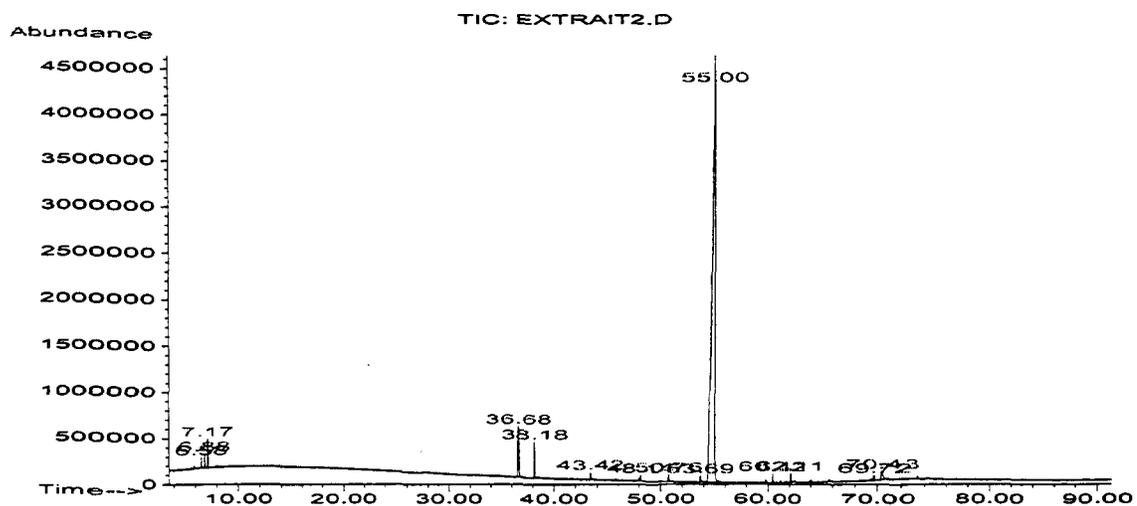
RMN ^{13}C de l'acide usnique (21)

ANNEXE 5**CHROMATOGRAMMES DES ANALYSES GC-MS**

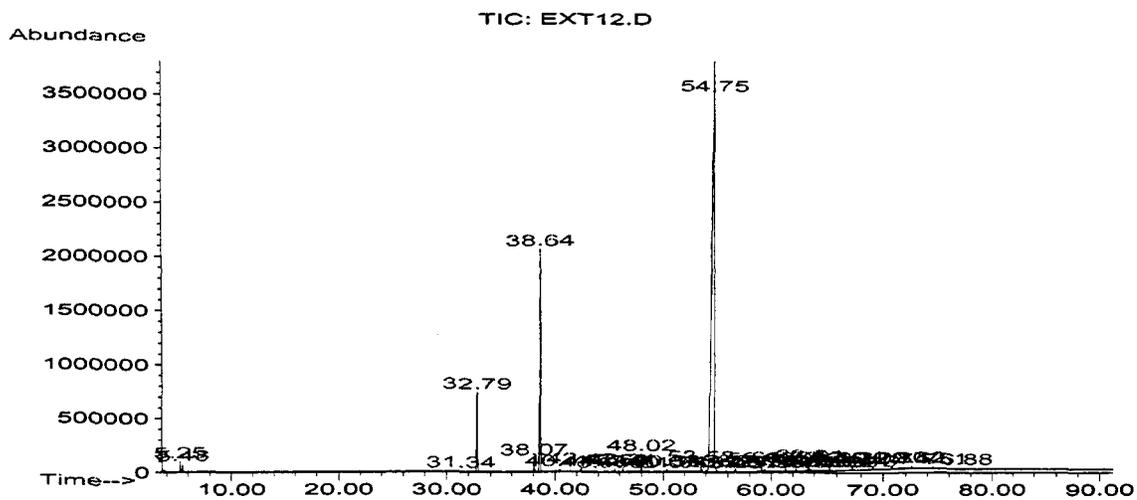
Cladina stellaris: Extrait no 1(hexane)



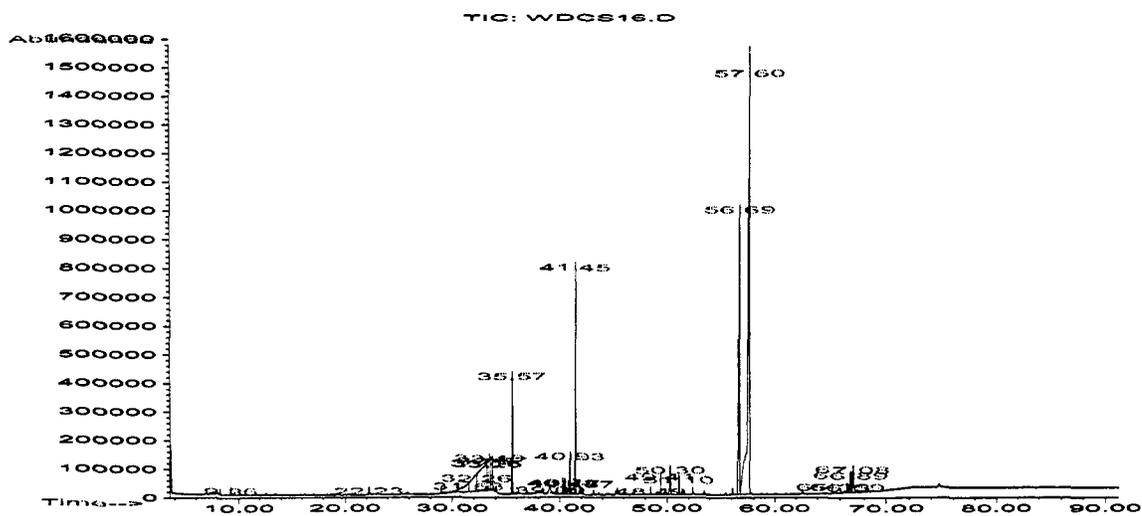
Cladina stellaris: Extrait no 2 (CHCl₃)

