

# La microcristallisation des substances lichéniques un outil performant pour le lichénologue

par Jacques LAGABRIELLE  
11, rue J.-P. Cailloux, 57730 VALMONT  
mic.lagabrielle@wanadoo.fr

**Résumé** : Présentation du matériel et des produits utilisés pour la microcristallisation. Exposé pratique de la méthode. Application de la méthode à l'étude des substances lichéniques de quelques espèces du genre *Ramalina* Ach.

## Introduction

« Avant 1936 il n'y avait pas de méthode facile pour identifier les acides lichéniques si ce n'est par de lourdes techniques microchimiques. De 1936 à 1940 ASAHINA publie des séries d'articles dans le "Japan Journal of botany", concernant une méthode simple pour l'étude chimique par cristallisation des acides lichéniques les plus courants. Ces tests standardisés permettent, à un botaniste n'ayant aucune expérience en chimie organique, de faire des identifications sûres de ces acides » (HALE, 1961).

Cette méthode, dite d'ASAHINA, consiste à faire cristalliser les substances lichéniques présentes dans un échantillon de lichen à étudier, à l'aide de réactifs particuliers, qualifiés de réactifs cristallogènes. Des cristaux caractéristiques de la substance lichénique se forment et sont observés entre polaroïds croisés avec un microscope équipé d'un système de polarisation (GAVÉRIAUX, 2003).

Largement utilisée jusqu'à la fin des années soixante, cette technique (ASAHINA, 1936-1940) a été supplantée par une technique nouvelle, particulièrement performante, celle de la Chromatographie sur Couche Mince (SANTESSON, 1967 ; CULBERSON, 1969). Toutefois, nous pensons que cette ancienne technique, rapide à mettre en place, ne nécessitant qu'un matériel simple, utilisable sans précautions particulièrement sévères, pouvait encore nous rendre service pour la détermination de lichens ne contenant qu'un nombre très limité de substances chimiques.

## 1. Matériel et méthode

### a. Matériel pour la microcristallisation

- Une plaque chauffante (type chauffe plat) dont la température peut être stabilisée vers 50° ou moins (l'acétone bout à 50°C).
- Des lames et des lamelles pour la microscopie.
- Des tubes à essais en verre (type hémolyse) ou tube PVC type « Eppendorf ».
- Un jeu de pipettes Pasteur.
- Un microscope à grossissement x1000 équipé d'un système de polarisation.

### **b. Produits chimiques pour la microcristallisation**

- De l'acétone et de l'hexane pour extraire les substances lichéniques.

- Des réactifs cristallogènes

Nous utilisons les mélanges mis au point par HUNECK et YOSHIMURA (1996) et ORANGE et al. (2010).

GAW = Glycérol - Éthanol - Eau (1-1-1)  
GE = Glycérol - Acide acétique glacial (3-1)  
GAAn = Aniline - Glycérol - Éthanol (1-2-2)  
GAoT = *o*-Toluidine - Glycérol - Éthanol (1-2-2)  
GWPy = Pyridine - Glycérol - Eau (1-1-3)  
GAQ = Quinoline - Glycérol - Éthanol (1-2-2)  
KK = Hydroxyde de potassium (KOH) 5 g  
Carbonate de Potassium (K<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>) 20 g  
Eau distillée 100 ml

*(Les symboles des réactifs sont de Asahina et viennent de l'Allemand . A = Alkohol = Ethanol = Alcool / E = Essigsäure = Acide acétique / G = Glycerin = Glycerol / W = Wasser = Eau)*

### **c. Les produits pour les réactions colorées thallines**

La **potasse** ou hydroxyde de potassium (notée **K**) : en solution aqueuse (10 à 40%) conservée dans un petit flacon muni d'une spatule.

L'**eau de javel** ou hypochlorite de sodium (notée **C**) : on utilise la solution concentrée du commerce (vendue en berlingots) à renouveler tous les 1 à 2 mois ou la solution d'hypochlorite de sodium, NaOCl, à 6%, stabilisée et qui se conserve facilement plus de 18 mois.

La **paraphénylènediamine** (para 1-4 phénylènediamine notée **P**) : préparée au moment de l'emploi en dissolvant dans un verre de montre, un ou deux petits cristaux de paraphénylènediamine dans une goutte d'alcool absolu correctement appelé éthanol anhydre (à défaut prendre de l'alcool à 95).

La solution alcoolique s'oxyde très rapidement, elle devient brune et ne peut plus être utilisée après quelques heures. Il est possible de stabiliser le réactif pour quelques mois en utilisant les proportions suivantes (que l'on peut diviser selon ses besoins).

paraphénylènediamine ..... 1 g  
sulfite de sodium ..... 10 g  
détergent ..... 1 mL  
ou mieux, 1g de SDS (Sodium-Dodécyl-Sulfate)  
agent tensio-actif ne moussant pas et dépourvu  
d'additifs souvent mis dans les détergents)  
Eau bidistillée ..... 100 mL

### **d. Méthodologie**

1. Régler la plaque chauffante à environ 40°C- 50°C.
2. Poser une lame et une lamelle sur la plaque.

3. Déposer au milieu de la lame un fragment de thalle du lichen à étudier, d'environ  $\frac{1}{4}$  de  $\text{cm}^2$ , entier, propre.
4. Sur le fragment déposer une goutte d'acétone, attendre son évaporation, passer à la goutte suivante et ainsi de suite jusqu'à l'apparition nette d'un dépôt circulaire blanchâtre, jaunâtre ou transparent.  
- On obtiendra une extraction plus complète et plus pure des substances lichéniques d'un échantillon de thalle en le broyant ou en le coupant finement, l'ensemble sera mis dans un tube à hémolyse en verre et couvert d'acétone. Après plusieurs heures "d'infusion", on récoltera l'acétone contenant les substances à travers un coton ; cet extrait très concentré, sera déposé goutte après goutte sur la lame, (LOHÉZIC-LE DÉVÉHAT, 2012).
5. Prendre la lame et observer le dépôt de substances au microscope x100, des cristaux caractéristiques sont parfois visibles (ex : acide divaricatique).
6. Retour de l'ensemble sur la plaque; enlever les fragments de thalle et tout autre déchet.
7. Déposer sur le dépôt une goutte du milieu de cristallisation le mieux adapté à la substance que vous cherchez à confirmer.
8. Poser sur cette goutte très doucement la lamelle préalablement posée sur la plaque chauffante (afin que lame et lamelle aient la même température). Le milieu de cristallisation épouse les quatre bords, c'est parfait ; il en manque un peu, déposer une petite goutte sur le bord où un vide d'air persiste, mais ne pas écraser la lamelle.
9. Pour GE et GAW vous pouvez laisser la lame 10 mn ou plus sur la plaque à 40-50°C le temps de la dissolution du dépôt, pour les autres réactifs ne pas dépasser 30°C ou mieux, opérer à température ambiante.

- L'observation des cristaux se fait à des grossissements de x50, x100, x600, x1000 en lumière naturelle puis en lumière polarisée-analysée, certains apparaissent très rapidement (acide usnique), d'autres ne sont bien visibles qu'après plusieurs heures. La détermination des cristaux se fait par comparaison avec la littérature disponible, sous forme de photographies, de dessins, de textes descriptifs (cf. références 2, 5, 9, 14, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 27, 29, 34 et 35).

- Il est possible de conserver certaines préparations quelques semaines, voire quelques années, au moins 3 (à l'exception des cristaux formés avec K et KK), et de se créer sa propre « cristallothèque lichénique ».

- Mode opératoire pour réaliser une préparation permanente :

- Faire en sorte que le réactif cristallogène ne dépasse pas les bords de la lamelle.
- Lutter avec du vernis à ongle transparent « protégé vernis » :
  - Par points, les quatre angles de la lamelle. Laisser sécher 10 mn.
  - Lutter la lamelle tout autour (la lamelle ne doit pas bouger pendant l'opération).
  - Ranger la préparation étiquetée, à plat dans une boîte porte-lames.

Remarques sur l'utilisation de la méthode d'ASAHINA

- La plupart des substances sont extraites avec l'acétone (solvant polaire), d'autres avec l'hexane (solvant non polaire). On peut aussi faire des extractions fractionnées du même fragment d'abord à l'hexane, puis à l'acétone, on obtient ainsi deux extraits, l'extrait à l'acétone étant "allégé" des substances dissoutes dans l'hexane.

- La détermination d'un lichen nécessite l'étude de sa morphologie, de son écologie et de sa composition chimique. On entreprendra l'étude des substances lichéniques par microcristallisation d'une espèce lorsque celle-ci aura été déterminée au plus juste ou lorsqu'il y aura doute ou hésitation entre plusieurs espèces, la chimie étant déterminante pour les séparer. Les réactifs classiques K, C et P, seront utilisés en première approche, avec rigueur, sur le thalle, la médulle, soit directement, soit par l'intermédiaire de papier filtre ou par extraction par l'acétone des substances sur papier filtre (RAMAUT, 1962 ; GAVÉRIAUX, 2003). On peut aussi utiliser les réactifs classiques directement sur l'extrait à l'acétone déposé sur la lame ; la progression et la sensibilité de la réaction sont démonstratives à la loupe binoculaire comme au microscope (sous lamelle !).
- De nombreuses substances sont présentes dans un dépôt, indétectables par microcristallisation : concentration trop faible, technique non adaptée. Elles peuvent perturber la formation de cristaux.
- Un dépôt de substance trop épais nuit à sa dissolution et à la formation de cristaux, qui, trop "serrés", ne peuvent se développer.
- Bien choisir le milieu de cristallisation le mieux adapté à la substance recherchée pour éviter des cristallisations parasites des diverses substances.
- Des substances étrangères au lichen étudié (ex : sable) peuvent correspondre à de splendides cristaux ... à photographier !
- Toute technique demande un peu de savoir faire, "s'entraîner" sur des échantillons bien déterminés aux substances connues. Se créer une « cristallothèque lichénique » sous forme de lames permanentes et de photographies.

**Application de la méthode de microcristallisation**  
**à quelques espèces du genre *Ramalina* Ach.,**  
**« avec des soralies, exceptionnellement (26. *R. requienii* et 28. *R. maciformis*) aussi**  
**avec des isidies, granuliformes ; assez souvent avec des pseudocyphelles**  
**punctiformes ou allongées. Apothécies très rarement présentes.**

(extrait de la clé de détermination des *Ramalina* de CLAUZADE et ROUX, 1985)

Ce groupe d'espèces se prête particulièrement bien à cette étude :

1. Toutes ces espèces contiennent de l'acide usnique en quantité variable.
2. Les réactions du thalle et de la médulle sont souvent négatives aux réactifs classiques, K, C, P.
3. Des substances lichéniques majoritaires, caractéristiques de chaque espèce sont détectables par microcristallisation.
4. Ces espèces présentent souvent une morphologie parfois déroutante.

Tableau synthétique des substances lichéniques, associées aux espèces du genre *Ramalina* Ach., "avec des soralies, exceptionnellement aussi avec des isidies granuliformes".

<u>Substances lichéniques</u>	<u>Exemples d'espèces témoins</u>	<u>Réactifs cristallo-gènes</u>	<u>Espèces du genre <i>Ramalina</i> Ach. concernées</u>	<u>Ecologie simplifiée</u>
Wirth, 1995 T1 p. 34-36.	Boissière, 1991. Orange, James et White, 2010.	Asahina, 1936-1940. Huneck et Yoshimura, 1996.	Clauzade et Roux, 1985 : 661-664 (traduction Duclaux : 7-11).	Roux et coll., 2010 (sous presse).
<u>Acide bourgéganique</u> (K-, C-, KC-, P-)	<i>Cladonia conista</i> <i>Ramalina lacera</i>	GAW, GE.	<i>Ramalina lacera</i>	Corticole. Thermo-, mésoméditerranéen et collinéen (chaud).
<u>Acide divaricatique</u> (K-, C-, KC-, P-)	<i>Ophioparma ventosa</i> <i>Ramalina canariensis</i>	GE, GAW.	<i>Ramalina canariensis</i>	Saxicole, calcifuge, héliophile. Thermoméditerranéen.
<u>Acide évernique</u> (K-, C-, KC-, P-)	<i>Evernia prunastri</i> <i>Ramalina fastigiata</i>	GE	<i>Ramalina requienii</i> <i>Ramalina obtusata</i>	Corticole. Thermo-, mésoméditerranéen inférieur et collinéen (chaud). Saxicole, calcifuge, héliophile. Méso- et supra-méditerranéen.
<u>Acide hypoprotocétrarique</u> (K-, C-, KC-, P-)	<i>Pleurosticta acetabulum</i> <i>Phlyctis argena</i> <i>Xanthoparmelia conspersa</i>	GE, GWPY, GAQ. GAoT, GAAAn. KK	<i>Ramalina farinacea</i> var. <i>hypoprotocetrarica</i> <i>Ramalina subfarinacea</i> (chénotype)	Corticole. Étages montagnard et subalpin. Corticole, saxicole. Supraméditerranéen, collinéen à subalpin.
<u>Acide norstictique</u> (K+ jaune/rouge, C-, KC-, P+ jaune)	<i>Hypotrachina endochlora</i> <i>Ramalina obtusata</i>	GE.	<i>Ramalina maciformis</i> <i>Ramalina obtusata</i>	Corticole. Etage mésoméditerranéen à subalpin. Saxicole, héliophile. Thermoméditerranéen à collinéen supérieur.

Tableau synthétique des substances lichéniques, associées aux espèces du genre *Ramalina* Ach., "avec des soralies, exceptionnellement aussi avec des isidies granuliformes".

