

La Chromatographie sur Couche Mince appliquée aux lichens

par **Françoise Lohézic - le Dévéhat**
UMR 6226 Sciences Chimiques de Rennes,
Equipe Produits Naturels, Synthèses, Chimie Médicinale,
Univ. Rennes 1, Rennes, France.
E-mail : francoise.le-devehat@univ-rennes1.fr

SOMMAIRE

1. Les molécules lichéniques	123
2. Principe théorique de la chromatographie sur couche mince	124
2.1 définition	124
2.2 Dépôt des échantillons	124
2.3 La phase mobile	124
2.4 Détection	124
2.5 Étude théorique	125
3. La CCM en pratique	125
3.1 Précautions à prendre avant toute mise en œuvre d'une CCM	125
3.2 Matériel nécessaire.....	126
3.3 Préparation des solvants et échantillons	126
3.3.1 Le système solvant = phase mobile	126
3.3.2 Les échantillons à déposer	126
3.4 La révélation	126
3.4.1 En lumière visible	126
3.4.2 Sous UV	127
3.4.3 Après pulvérisation de réactifs chimiques	127
4. Mode d'emploi en images pour la CCM d'extraits lichéniques	129

1. Les molécules lichéniques

Les lichens, de part leur symbiose, synthétisent des composés spécifiques appelés métabolites secondaires ou encore acides lichéniques. Cette appellation est cependant quelque peu erronée car pour la plupart ce sont des composés phénoliques appartenant au groupe des depsides et des depsidones. La proportion de ces substances varie selon l'espèce, la saison, les conditions environnementales, l'orientation par rapport au soleil. Parmi ces produits, certains sont présents à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules, d'autres au niveau des membranes ou même entre les hyphes.

La nature chimique des divers composés synthétisés par les lichens est très variée. On dénombre à ce jour environ 800 composés différents. Actuellement, il existe deux groupes de substances lichéniques :

- les composés primaires, le plus souvent intracellulaires et au niveau des membranes, comprenant les acides aminés, les amines, les peptides, les protéines, les polyols, les mono-, oligo-, et polysaccharides, les caroténoïdes et les vitamines.

- les composés secondaires sont situés en général à l'extérieur de la cellule et élaborés par le mycosymbiote. Ils représentent la grande majorité des substances lichéniques. Insolubles dans l'eau, leur extraction est possible à l'aide de solvants organiques.

La majorité des ces substances est spécifique des lichens notamment : les depsides, depsidones, les acides lactones aliphatiques, les dibenzofuranes et leurs dérivés. Seulement 5 à 10% sont retrouvés chez d'autres champignons ou d'autres plantes. Un tableau (Tableau 1) récapitulatif se trouve à la fin du document.

2. Principe théorique de la chromatographie sur couche mince

2.1 Définition

La chromatographie sur couche mince appartient à la chromatographie de surface. Elle est réalisée sur une plaque de verre ou d'aluminium (ou de polymère voire une baguette de quartz) recouverte d'une fine couche de phase dite stationnaire (ou appelée également couche mince). Les substances à séparer sont déposées à la surface de ce film solide. On plonge ensuite l'extrémité inférieure de la plaque dans une cuve contenant le solvant de migration et saturée en celui-ci.

La phase stationnaire que nous utiliserons ici sera la silice (responsable de phénomènes d'adsorption et de partage) et c'est une phase polaire mais il faut savoir que qu'il est possible d'utiliser des phases stationnaires peu polaires ou de la silice dite greffée (Burgot and Burgot 2002).

2.2 Dépôt des échantillons

Les échantillons à séparer sont dissous dans un solvant de préférence volatile afin qu'entre chaque dépôt le solvant ait pu s'évaporer ce qui donnera une tache de petite diamètre mais concentrée.

La concentration de l'échantillon doit être environ de 1 mg/mL et on effectuera ensuite 3-4 fois ce dépôt sur la plaque stationnaire. Ce dépôt se fera de manière manuelle (et non mécanique car il nécessite un appareillage adapté) par remplissage de capillaires en verre calibrés après prélèvement de l'échantillon par capillarité. La solution est déposée par application brève du capillaire pour éviter des dépôts trop larges. On obtient alors des spots ronds et diffus.

2.3 La phase mobile

La phase mobile permet la migration de l'échantillon le long de la plaque de silice par capillarité (nous ne parlerons pas ici de la méthode par flux forcé où la migration du solvant se fait sous pression). Nous utiliserons aussi le mode vertical pour la migration en cuve classique (et non automatique) afin que le solvant migre du haut vers le bas, le long de la plaque en entraînant les composés à séparer (schéma 1).

Le solvant (ou phase mobile) est généralement un mélange de plusieurs solvants de polarité différente, de constitutions variables.

2.4 Détection

La détection que nous détaillerons sera purement visuelle et non instrumentale (qui permet en plus de la détection visuelle la quantification) et sera dans un 1^{er} temps physique puis dans un 2^{ème} temps chimique.

La détection physique se fait sous lumière visible puis sous UV à 2 longueurs d'onde de préférence : à 254 nm et à 365 nm. Il faut savoir que la plaque est imprégnée d'un indicateur de fluorescence qui fluoresce à 254 nm. Lorsque le composé est capable d'absorber les photons (émis par la lampe), il empêche la fluorescence émise par l'indicateur présent dans la silice et apparaît alors comme une tache noire par inhibition de fluorescence. A 365 nm, on visualise uniquement les molécules naturellement fluorescentes (ou qui ont été artificiellement rendues fluorescentes à cette longueur d'onde par des réactions chimiques adaptées). Les molécules possèdent cette propriété ou pas.