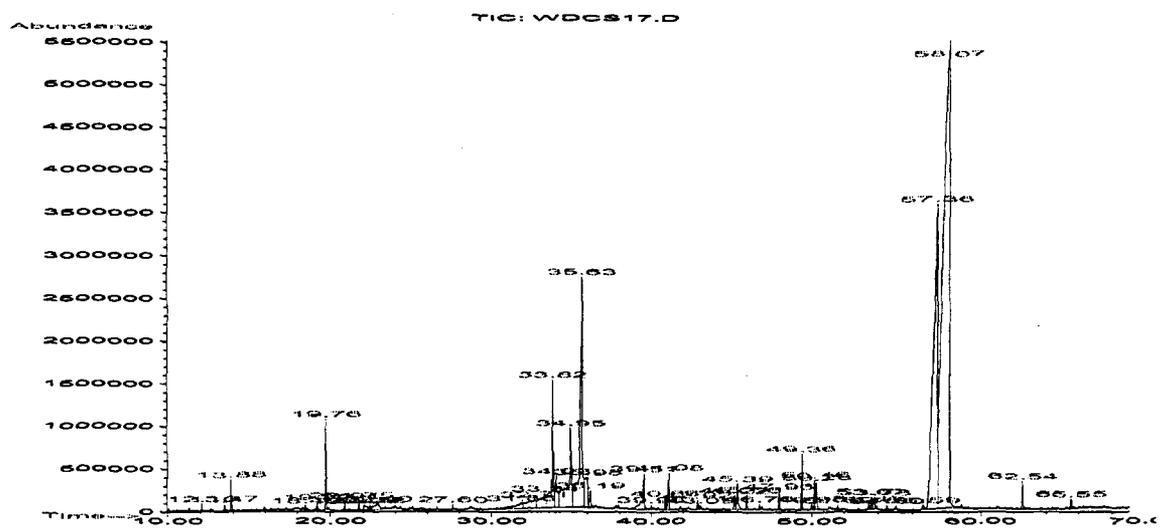
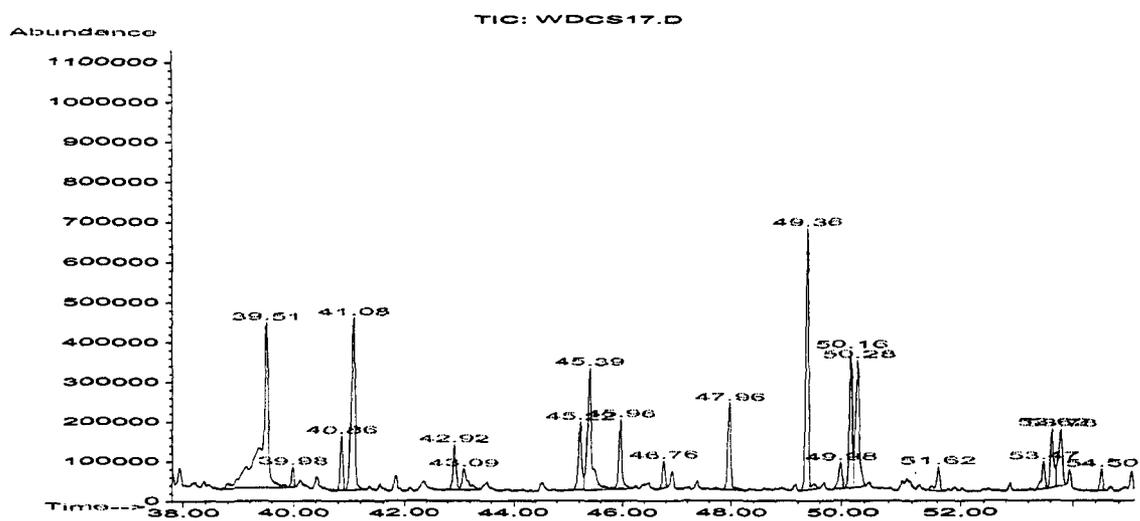


Cladina stellaris: Extrait no 3 (CHCl₃)