<u>Substances lichéniques</u>	<u>Exemples d'espèces témoins</u>	<u>Réactifs cristallologènes</u>	<u>Espèces du genre <i>Ramalina</i> Ach. concernées</u>	<u>Ecologie simplifiée</u>
Wirth, 1995 T1 p. 34-36.	Boissière, 1991. Orange, James et White, 2010.	Asahina, 1936-1940. Huneck et Yoshimura, 1996.	Clauzade et Roux, 1985 : 661-664 (traduction Duclaux : 7-11).	Roux et coll., 2010 (sous presse).
<u>Acide protocétrarique</u> (K+ jaune brun, C-, KC-, P+ rouge)	<i>Flavoparmelia caperata</i>	GAoT, GAAAn, GAW.	<i>Ramalina farinacea</i> <i>Ramalina subfarinacea</i> (chémotype)	
<u>Acide salaziniqique</u> (K+ jaune/rouge, C-, KC-, P+ jaune)	<i>Parmelia sulcata</i>	GAoT, GAAAn, KK.	<i>Ramalina farinacea</i> var. <i>reagens</i> - <i>Ramalina subfarinacea</i> (chémotype) <i>Ramalina maciformis</i>	
<u>Acide sékikaïque</u> (K-, C-, KC-, P-)		GE, GWPy, GAAAn, GAoT.	<i>Ramalina portuensis</i> <i>Ramalina roesleri</i>	Corticole. Portugal et Angleterre (Cornouailles). Corticole, extrêmement aérophile, ombrophile. Méso-méditerranéen à montagnard.
<u>Acide usnique</u> (K-, C-, KC+ jaune, P-)	<i>Flavoparmelia caperata</i> <i>Usnea</i> sp. <i>Xanthoparmelia conspersa</i>	GE, GAW, GAAAn.	<i>Ramalina polymorpha</i> (Ach.) Ach. (sens large) Toutes les autres espèces du genre <i>Ramalina</i> Ach. en plus ou moins grande quantité	Saxicole, calcifuge.

**Remarques sur le tableau synthétique des substances des espèces issues d'une sélection de *Ramalina* Ach.**

Sur les dix substances rencontrées dans ce groupe d'espèces, six ne réagissent à aucun des réactifs classiques K, C ou P.

Les acides norstictique (K+, P+ jaune), salazinique (K+, P+ jaune) et protocétrarique (K-, P+ rouge) ont des réactions parfois très semblables, mais nous donnent de bonnes pistes.

L'acide usnique, commun à toutes les espèces est KC+ (jaune), mais la réaction est souvent difficile à voir. Essayer une solution à l'alcool de chloramine-T, plus performante (THOMSON, 1967).

La microcristallisation de toutes ces substances est possible et bien documentée.

Acide bourgéalique

Réactifs GAW ou GE, longues aiguilles fines indépendantes en éventail, déjà bien visibles en lumière polarisée x50. Très bonne conservation de la préparation. Extraction de *Ramalina lacera*. Pas d'échantillon de *Ramalina maciformis*.

Acide divaricatique

Réactifs GAW ou GE, entrecroisement de cristaux en angles droits, spectaculaires en lumière polarisée. Les cristaux apparaissent le plus souvent groupés sur les bords extérieurs du dépôt. Conservation de la préparation trois à quatre mois. Extraction de *Ramalina canariensis* et de *Ramalina requienii*.

Acide évernique

Réactif GE, formation en éventail d'aiguilles serrées (GALUN, 1970), parfois ces éventails sont groupés en étoiles (TAYLOR, 1968). Très bonne conservation après plus de six mois. Extraction de *Ramalina pollinaria*. Pas d'échantillon de *Ramalina obtusata*.

Acide hypoprotocétrarique

Race chimique de *Ramalina farinacea* et de *Ramalina siliquosa* semble facile à révéler dans GE et GWPY (CULBERSON, 1965). Pas d'échantillon disponible.

Acide norstictique

Formation de très belles aiguilles droites rouges de 10 à 20 microns dans K, parfois aussi groupées en étoiles (la préparation ne se garde pas). Dans GAOt se développent de fines lamelles rhomboïdales d'environ 30x30 microns souvent regroupées (très bonne conservation de la préparation). Extraction de *Ramalina subfarinacea*.

Acide obtusatique

Réactifs GE ou GAQ d'après ASAHINA (1936-1940) et HUNECK et YOSHIMURA (1996). Pas d'échantillon de *Ramalina obtusata*.

Acide protocétrarique

Formation dans GAAn d'étoiles jaune vif d'environ 10 à 15 microns en lumière naturelle comme polarisée. En lumière polarisée une « Croix de Malte » noire apparaît dans ce soleil. Extraction à partir de *Flavoparmelia caperata*.

Acide salazinique

Formation d'aiguilles rouges courbes d'épaisseur inférieure à 1 micron, groupées en gerbes ou en sphères plus ou moins régulières dans KK, très caractéristiques à grossissement x1000 (la préparation ne se conserve pas). Dans GAoT se développent des cristaux fusiformes en formes de bateaux de 100 à 150 microns, souvent regroupés en étoiles irrégulières (bonne conservation de la préparation). Extraction à partir de *Parmelia sulcata*.

Acide sékikaïque

Rare substance lichénique, cristallisée par ASAHINA (1936-1940) et HUNECK et YOSHIMURA (1996) : formation de prismes rectangulaires dans GE, de lamelles rhomboïdales dans GAoT. *Ramalina roesleri* est très rare en France.

Acide usnique

Dans GE ou GAW formation de cristaux jaunes en lumière naturelle, transparents polychromes en lumière polarisée. Cristaux en aiguilles, en prismes, souvent groupés en étoiles à branches irrégulières. La présence d'autres substances en quantités importantes dans l'extrait ne favorise pas sa formation.



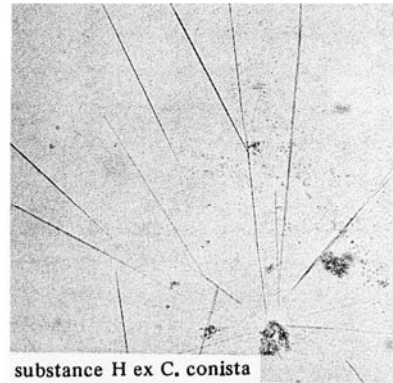
Acide bourgénéique



Figure 27. Substance H, dried extract from acetone, from *C. conista* ( $\times 70$ )

Thomson J.W. (1970)

K-, C-, KC- et P-

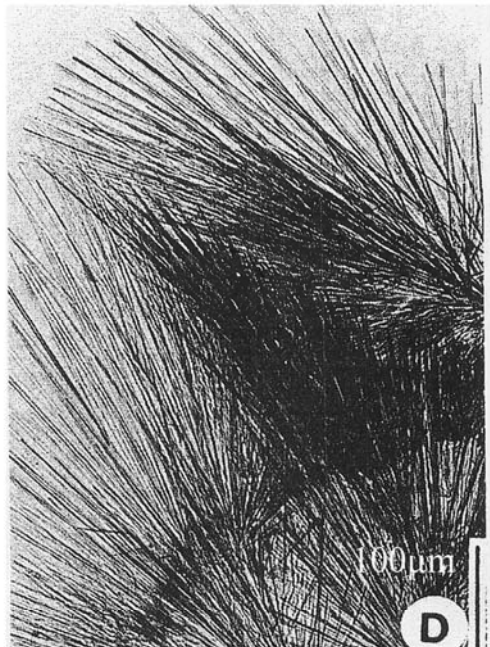


GAW

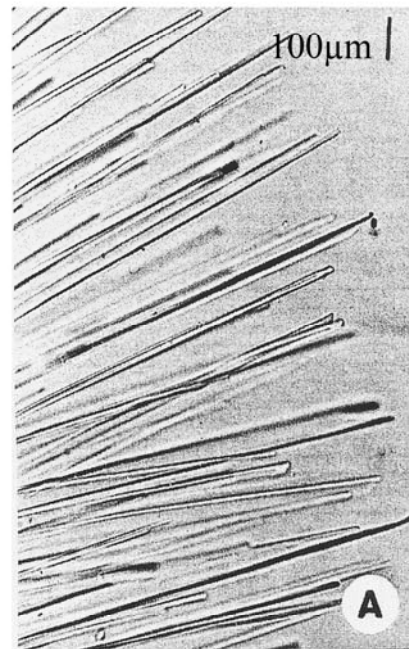
substance H ex *C. conista*

Taylor C.J. (1968)

GE

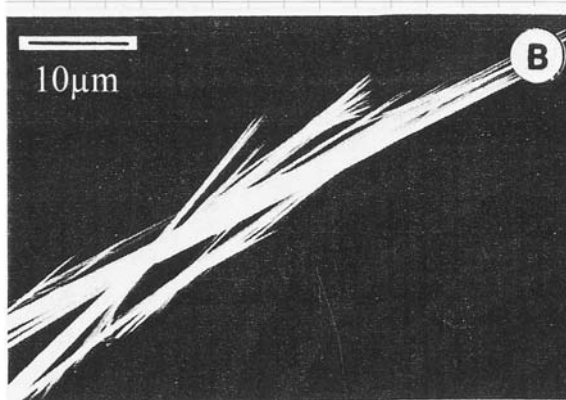


Huneck S. Yoshimura I. (1996)



GE

Huneck S. Yoshimura I. (1996)



GA.An. (rare)

formation d'aiguilles  
longues et indépendantes,  
en éventail dans GE et GAW

Huneck S. Yoshimura I. (1996)

d'après Thomson (1970), Taylor (1968), Huneck et Yoshimura (1996).

Acide divaricatique

K-, C-, KC- et P-

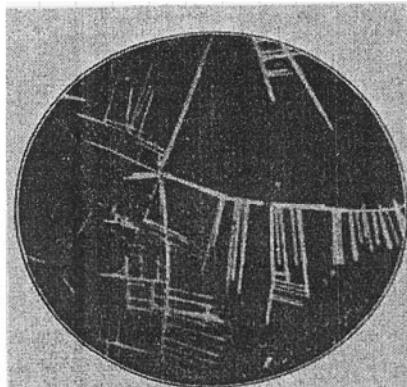


Fig. 24. Divaricatsäure-Krystalle aus der G.A.-Lösung.

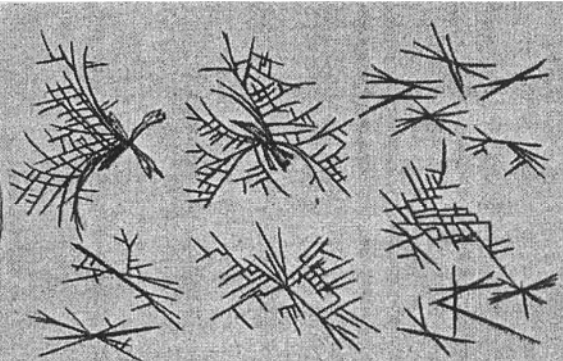
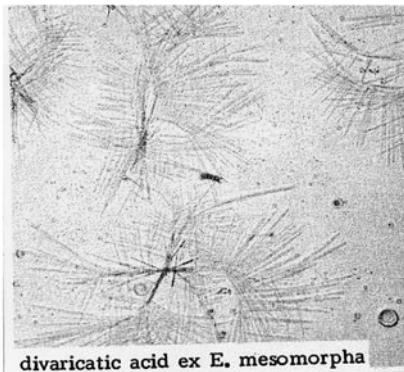


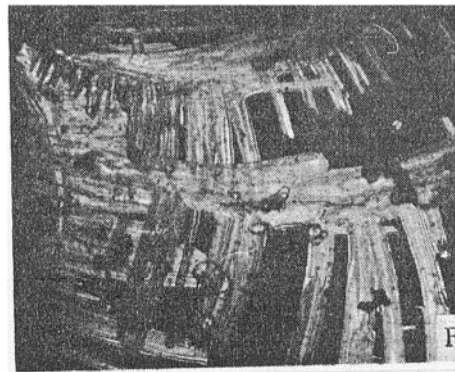
Fig. 25. Divaricatsäure-Krystalle aus der G.E.-Lösung.

Asahina Y. (1936-1940) - GA / CE

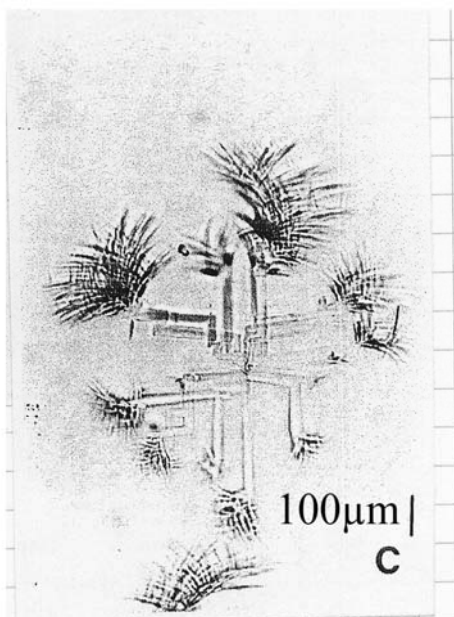


divaricatic acid ex *E. mesomorpha*

Taylor C.J. (1968) - GE



Hale M.E. (1969) - GAW



Huneck S. Yoshimura I. (1996)

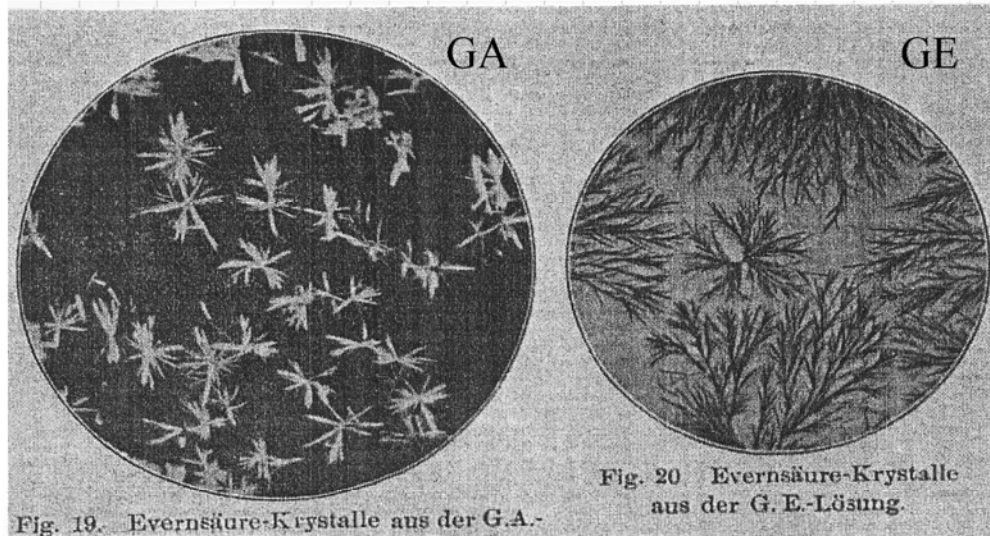
GE

entrecroisement de cristaux en angles droits, souvent sur les bords extérieurs du dépôt

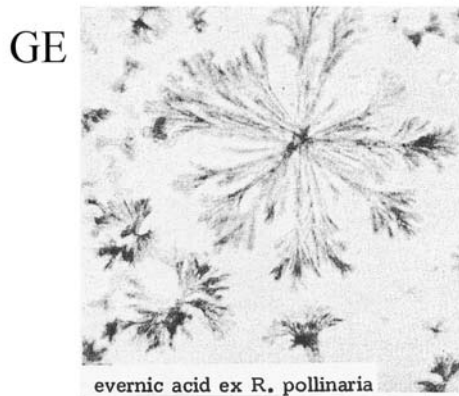
d'après Asahina (1936-40), Hale (1969), Huneck et Yoshimura (1996), Taylor (1968)

Acide évernique

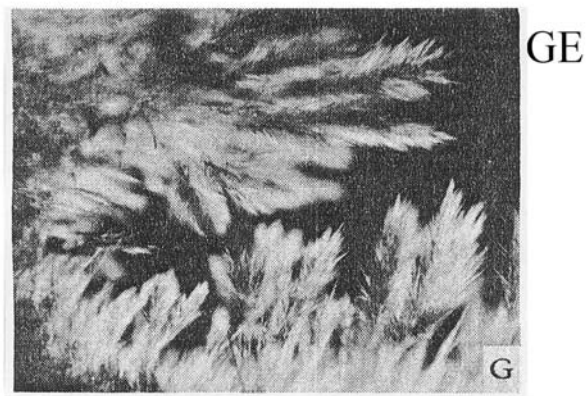
K-, C-, KC- et P-



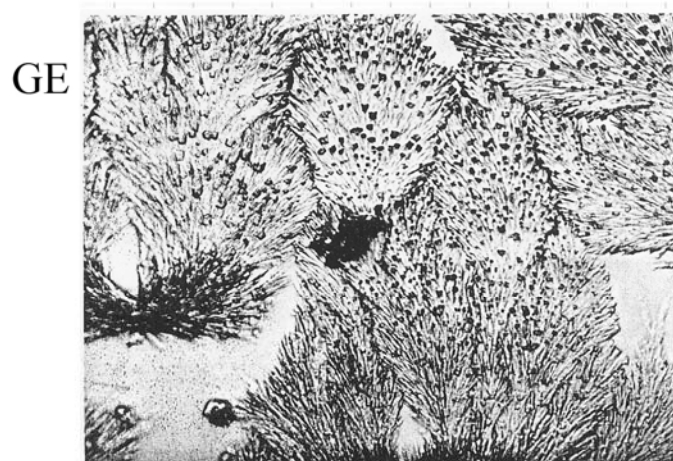
Asahina Y. (1936-1940) - [ éventails d'aiguilles ]



Taylor C.J. (1968)

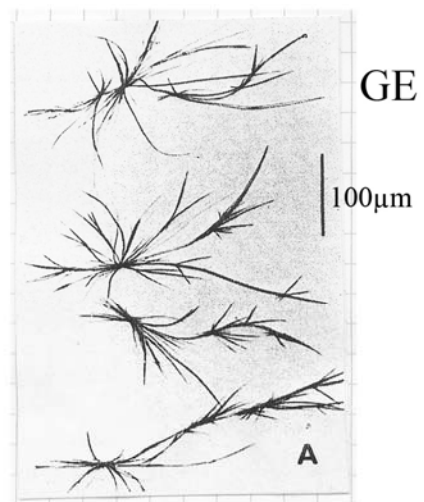


Hale M.E.. (1969)



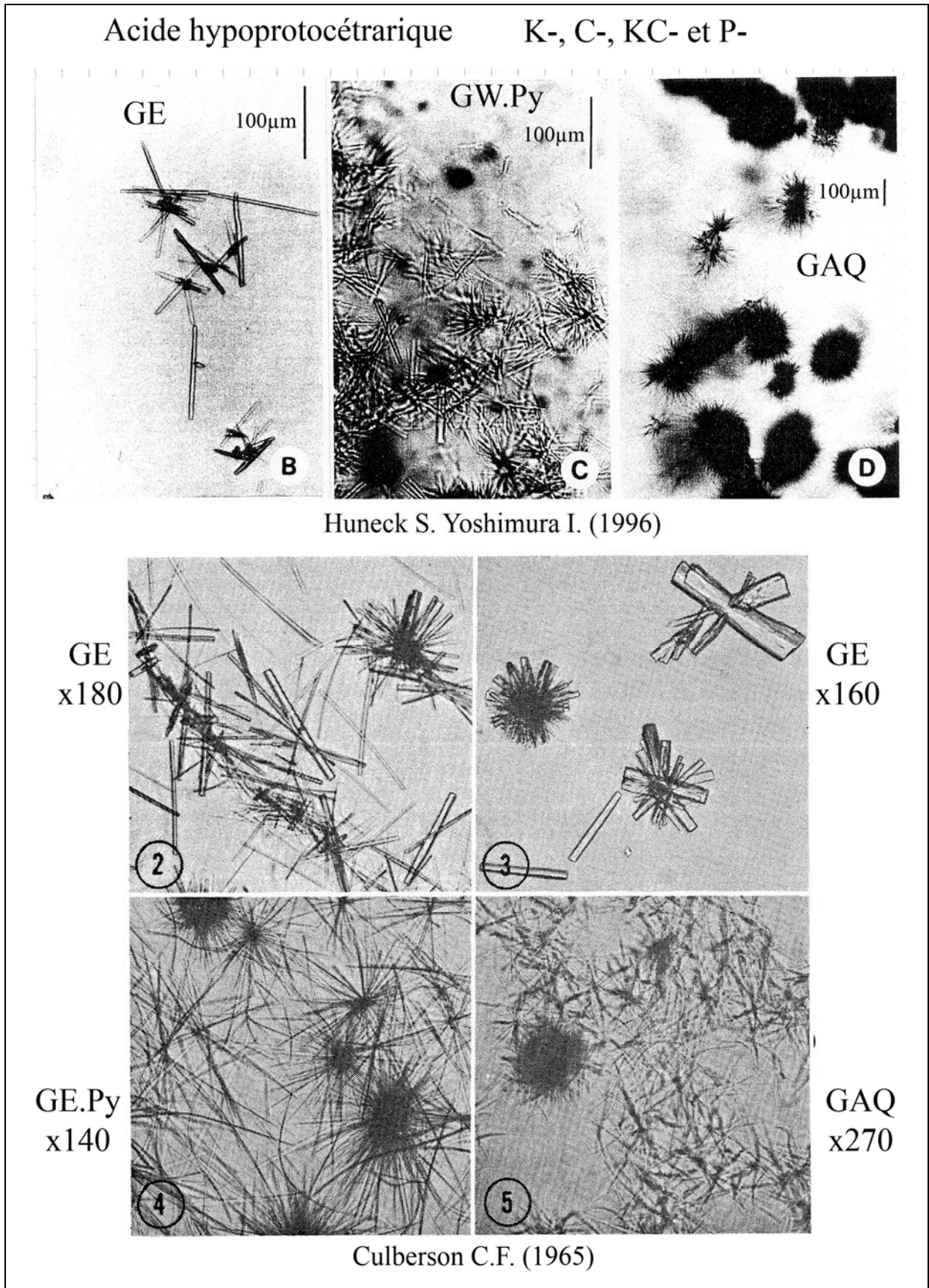
6. Evernic acid, in GE (× 500)

Galun M. (1970)



Huneck S. Yoshimura I. (1996)

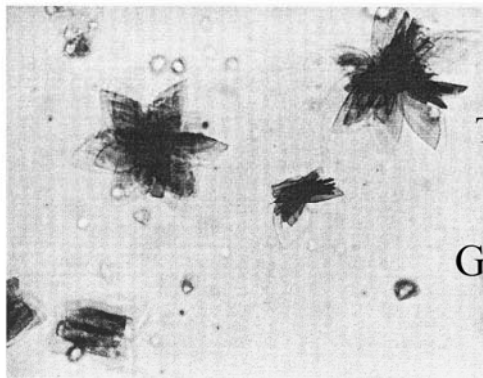
d'après Asahina (1936-40), Galun (1970), Hale (1969), Huneck et Yoshimura (1996), Taylor (1968)



d'après Culberson (1965), Huneck et Yoshimura (1996)

Acide norstictique

K<sup>+</sup> jaune puis rouge, C<sup>-</sup>, KC<sup>-</sup> et P<sup>+</sup> jaune

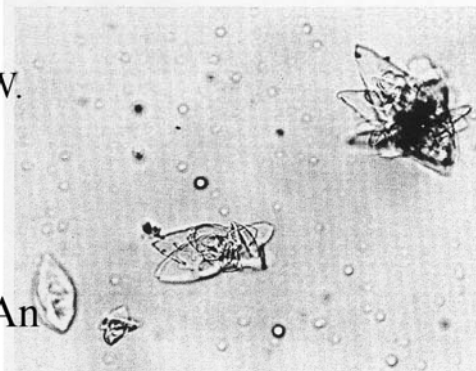


Thomson J.W.  
(1970)

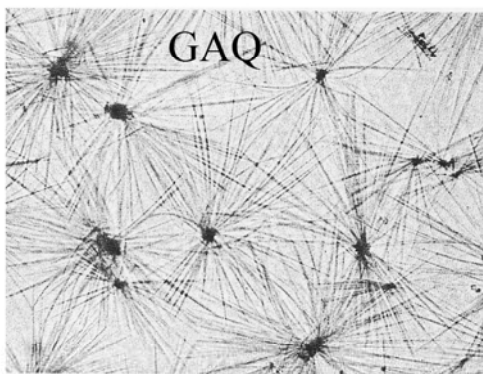
GAoT

Figure 29. Norstictic acid in G.A.o-T., from *C. polycarpoides* (×180)

Figure 40. Norstictic acid in G.A.An., from *C. polycarpoides* (×160)

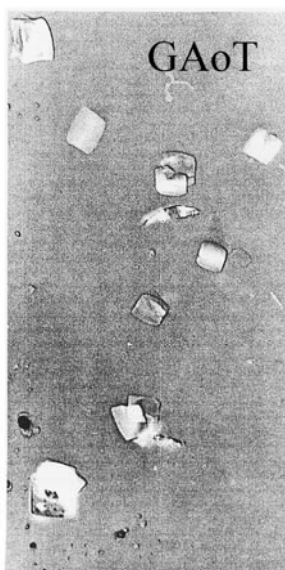


GAAn



GAQ

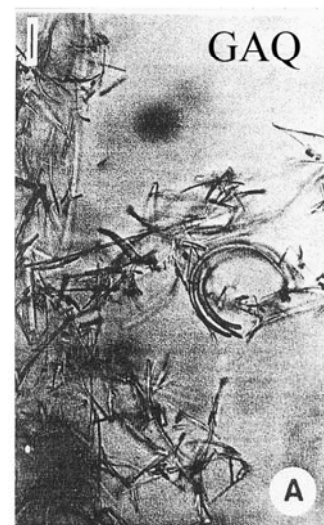
Thomson J.W. (1970)



GAoT

Galun M. (1970)

3. Norstictic acid, in GAoT (×100)



GAQ

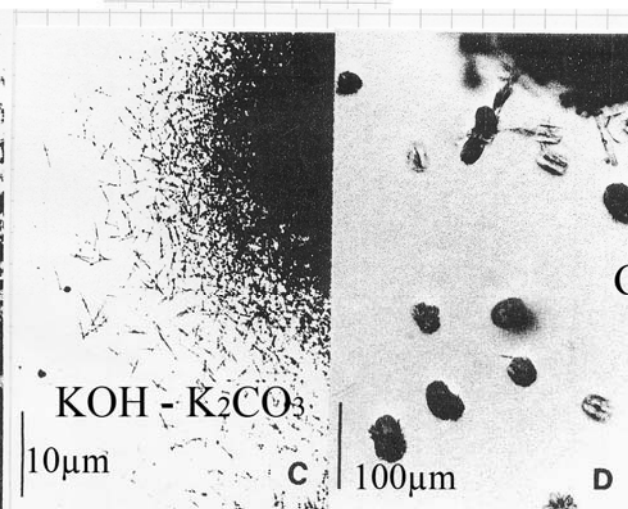
A



GAAn

10µm

B



KOH - K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

10µm

C

100µm

GAoT

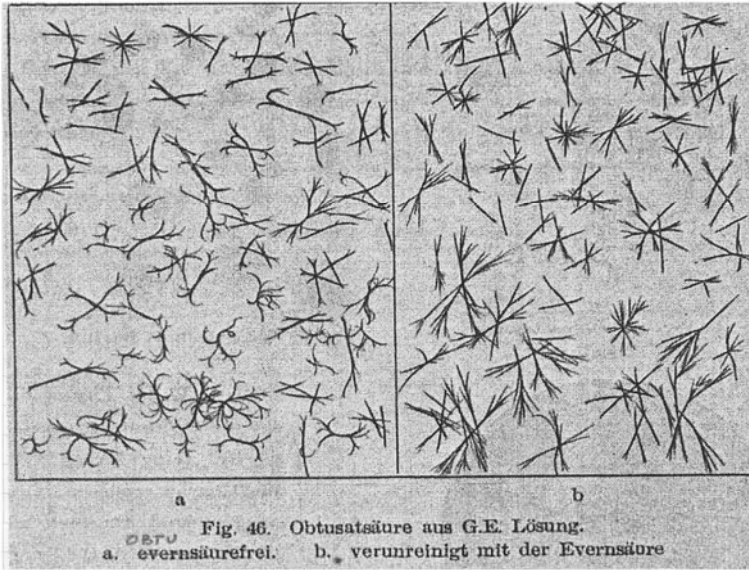
D

A à D : Huneck S. Yoshimura I. (1996)

d'après Galun (1970), Huneck et Yoshimura (1996), Thomson (1970)