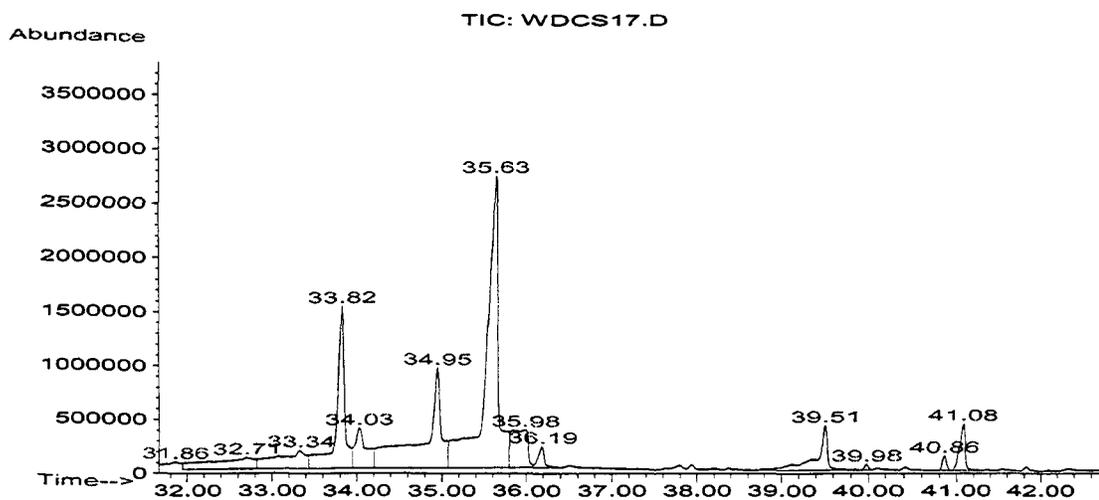


Cladina stellaris: Extrait no 4 (EtOH)

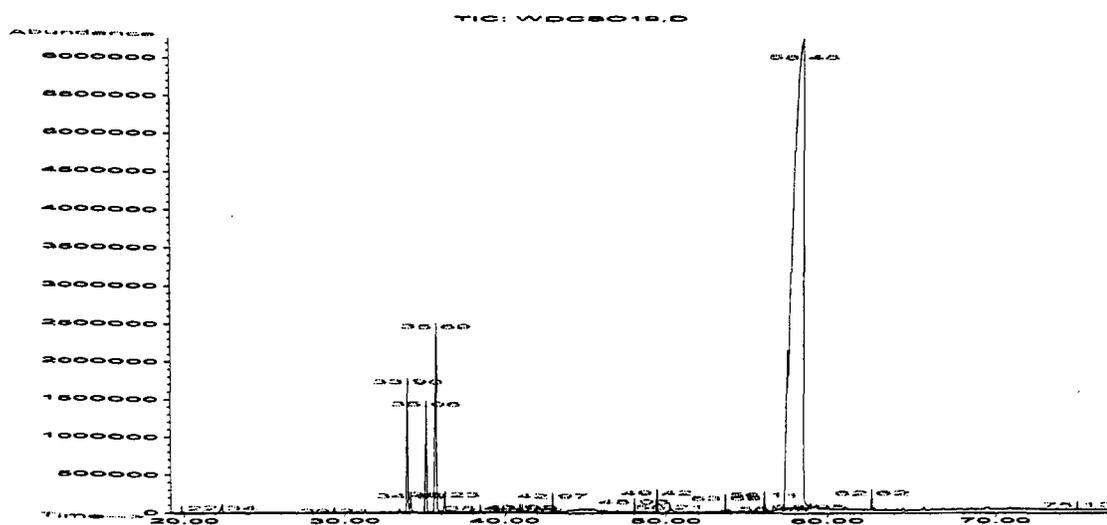


Cladina stellaris: Extrait no 5 (CHCl₃-MeOH)**Cladina stellaris: Extrait no 5 (agrandissement)**

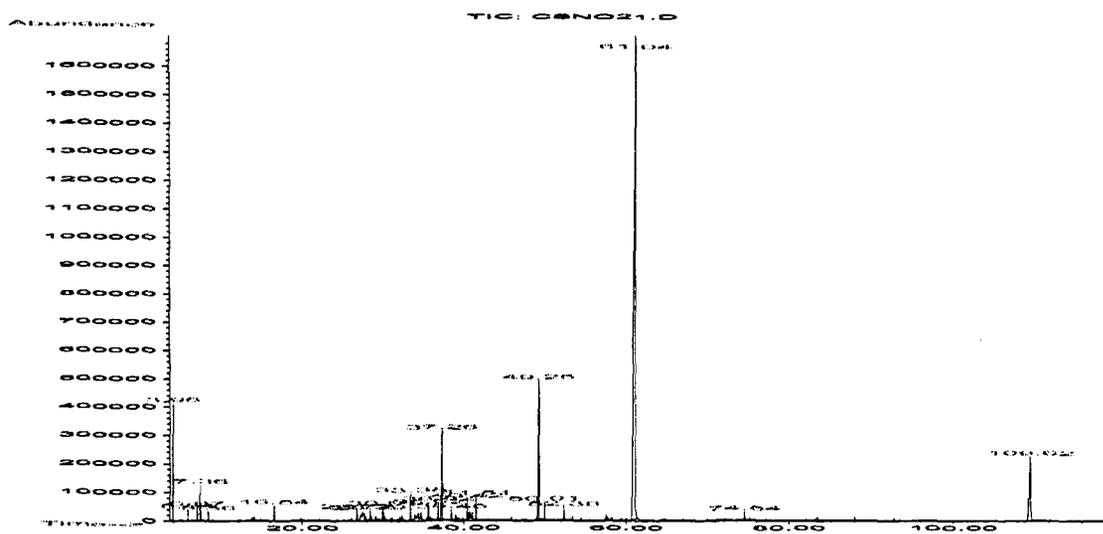
Cladina stellaris: Extrait no 5 (agrandissement)