Acide obtusatique

K-, C-, KC- et P-



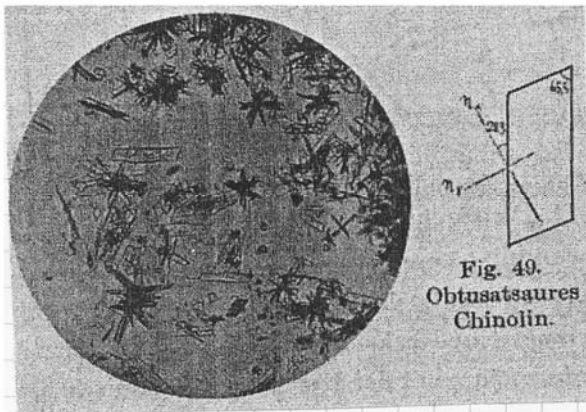
Asahina Y.  
(1936-1940)

GE

a) acide obtusatique

b) mélangé avec  
acide évernique

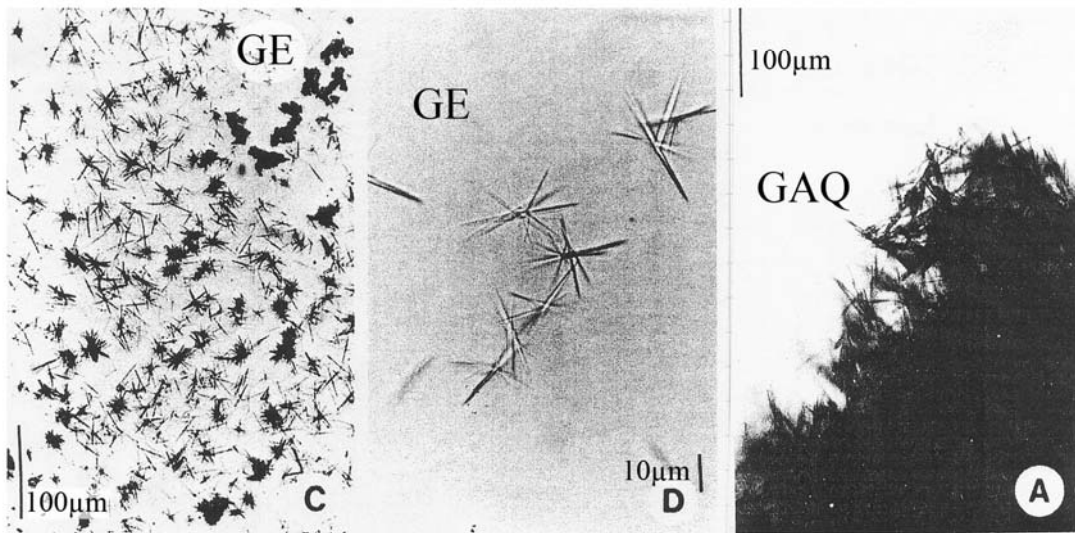
Fig. 46. Obtusatsäure aus G.E. Lösung.  
a. evernsäurefrei. b. verunreinigt mit der Evernsäure



Asahina Y.  
(1936-1940)

GAQ

Fig. 49.  
Obtusatsaures  
Chinolin.

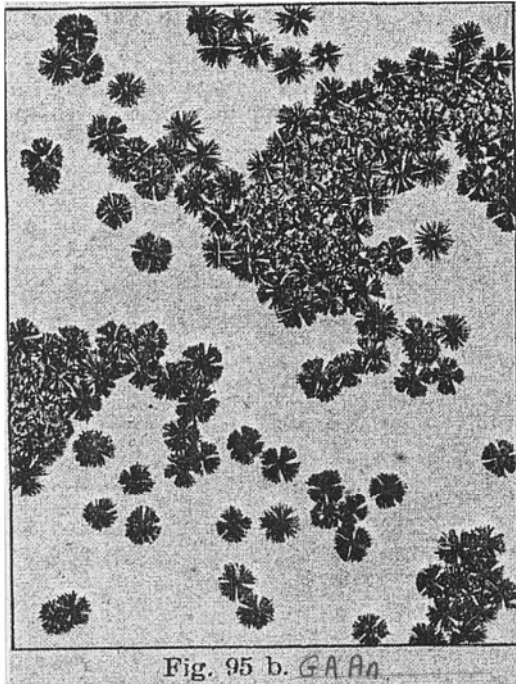


Huneck S. Yoshimura I. (1996)

d'après Asahina (1936-40), Huneck et Yoshimura (1996)

Acide protocétrarique

K+ jaune brun, C-, KC- et P+ rouge



GA.An

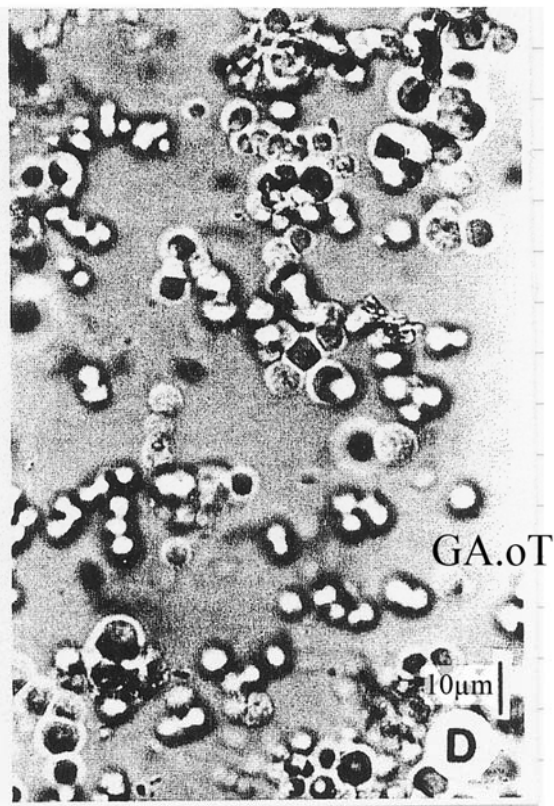
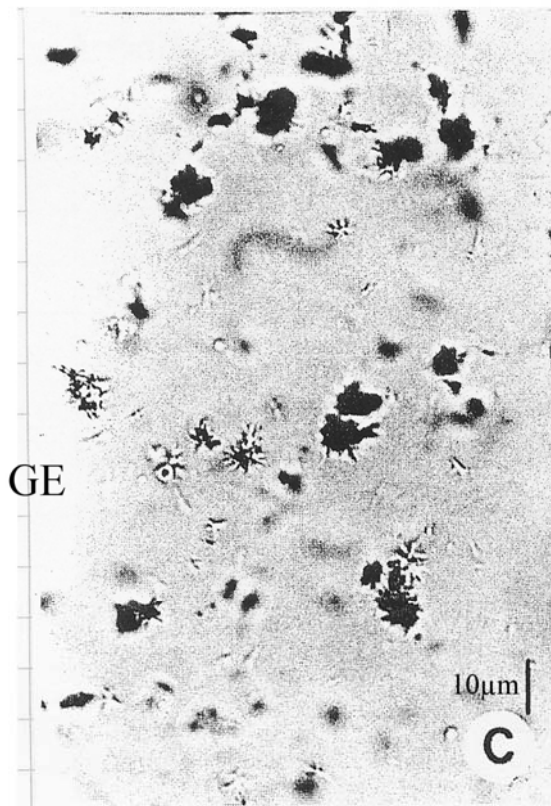
GAW



1. Protocetraric acid, in GAW ( $\times 500$ )  
(from Galun & Lavee, 1966)

Asahina Y. (1936-1940)

Calun M. (1970)

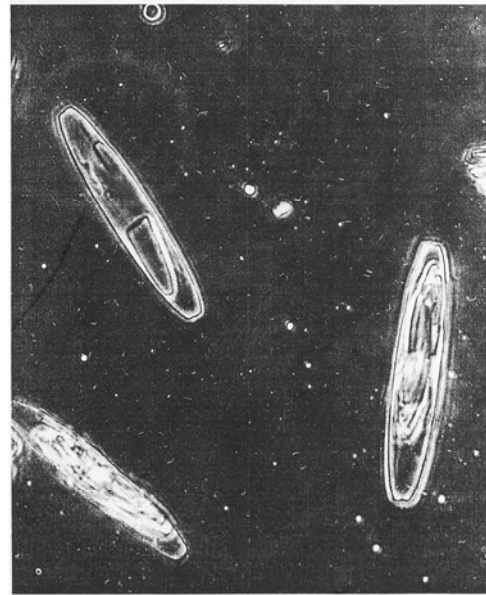
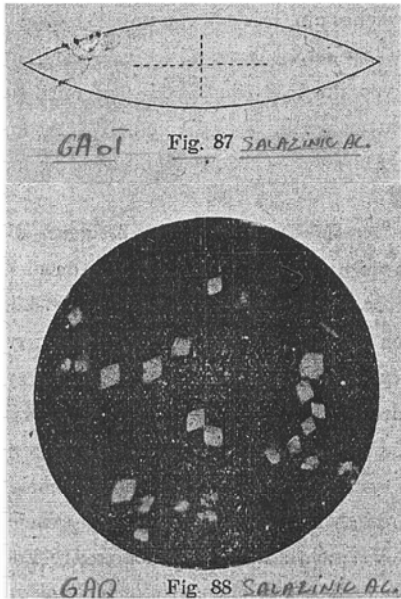


Huneck S. Yoshimura I. (1996)

d'après Asahina (1936-40), Galun (1970), Huneck et Yoshimura (1996)

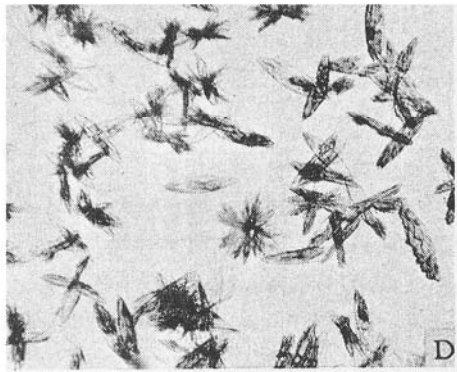
Acide salazinique

K<sup>+</sup> jaune puis rouge, C<sup>-</sup>, KC<sup>-</sup> et P<sup>+</sup> jaune



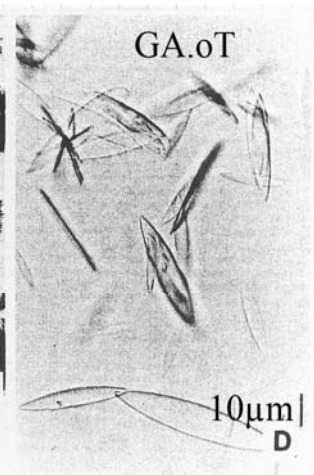
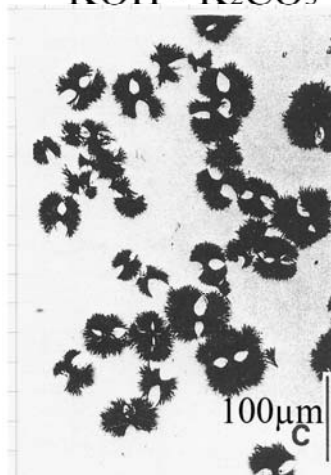
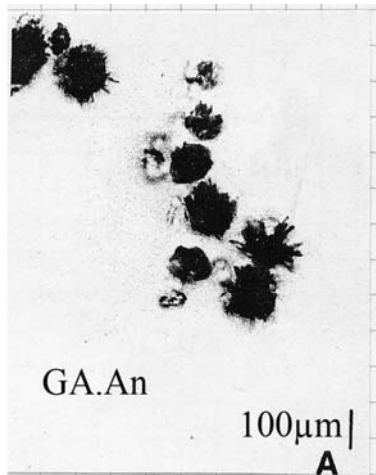
Asahina Y. (1936-1940)

Galun M (1970) - GA.oT



Hale M.E. (1969) - GA.oT

KOH - K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>



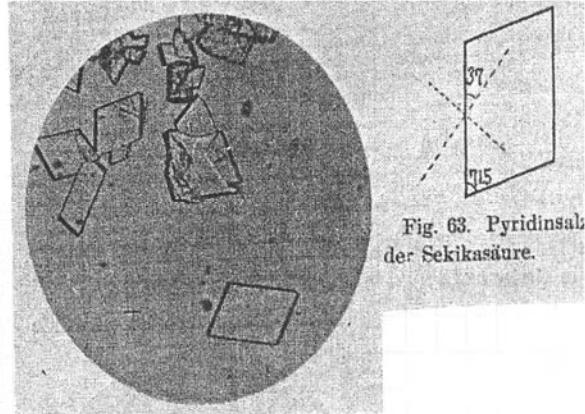
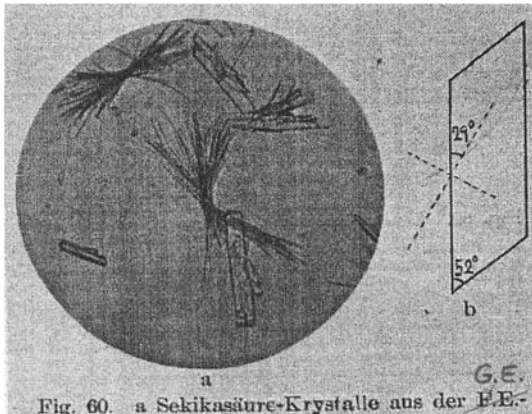
Huneck S. Yoshimura I. (1996)

d'après Asahina (1936-40), Galun (1970), Hale (1969), Huneck et Yoshimura (1996).