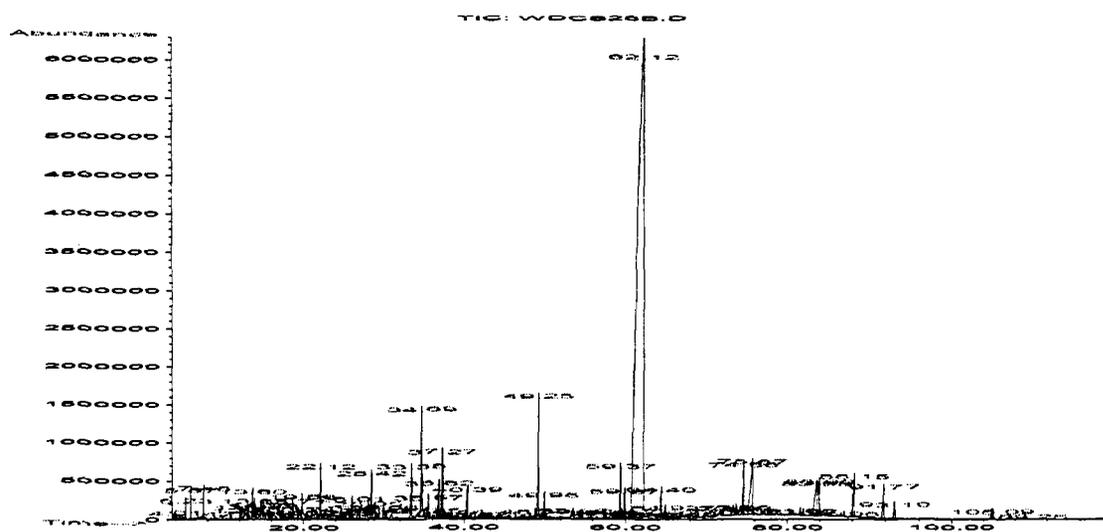
Cladina stellaris: Extrait no 6 (DCM-Acétone)



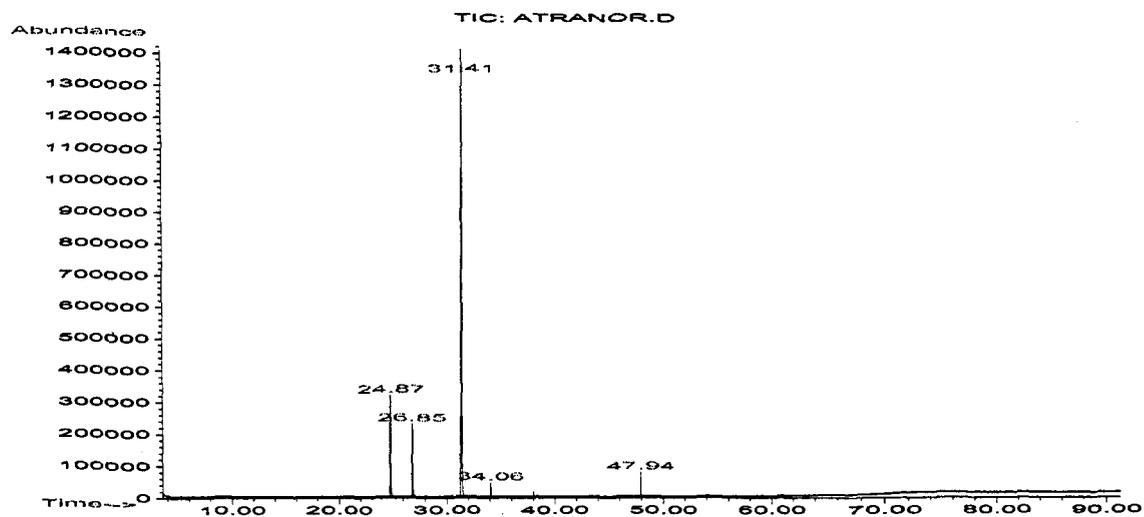
Cladina stellaris: Extraits no 7 (entraînement à la vapeur)



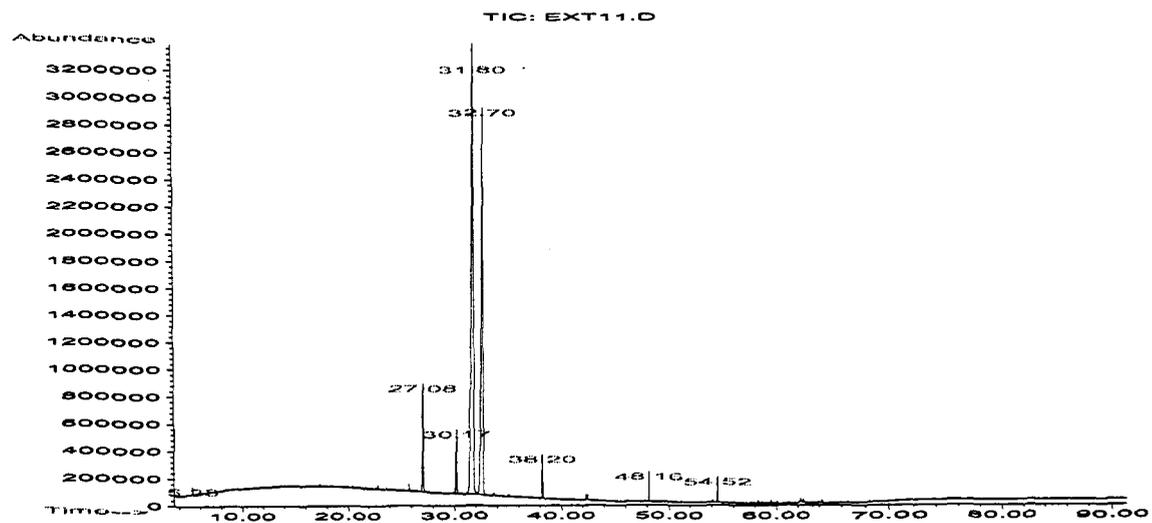
Cladina stellaris: Extraits no 8 (entraînement à la vapeur)