Acide sékikaïque

K-, C-, KC- et P-



Asahina Y. (1936-1940) - GE

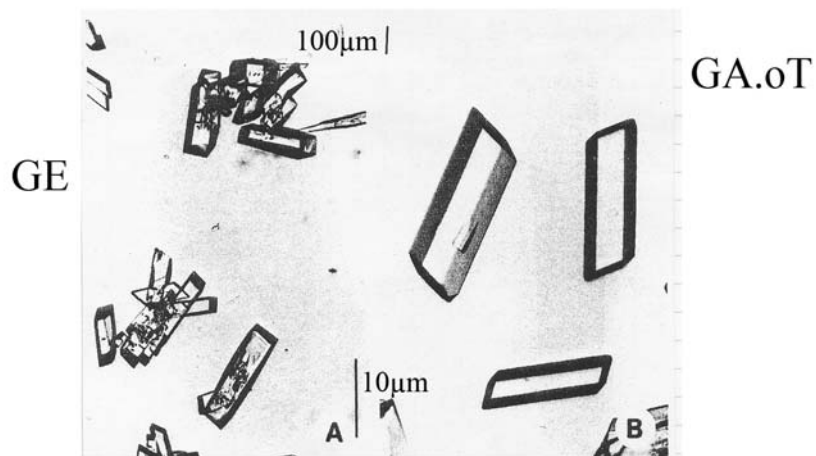
Asahina Y. (1936-1940) - GW.Py



GA.An

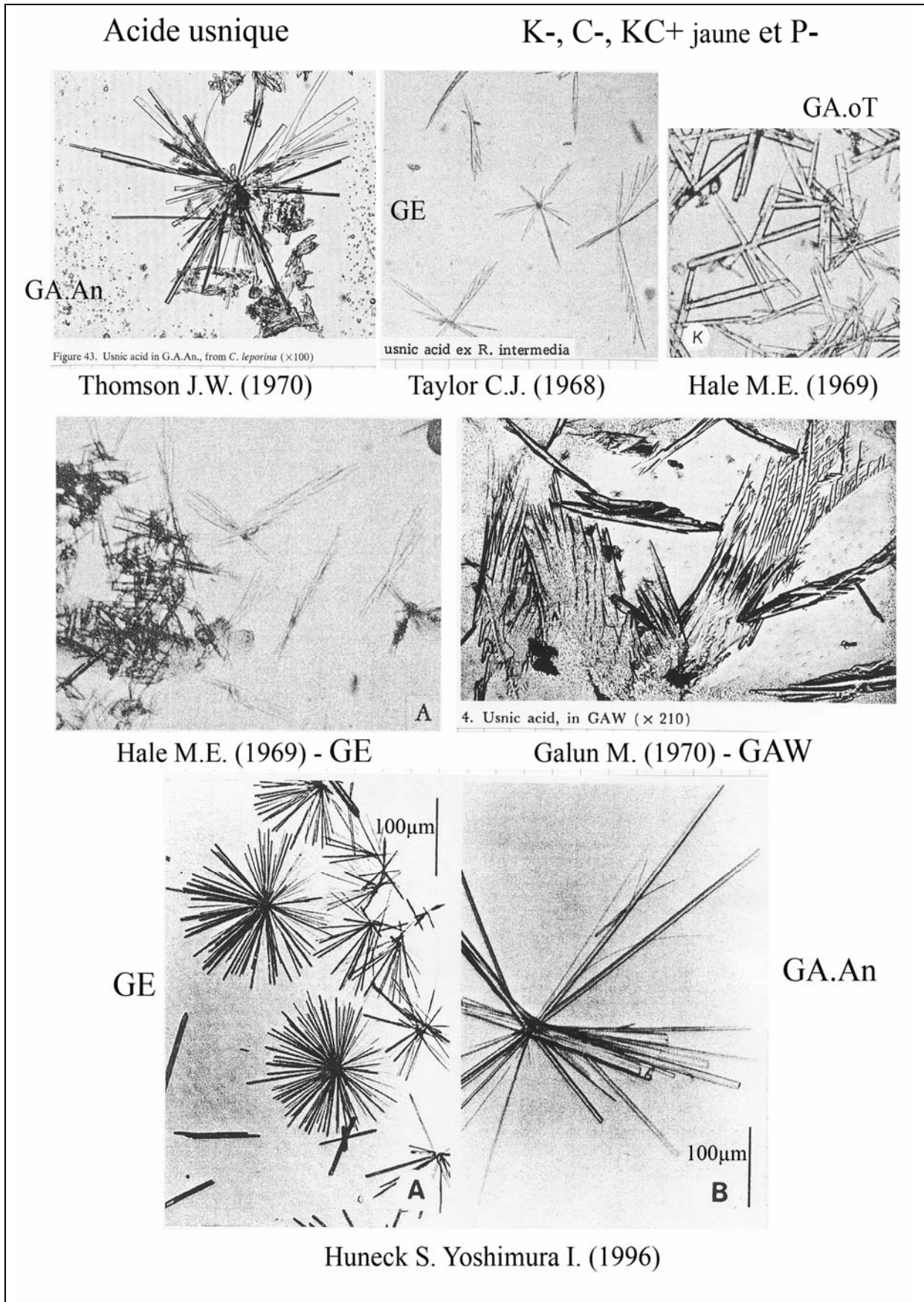
Asahina Y. (1936-1940)

GA.oT



Huneck S. Yoshimura I. (1996)

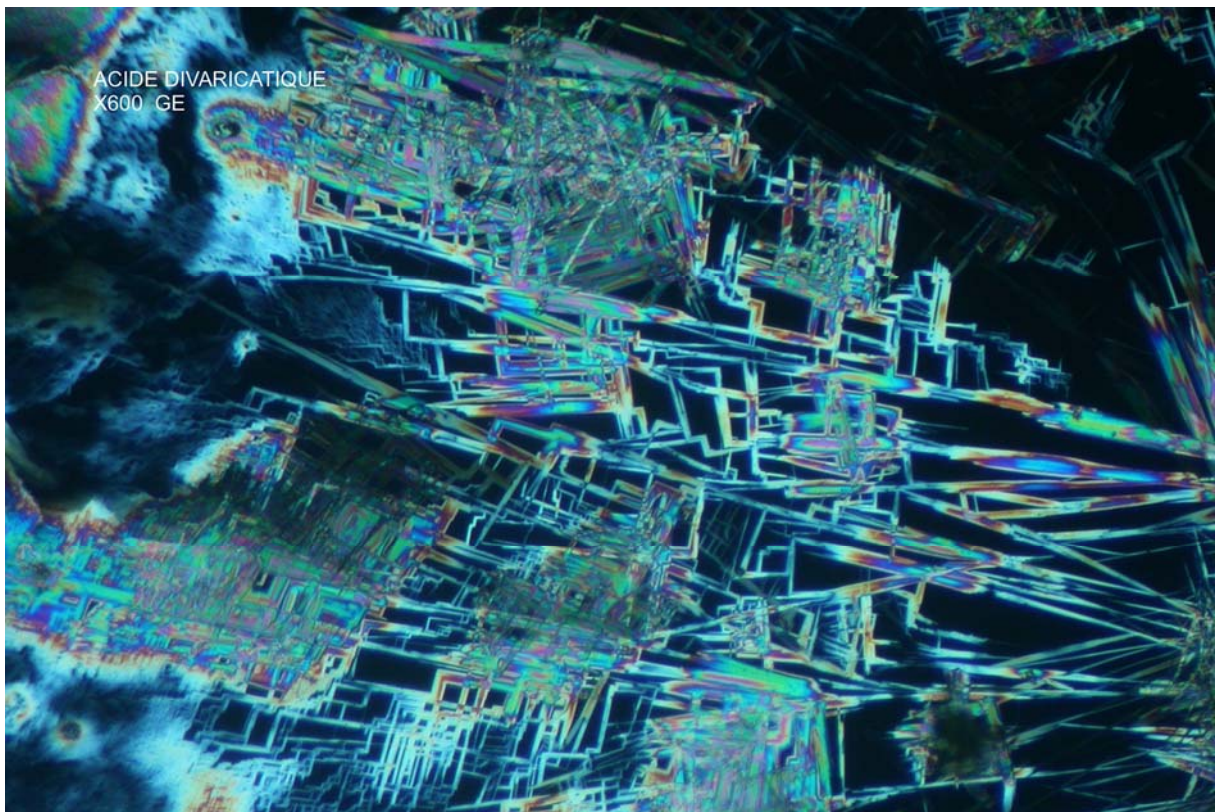
d'après Asahina (1936-40), Huneck et Yoshimura (1996).



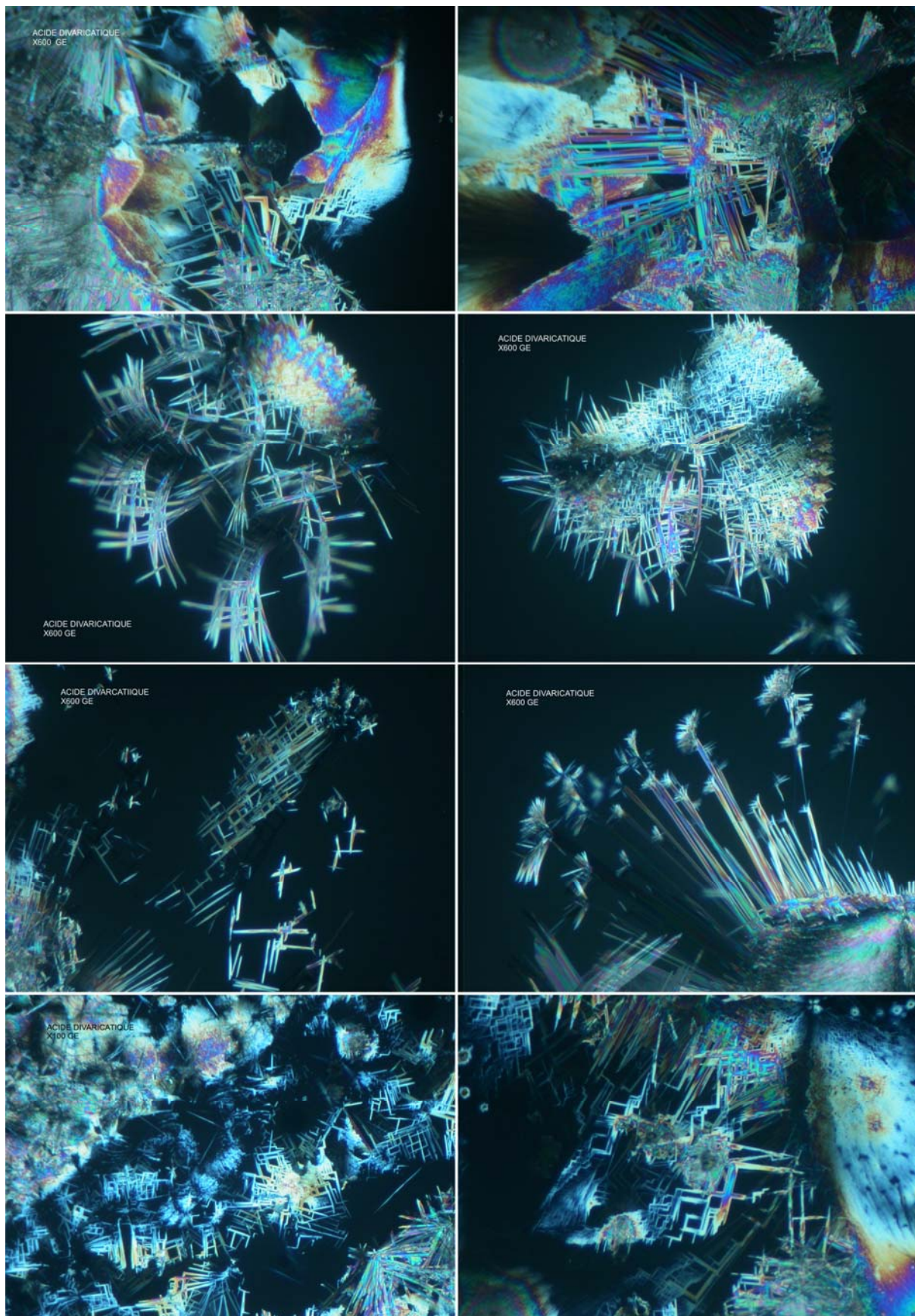
d'après Galun (1970), Hale (1969), Huneck et Yoshimura (1996), Taylor (1968), Thomson (1970)