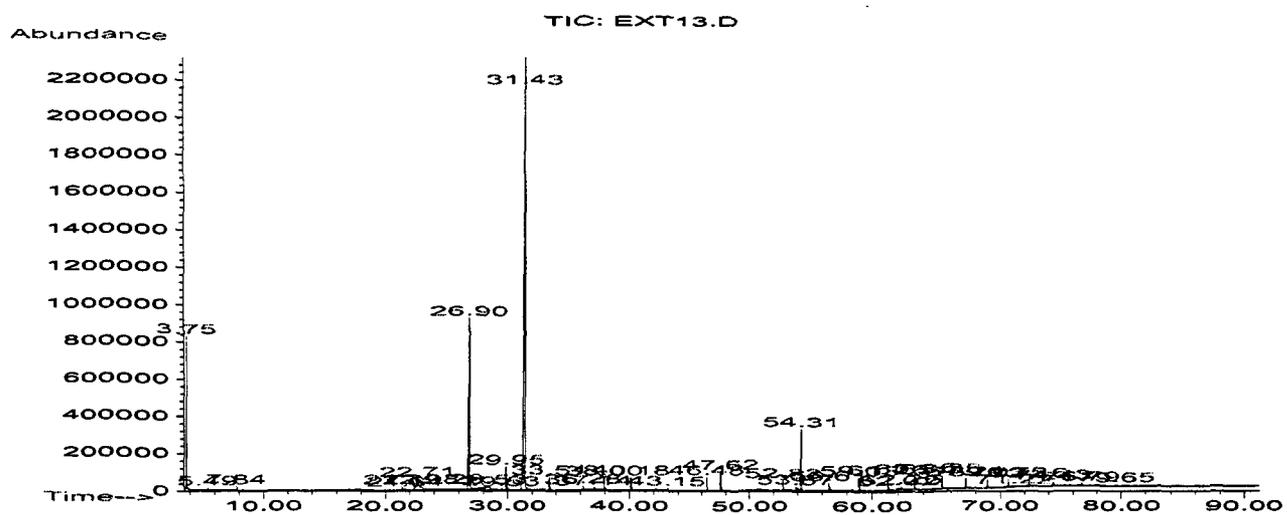
Cladina rangiferina : Acide atranorique (14)



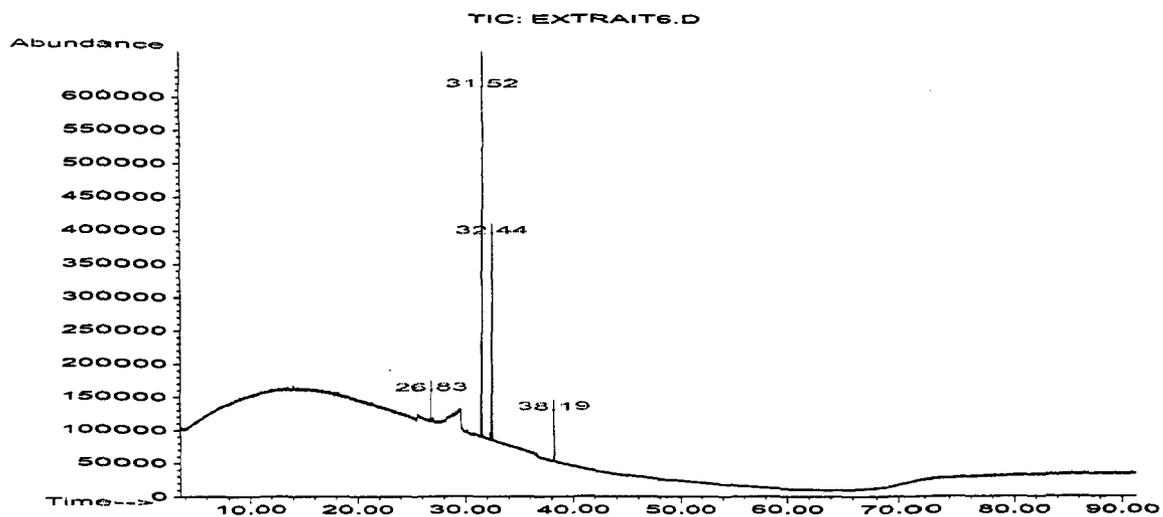
Cladina rangiferina : Extrait no 1 (CHCl₃)



Cladina rangiferina : Extrait no 2 (acétone)