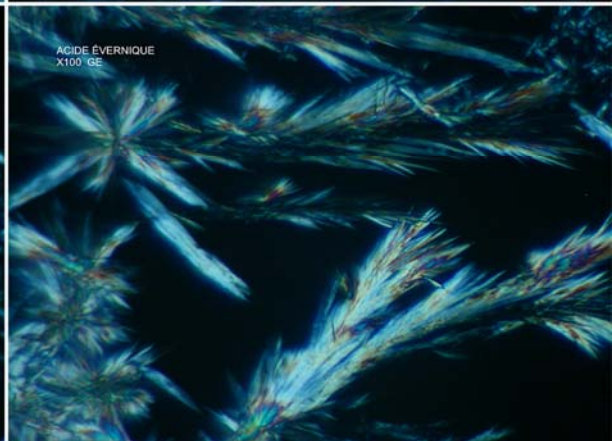
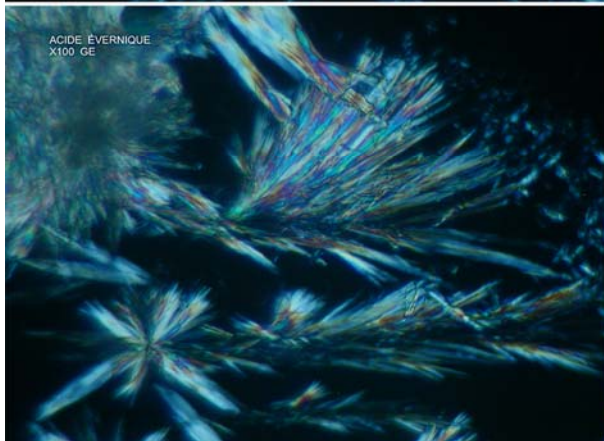
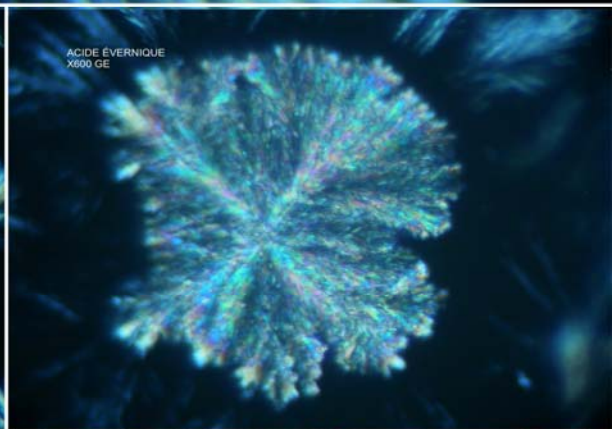
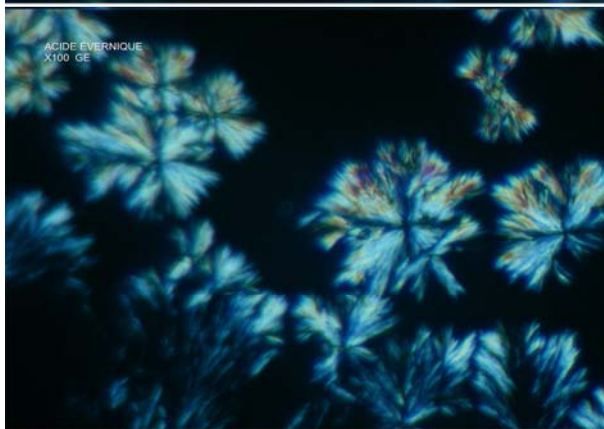
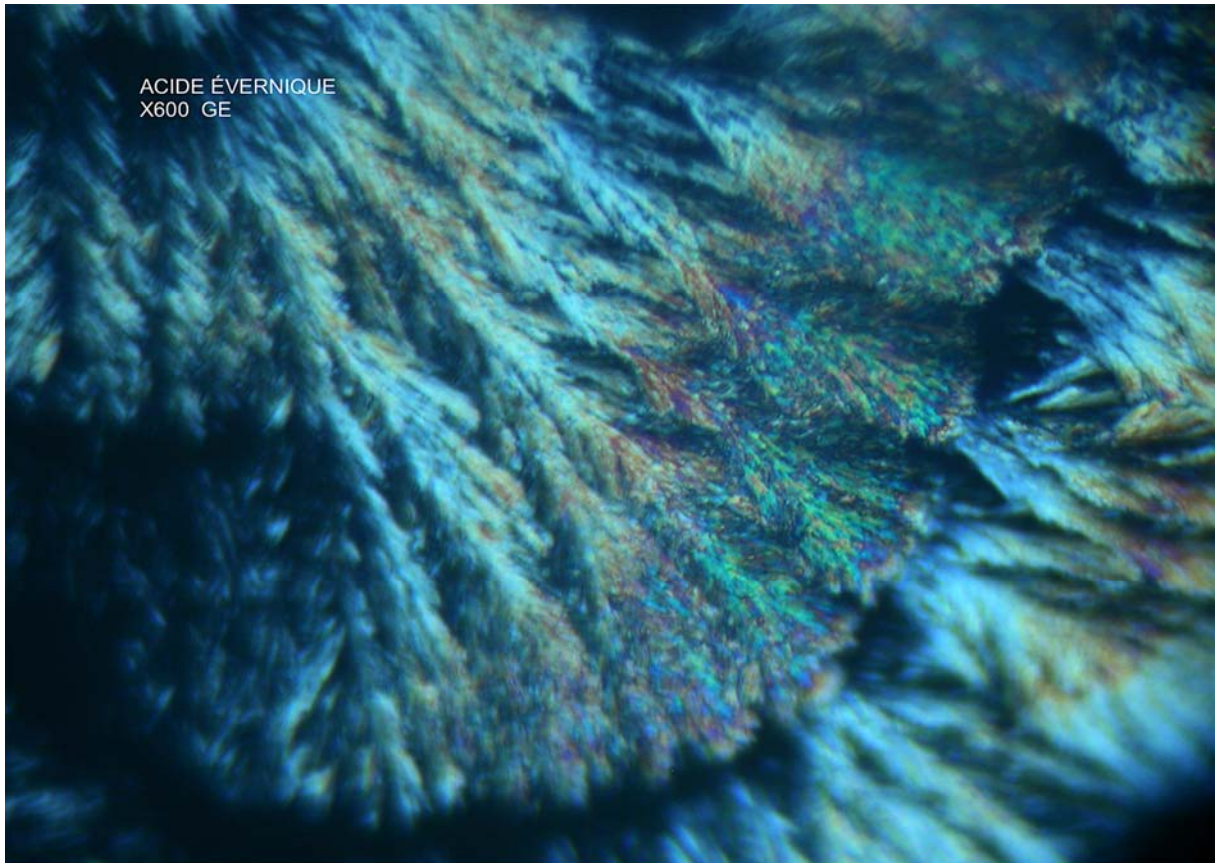
Acide bourgéanique (dans GE)



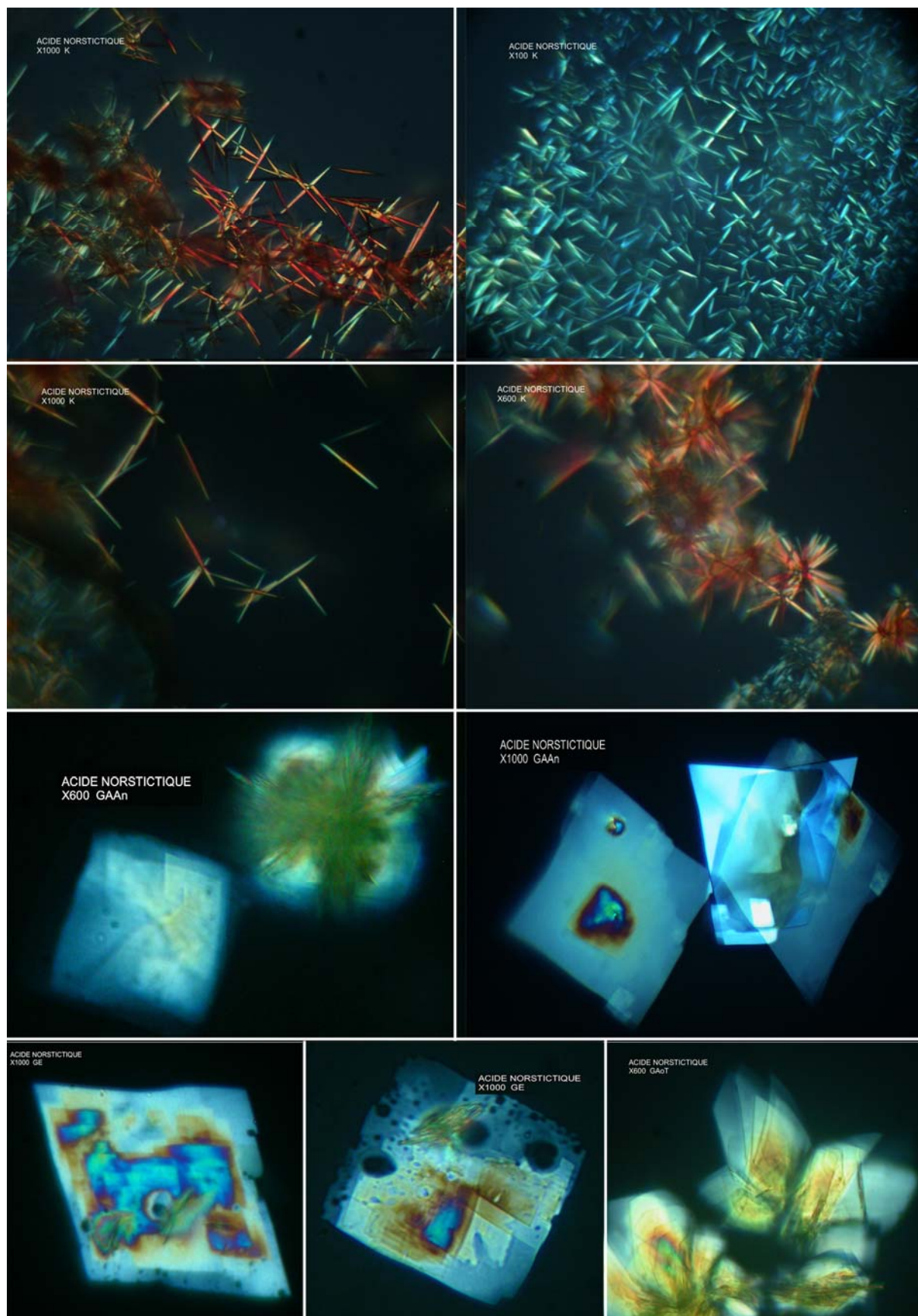
Acide divaricatique (dans GE) - Photos Jacques Lagabrielle



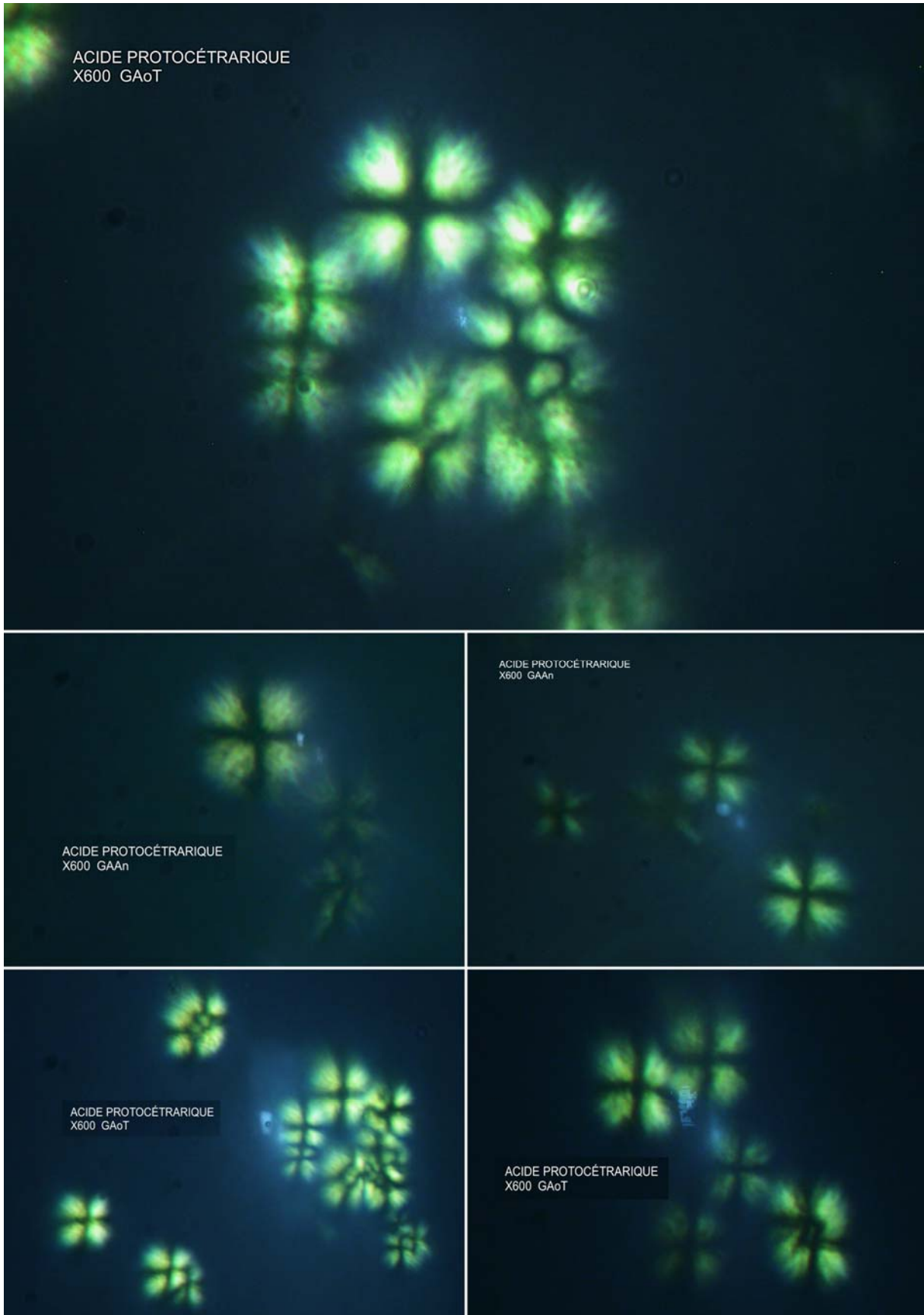
Acide divaricatique (dans GE) - Photos Jacques Lagabrielle