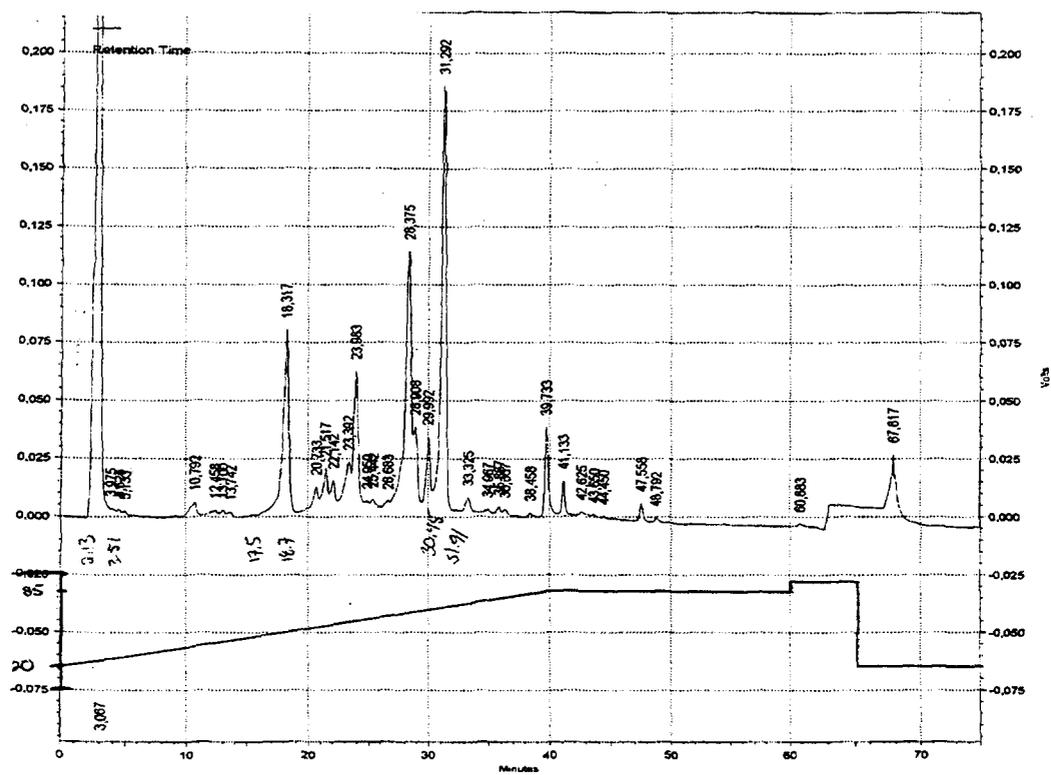


Cladina rangiferina : Extrait no 3 (EtOH)



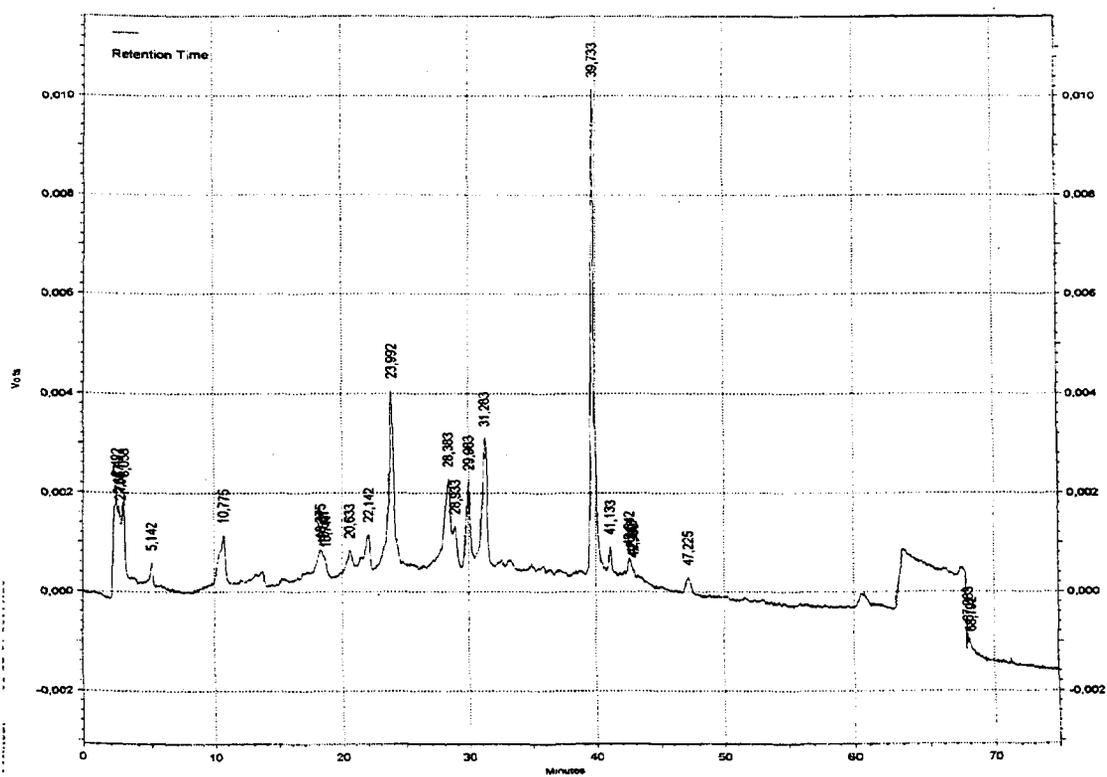
ANNEXE 6

CHROMATOGRAMMES DES ANALYSES HPLC (SHIMADZU)