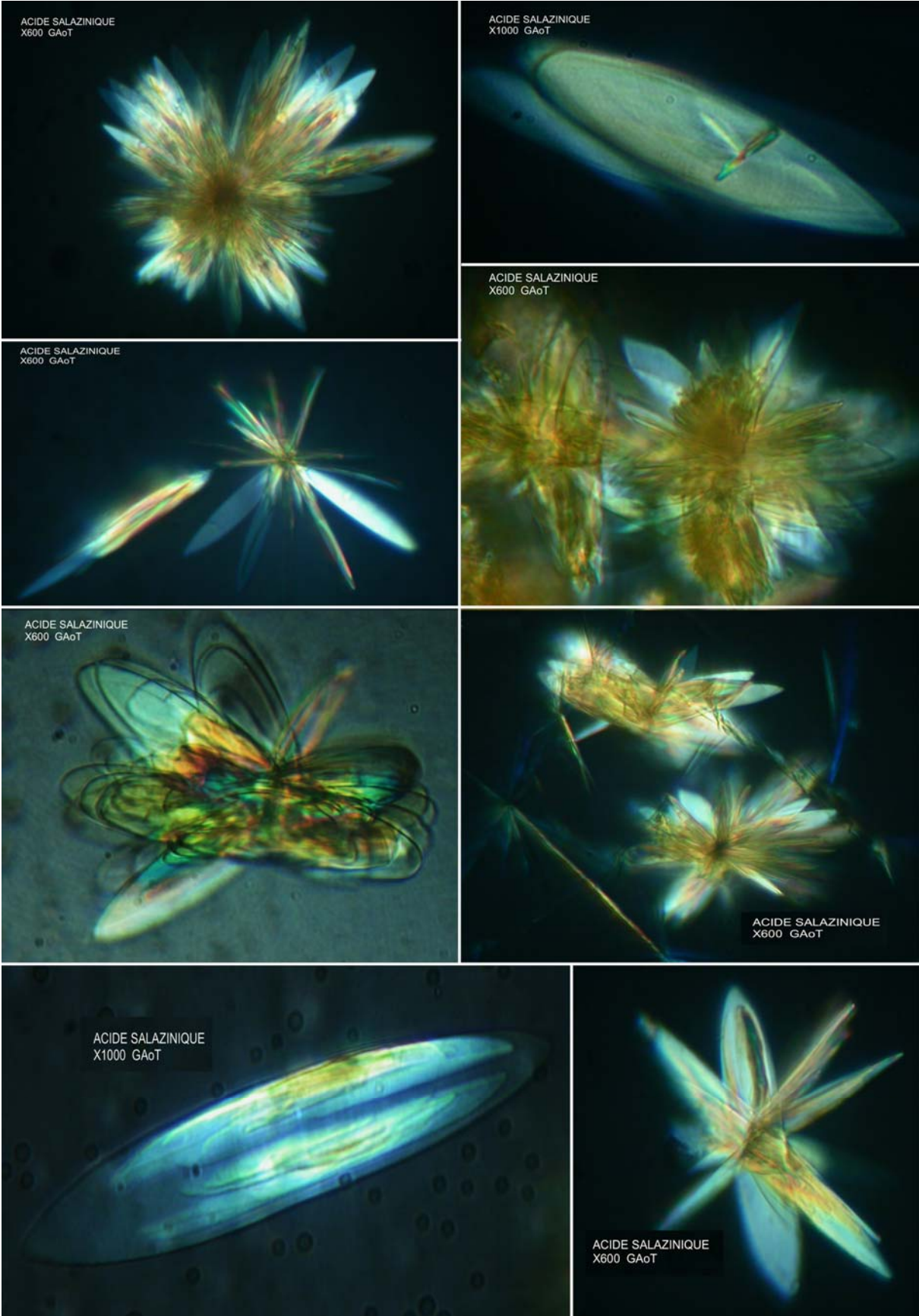
Acide évernique (dans GE) - Photos Jacques Lagabrielle



Acide norstictique (dans  $K_2CO_3$ , GAAn, GE et GAoT) - Photos Jacques Lagabrielle

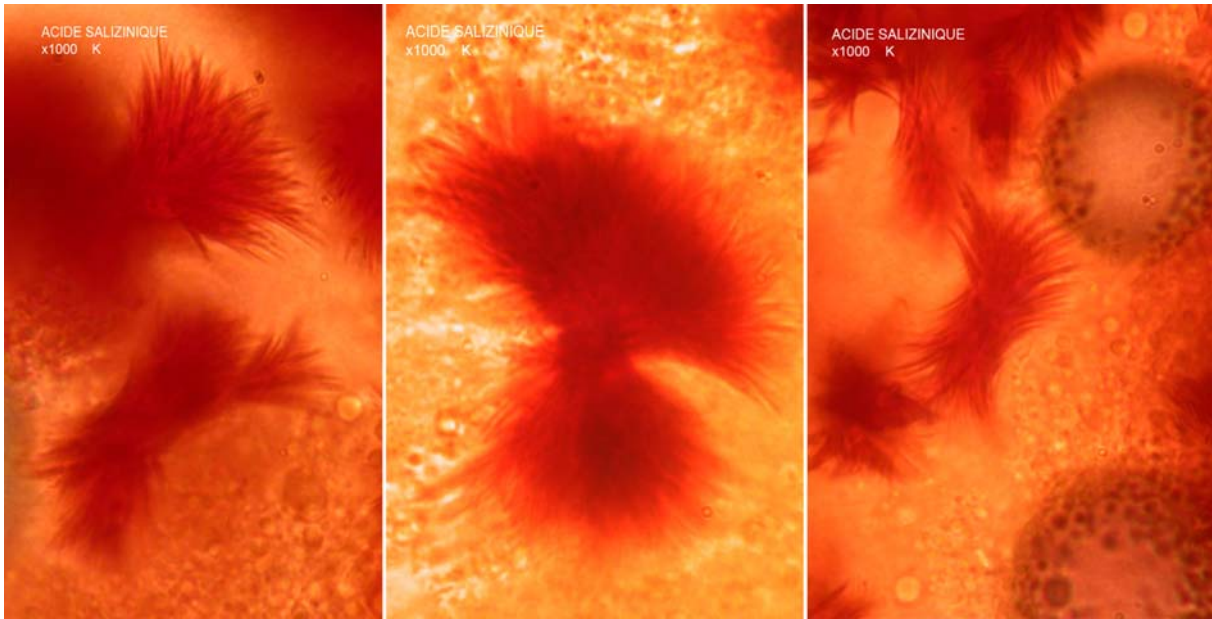


Acide protocétrarique (dans GAAn et GAoT) - Photos Jacques Lagabrielle



Acide salazinique (dans GAoT) - Photos Jacques Lagabriele

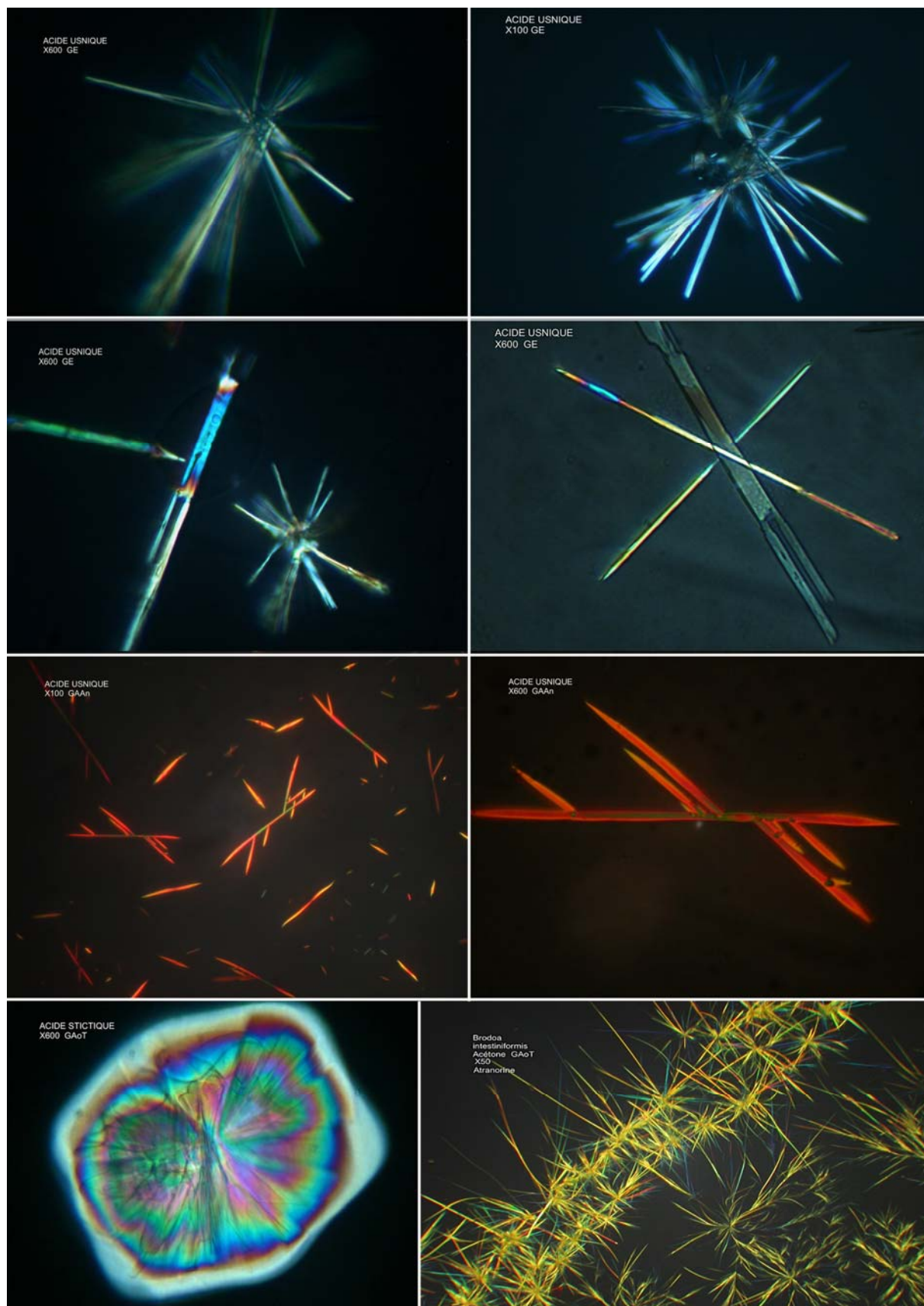




Acide salazinique (dans  $K_2CO_3$ )



Acide usnique (dans GE) - Photos Jacques Lagabrielle



Acide usnique (dans GE et GAAn)

Acide stictique (dans GAoT) et atranorine (dans GAoT)

- Photos Jacques Lagabrielle – prise de vue sur microscope à l'aide d'un Nikon Coolpix 4500 -

**Réactions chimiques\* et réactifs cristallogènes\*\* des principales substances lichéniques**

Substances lichéniques	K	C	KC	P	GAW	GE	AN	oT	Py	Q	KK
Acide alectorialique	Jaune	Rouge	Rouge	Jaune		+		+		+	
Acide alectoronique	-	-	(Rouge)	-	+	+					
Atranorine	Jaune	-	-	Jaune	+	+	+	+		+	
Acide baéomycésique	Jaune	-	-	Jaune			+	+	+	+	
Acide barbatique	-	-	-	-		+		+	+		
Acide barbatolique	Jaune	-	-	Jaune					+		
Acide bourgéanique	-	-	-	-	+	+	+				
Acide capératique	-	-	-	-		+					
Acide a-collatolique	-	-	(Rouge)	-	+	+					
Acide constictique	Jaune	-	-	Orange			+				
Acide cryptochlorophaéique	(Jaune-Rouge)	(Rouge)	Rouge	-	+	+					
Acide didymique	-	(Vert)	-	-	+	+					
Acide diffractaïque	-	-	-	-		+			+		
Acide divaricataïque	-	-	-	-		+					
Erythrine	-	Rouge	Rouge	-	+	+					
Acide évernique	-	-	-	-		+			+	+	
Acide fumarprotocétrarique	Jaune brun	-	-	Rouge		+	+	+			
Acide glomelliférique	-	-	(Rouge)	-	+	+					
Acide grayanique	-	-	-	-	+	+					
Acide gyrophorique	-	Rouge	Rouge	-		+		+		+	
Acide hiascique	Jaune-Rouge	Rouge	Rouge	-		+					
Acide homosékikaïque	-	-	-	-		+		+			
Acide hypoprotocétrarique	-	-	-	-		+			+	+	
Acide lécanorique	-	Rouge	Rouge	-	+	+			+	+	
Acide lichéstérinique	-	-	-	-		+					
Lichéxanthone	-	-	-	-		+					
Acide lobarique	-	-	(Rouge)	-	+	+				+	
Acide mérochlorophaéique	(Jaune-Rouge)	(Rouge)	(Rouge)	-	+	+					
Acide miriquidique	-	-	-	-		+					

Réactions chimiques* et réactifs cristallogénés** des principales substances lichéniques												
Substances lichéniques	K	C	KC	P	GAW	GE	AN	oT	Py	Q	KK	
Acide norstictique	Jaune/Rouge	-	-	Jaune			+	+		+	+	
Acide obtusatique	-	-	-	-		+				+		
Acide olivétorique	-	Rouge	Rouge	-	+	+				+		
Pannarine	-	-	-	Orange		+						
Pariétine	Rouge	-	-	-		+						
Acide perlaticolique	-	-	-	-	+	+				+		
Acide physodalic	Jaune brun	-	-	Rouge		+		+				
Acide physodique	-	-	(Rouge)	-	+	+						
Acide porphyrique	-	(Vert)	-	-		+						
Acide protocétrique	Jaune-Brun	-	-	Rouge	+	+		+				
Acide protolichéstérinique	-	-	-	-		+						
Acide psoromique	-	-	-	Jaune		+		+	+			
Acide rangiformique	-	-	-	-		+						
Acide salazinique	Jaune/Rouge	-	-	Jaune			+	+			+	
Scrobiculine	(Jaune-Rouge)	(Rouge)	Rouge	-		+						
Acide sékikaïque	-	-	-	-		+		+	+			
Sphaérophorine	-	-	-	-	+	+						
Acide squamatique	-	-	-	-		+			+	+		
Acide stictique	Jaune	-	-	Orange			+	+				
Strepsiline	-	Vert	(Vert)	-		+						
Acide thamnolique	Jaune	-	-	Orange			+	+		+		
Acide usnique	-	-	(Jaune)	-	+	+						
Zéorine	-	-	-	-			+	+	+			

\* D'après Wirth V., 1995 T.p.34-36 et Nordic Lichen Flora 1999 p.14

\*\* D'après Asahina Y., 1936-1940 ; Thomson J.W., 1967; Hale M.E., 1967 ; Taylor C.J., 1967-1968; Galun M., 1970; Huneck S. et Yoshimura I., 1996.