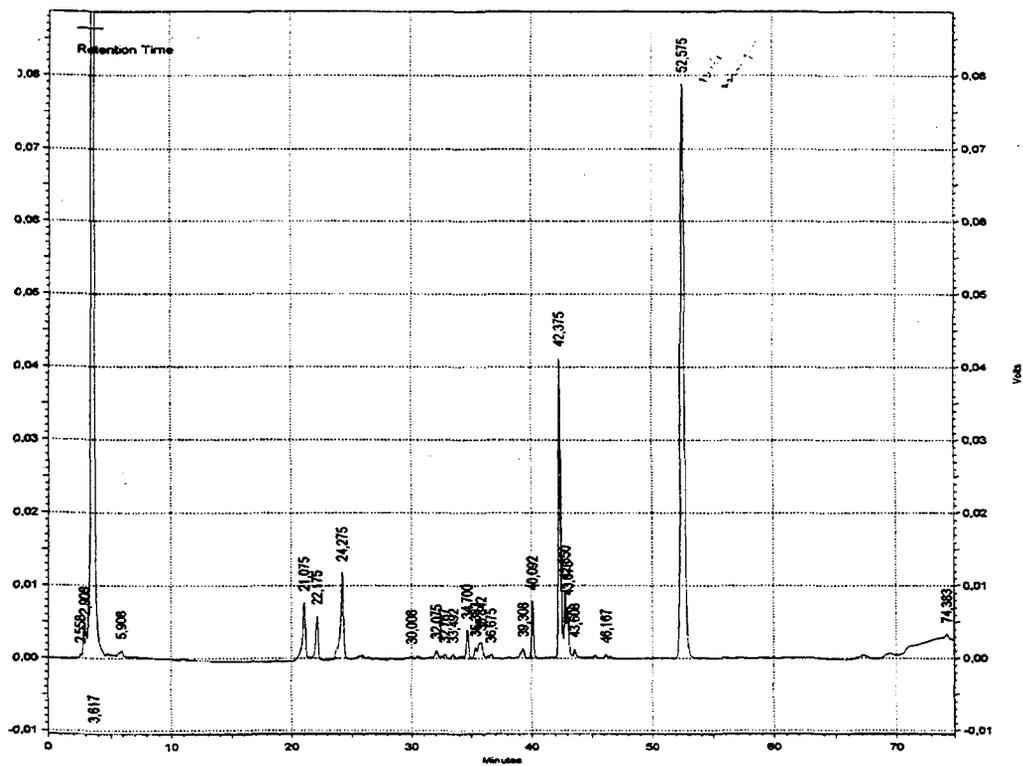
Cladina rangiferina : Analyse préliminaire (extrait EtOH- H₂O**à 270nm)**

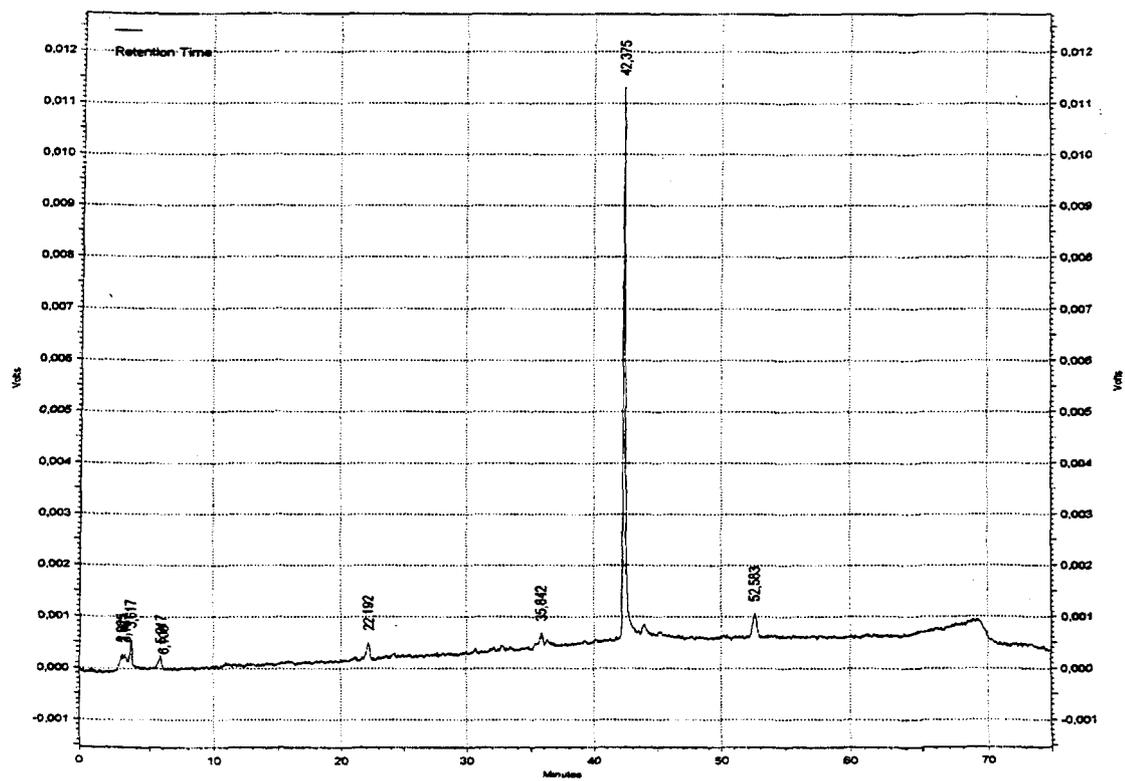
Cladina rangiferina : Analyse préliminaire (extrait EtOH-H₂O

à 370nm)