## **Conclusion**

Le dernier travail important sur la microcristallisation et sur les substances lichéniques est celui de HUNECK et YOSHIMURA publié en 1996. Indispensable : des photographies de 120 substances cristallisées, 700 substances lichéniques décrites.

Aujourd'hui, la chimie de milliers d'espèces est connue, la méthode d'ASHAHINA peut facilement s'appuyer sur ces connaissances disponibles pour confirmer de nombreuses déterminations.

L'ère du numérique donnera un "visage coloré" aux substances lichéniques.

Que ce petit article puisse donner aux amateurs lichénologues l'envie d'en savoir plus.

## **Remerciements**

Je remercie particulièrement Jean-Pierre GAVÉRIAUX pour ses encouragements, sa disponibilité, la correction et la mise en page de cet article. Je remercie chaleureusement Audrey CHAMBET et l'équipe « Produits naturels » de Rennes pour leurs conseils et la documentation essentielle qu'ils m'ont fournie. Je remercie sincèrement tous les savants lichénologues qui savent communiquer leur passion avec gentillesse et simplicité lors des rencontres de Fontainebleau ainsi que tous les membres de l'Association française de Lichénologie pour l'ambiance chaleureuse présente pendant les sessions annuelles.

## **Bibliographie**

1. APTROOT A. et SCHUMM F., 2008. - Key to *Ramalina* species known from Atlantic islands, with two new species from the Azores. *Sautiera* 15 : 21-57.
2. ASAHINA Y., 1936. - Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe. I. *J. Jap. Bot.* 12 : 516-525.  
ASAHINA Y., 1936. - Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe II. *J. Jap. Bot.* 12 : 859-873.  
ASAHINA Y., 1937. - Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe III. *J. Jap. Bot.* 13 : 529-536.  
ASAHINA Y., 1937. - Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe. IV. Mitteilung. *J. Jap. Bot.* 13 : 855-861.  
ASAHINA Y., 1938. - Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe. V. Mitteilung. *J. Jap. Bot.* 14 : 39-44.  
ASAHINA Y., 1938. - Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe. VI. Mitteilung. *J. Jap. Bot.* 14 : 244-250.  
ASAHINA Y., 1938. - Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe. VII. Mitteilung. *J. Jap. Bot.* 14 : 318-323.  
ASAHINA Y., 1938. - Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe. VIII. Mitteilung. *J. Jap. Bot.* 14 : 650-659.  
ASAHINA, Y 1938. - Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe. IX. Mitteilung. *J. Jap. Bot.* 14 : 767-773.  
ASAHINA Y., 1939. - Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe X. *J. Jap. Bot.* 14 : 465-472.  
ASAHINA Y., 1940. - Mikrochemischer Nachweis der Flechtenstoffe XI. *J. Jap. Bot.* 16 : 185-193.
3. ASAHINA .Y et SHIBATA S., 1954. - *Chemistry of lichen substances*. Japan Soc. Promotion Sci. Tokyo, 240 p.

4. BOISSIÈRE J.C., 1991. - Chromatographie des substances lichéniques : notions de base. *Bull. Ass. Fr. Lichénologie*, Vol.16(1) 14 p.
5. BRODO I.M., 1968. - *The Lichens of Long Island, New York : A Vegetational and Floristic Analysis*. New York State Museum Bull. 410, 330 p.
6. BRODO I.M., SHARNOFF S.D. et SHARNOFF S., 2001 - *Lichens of North America*. Yale University Press, New Haven and London, 795 p.
7. HINDS J.W. et HINDS P., 2007. - The Macrolichens of New England. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, vol. 96, 584 p.
8. CULBERSON C.F., 1965. - Some Microchemical tests for the Lichen, Depsidone Hypoprotocetraric Acid. *The Bryologist* Vol. 68, 3 : 301 - 304.
9. CULBERSON W.L., 1966. - Chimie et taxonomie des Lichens du groupe *Ramalina farinacea* en Europe. *Revue Bryol. et lichénol.* 34 : 841-851.
10. CULBERSON W.L. et CULBERSON C.F., 1968. - *The lichen genera Cetrelia and Platismatia (Parmeliaceae)*. Contrib. U.S. National Herb. 34 : 449-558.
11. CULBERSON C.F., 1969. - *Chemical and Botanical Guide to Lichen Products*. University of North Carolina Press, Chapel Hill. XI + 628 p.
12. CULBERSON C.F., 1970. - Supplement to Chemical and Botanical guide to Lichen Products. *The Bryologist*, Vol. 73 : 177-377.
13. CULBERSON C.F., CULBERSON W.L. & Johnson A., 1977 - Second Supplement to Chemical and Botanical Guide to Lichen Products. *The American Bryological and Lichenological Society*, Missouri Botanical Garden, St Louis, 400 p.
14. CLAUZADE G. et ROUX C., 1985. - *Likenoj de Okcidenta Europo. Illustrita determinlibro*. Bull. Soc. bot. Centre-Ouest, n° spec.7, S.B.CO. édit., St-Sulpice-de-Royan, 893 p.
15. DAHL E., 1950 - *Studies in the macrolichen flora of south west Greenland*. Kobenhavn C.A. Reitzels Forlag, 176 p., 7 pls., 1 carte.
16. GALUN M., 1970. - *The Lichens of Israel*. Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem, 116 p., XXVIII pls., 2 cartes.
17. GAVÉRIAUX J.P., 2003. - Principaux produits chimiques utilisés en Lichénologie. *Bull. Ass. Fr. Lichénologie* - Vol. 28(1) : 45-60.
18. HALE M.E., 1961. - *Lichen Handbook*. Smithsonian Institution Washington, D.C., 176 p.
19. HALE M.E., 1967. - *The Biology of Lichens*. Edward Arnold, London, 176 p.
20. HALE M.E., 1969. - *How to know the Lichens*. Wm. C. Brown Co., Dubuque. Iowa, 226 p.
21. HALE M.E., 1983. - *The Biologie of lichens*. Edit. 3. Edward Arnold, London, 190 p.
22. HUNECK S. et YOSHIMURA I., 1996 - *Identification of Lichen Substances*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 493 p., 67 Fig.
23. KROG H., 1968. - *The Macrolichens of Alaska*. Norsk Polarinstittutt Oslo. 180 p.
24. KROG H. et James P.W., 1977 - The genus *Ramalina* in Fennoscandia and the British Isles. *Norw. J. Bot.* 24 : 15-43.
25. KROG H. et OSTHAGEN H., 1980. - The genus *Ramalina* in the Canary Islands. *Norw. J. Bot.* 27 : 255-296.
26. LOHÉZIC - Le DÉVÉHAT F., 2012. - La Chromatographie sur Couche Mince appliquée aux lichens. *Bull. Ass. Fr. Lichénologie*, Vol. 37(2) : 123-139.
27. NIMIS P.L., 1993. - *The Lichens of Italy*. An annotated catalogue. Museo Regionale di Scienze Naturali Torino. Monographia XII, 897 p.
28. ORANGE A., JAMES P.W. et WHITE F.J., 2010 - *Microchemical Methods for the Identification of Lichens*. The British Lichen Society, 101 p.
29. OZENDA P. CLAUZADE G., 1970. - *Les Lichens. Étude biologique et flore illustrée*. Masson édit., Paris, 801 p.
30. RAMAUT J.L., 1962. - Réactions thallines, microcristallisations et chromatographie de partage sur papier en lichénologie. *Les Naturalistes Belges*, tome 43(8).

31. ROUX C. et coll., 2010. - *Catalogue des lichens et champignons lichénicoles de France métropolitaine* (à paraître prochainement).
32. SANTESSON J., 1967. - Chemical studies on lichens 4. Thin layer chromatography of lichen substances. *Acta Chemica Scandinavica* 21 : 1162-1172.
33. SCHUMM F., 2008. - *Flechten Madeiras, der Kanaren und Azoren*. Beck, OHG 73079 Sussen, 294 p.
34. SMITH C.W., APTROOT A., COPPINS B.J., FLETCHER A., GILBERT O.L., JAMES P.W. et WOLSELEY P., 2009. - *The lichens of Great Britain and Ireland*. The British Lichen Society and the Natural History Museum Publications édit., London, 1046 p.
35. TAYLOR C.J., 1967. - *The lichens of Ohio. Part I. Foliose Lichens*. The Ohio Biological Survey, The Ohio State University, Columbus, Ohio. 147 p.  
TAYLOR C.-J. 1968. - *Lichens of Ohio. Part 2. Fruticose and Cladoniform Lichens*. The Ohio Biological Survey, Ohio State University, Columbus, 153-227.
36. THOMSON J.W., 1967. - *The lichen genus Cladonia in North America*. University of Toronto Press, Toronto, 172 p.
37. WIRTH V., 1995. - *Die Flechten Baden-Wurtembergs*. Ulmer Verlag, Stuttgart, 2 Tomes, 1006 p.



La nouvelle édition **Die Flechten Deutschlands** de Wolkmar Wirth est disponible depuis 2013 auprès des éditions Eugen Ulmer KG. Au total 1244 pages réparties en 2 volumes avec la nomenclature actualisée, des clés de détermination et de nombreuses photographies en couleur d'excellente qualité. Une analyse de ces 2 ouvrages sera proposée par Claude Roux dans notre prochain bulletin.

## La phloxine B ( $\pm$ additionnée de rouge Congo) pour l'étude microscopique des lichens

par Jean-Pierre Gavériaux -  
14, résidence les Hirsons, rue Eugène Mordacque, 62800 LIÉVIN  
[jp.gaveriaux@numericable.fr](mailto:jp.gaveriaux@numericable.fr)

Si le montage dans l'eau donne souvent de résultats intéressants, il faut dans la grande majorité des cas utiliser des colorants pour mettre en évidence les structures microscopiques à étudier. Certains produits comme les **réactifs iodés** (Lugol et Melzer), le **bleu coton** ou le **rouge Congo** sont couramment utilisés et suffisent dans la plupart des cas pour faire apparaître les cellules que l'on désire observer. Toutefois, dans certains cas, les cellules sont peu distinctes, on a l'impression qu'elles refusent de se colorer et l'observation microscopique ne nous donne pas les renseignements que l'on pensait y trouver.

Dans ce cas, un colorant très peu utilisé en mycologie et en lichénologie peut vous venir en aide, il s'agit de la phloxine B, un colorant synthétique, fabriqué à partir d'hydrocarbures issus du goudron de houille. Cette substance a des affinités particulières pour le cytoplasme des cellules mortes qu'elle colore en rouge rosâtre  $\pm$  violacé sans se fixer sur les parois chitineuses et les cloisons des hyphes.

La phloxine B est soluble dans l'alcool, dans l'ammoniaque et dans l'eau, ce qui nous permet de la préparer de plusieurs façons différentes, en solution alcoolique, ammoniacale ou en solution aqueuse, c'est cette dernière solution que nous privilégions.

### Préparation de la solution aqueuse

Dans 100 mL d'eau bidistillée, dissoudre 2 g de phloxine B (qui se présente sous forme d'une poudre rouge  $\pm$  violacé) et 1 g de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate), une poudre blanche qui agit sur les tensions superficielles facilitant la pénétration de l'eau (et des substances qui y sont dissoutes) dans les cellules afin de les colorer.

Remarque : à la place du SDS on peut aussi utiliser un peu de détergent vaisselle mais ce produit mousse  $\pm$  et contient souvent des additifs.

Pour faciliter la dissolution le recours à l'agitateur magnétique bien pratique et une filtration finale permet d'obtenir un colorant parfaitement préparé que l'on conservera en flacon fumé le protégeant de la lumière pour éviter sa dégradation.

### La phloxine B peut être utilisée en mélange avec d'autres colorants

En association avec le rouge Congo elle permet la double coloration. Déposer sur une lame une petite goutte de Congo puis à proximité une petite goutte de phloxine ; mélanger avec une épingle et y placer la coupe à colorer. Mettre une lamelle et dissocier par tapotements successifs. Il y a ainsi coloration des parois des hyphes par le Congo et du contenu des cellules par la phloxine.

L'introduction de potasse à 5% permet, si nécessaire, d'éclaircir la préparation pour faciliter les observations (il n'est toutefois pas possible de prolonger l'observation très longtemps car la phloxine devient rapidement noirâtre en présence de KOH). À vous de faire des essais et de choisir la technique qui vous donne les meilleurs résultats (voir les photos de la page suivante).