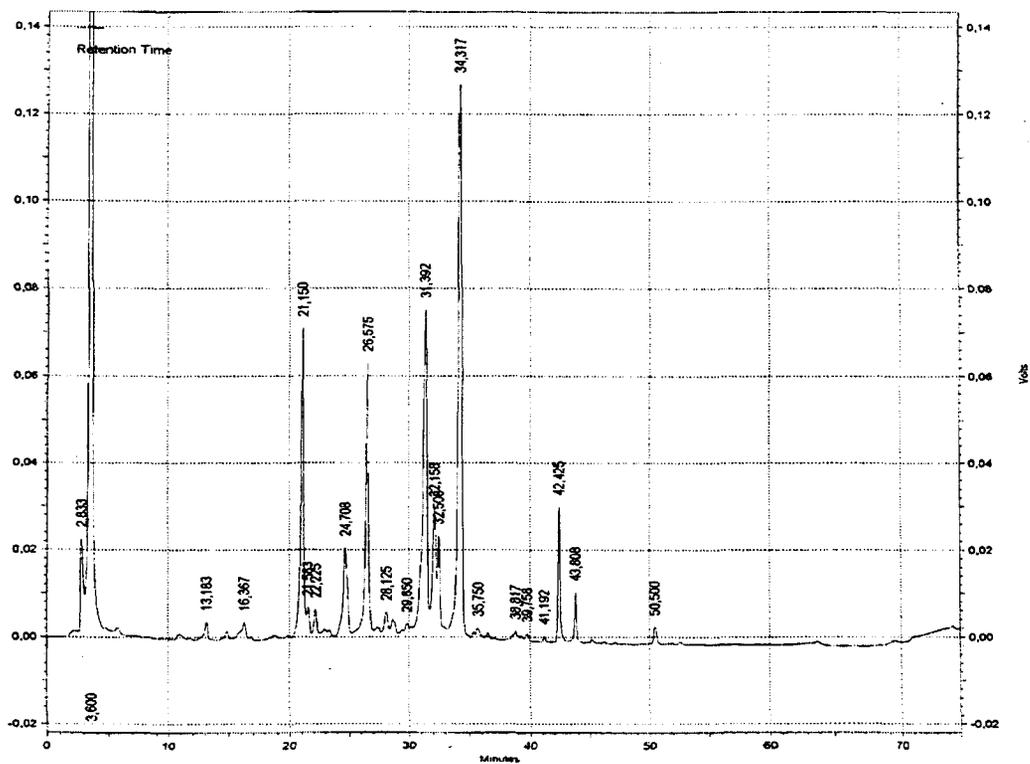


Cladina stellaris : Extrait EtOH-H₂O (270nm)

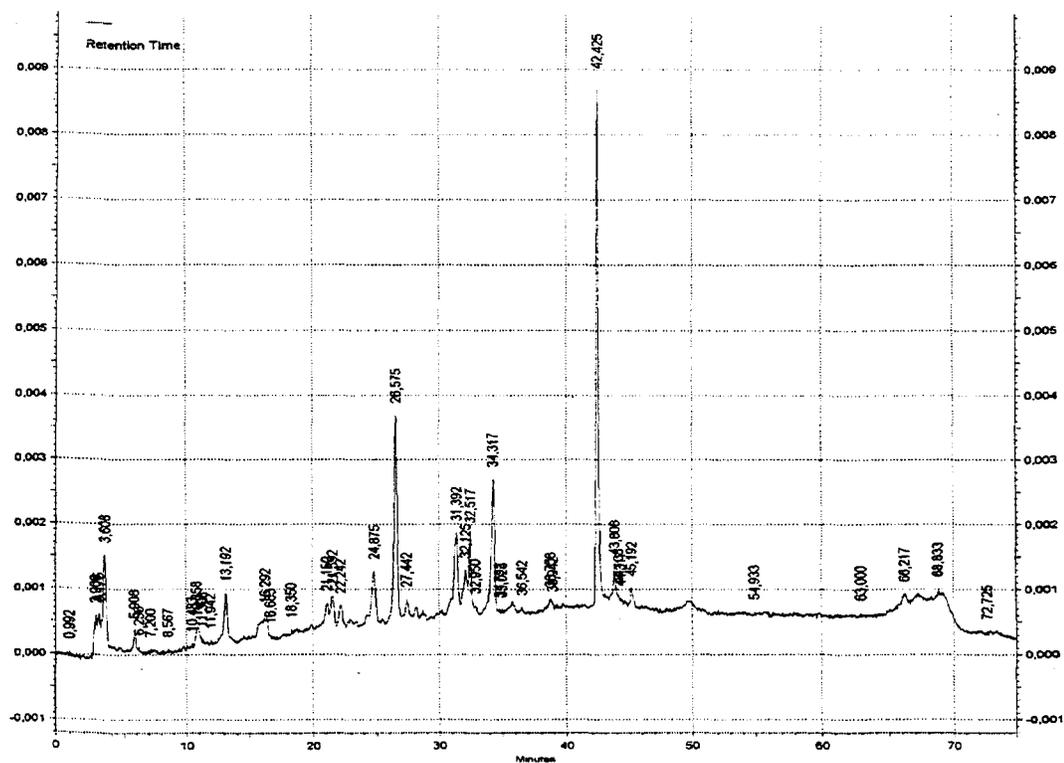


Cladina stellaris : Extrait EtOH- H₂O (270nm)

Cladina rangiferina : Extrait EtOH- H₂O (270nm)



Cladina rangiferina : Extrait EtOH- H₂O (370nm)



ANNEXE 7

CHROMATOGRAMME HPLC (PERKIN ELMER)

Cladina stellaris : Fraction 90 % MeOH ag