La détection chimique se fera de manière directe après pulvérisation d'un réactif capable de réagir avec les molécules séparées pour donner des substances colorées ou fluorescentes.

2.5 Etude théorique

Chacun des constituants migre avec une vitesse qui dépend de son coefficient de partage. A la fin de l'opération et après révélation, chaque substance se présente sous la forme d'un spot en principe circulaire et symétrique. On introduit la notion de R_f (= rate of flow) par la relation :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}} = \frac{L1}{L2}$$

Les distances sont mesurées à partir du centre du dépôt initial du mélange jusqu'au centre du spot de la substance après migration.

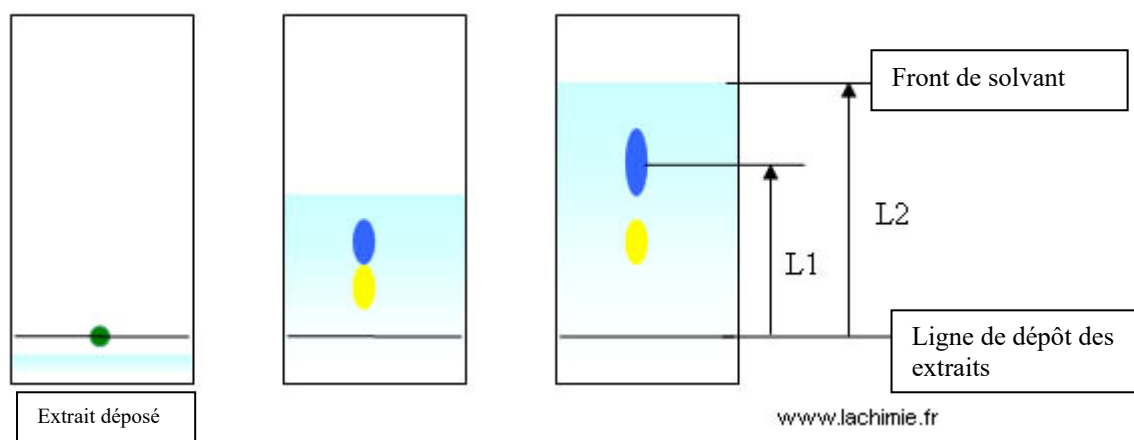


Schéma 1 : Principe de la CCM – calcul du R_f . Dans cet extrait, l'extrait contient 2 composés

3. La CCM en pratique

3.1 Précautions à prendre avant toute mise en œuvre d'une CCM



les solvants, réactifs chimiques possèdent un code d'étiquetage sur leur flacon et beaucoup sont nocifs pour la santé. Il convient donc de les utiliser avec précaution, munis de gants, lunettes et dans des endroits ventilés. Bien lire les étiquettes avant de les manipuler. Ci-dessous le lien l'INRS pour apprécier la dangerosité des produits manipulés :

<http://www.inrs.fr>

3.2 Matériel nécessaire

Crayon à papier

Plaques de silice (Merck, TLC Silicagel 60 F254, ref.1.05554.0001)

Cuves ou enceintes fermées

Lampe UV

Solution pour mettre la solution de révélation

Micropipettes en verre (Blaubrand intraMark ref.7087 07)

Eprouvette pour le mélange des solvants

3.3 Préparation des solvants et échantillons

3.3.1 Le système solvant = phase mobile

Le système solvant est la plupart du temps constitué de plusieurs solvants (ainsi appelé système) dont les proportions relatives en chacun d'entre eux sont indiqués entre parenthèses ou séparés par des double points.

Ex : Hexane / acétate d'éthyle / acide formique (139/83/5) ou (139:83:5) signifie que le mélange final contiendra 139 mL d'hexane, 83 mL d'acétate d'éthyle , 5 ml d'acide formique (ou multiple de cette proportion).

Pour les lichens plus spécifiquement, 2 systèmes solvants sont couramment employés :

Hexane / diethyl ether / acide formique (130/80/20)

Toluène / acide acétique (200/30)

Ces solvants sont retrouvés dans des publications de Culberson (1982) par exemple, qui a standardisé les migrations de composés lichéniques dans ces systèmes de solvants.

3.3.2 Les échantillons à déposer

Les échantillons de lichen sont broyés pour permettre une bonne diffusion des solvants dans les tissus des lichens afin d'extraire au maximum les composés avant de les mettre à macérer dans un solvant de polarité large (comme l'acétone) pour extraire une large gamme de composés.

Ensuite, il s'agit de séparer la poudre de lichen du solvant chargé en composés afin d'obtenir un extrait liquide qui sera analysé sur plaque de silice. Sur une plaque il n'est pas possible de déposer des particules solides et il faudra veiller à toujours déposer une solution la plus limpide possible afin d'obtenir une migration correcte des composés.

3.4 La révélation

La révélation se fait de 3 façons qui seront toutes les trois combinées afin d'apporter une conclusion finale quant à la composition chimique du lichen.

3.4.1 En lumière visible

Après migration, la plaque est séchée à l'air et certains composés sont décelables en lumière visible (400-700 nm) sans autre moyens.

Ex : l'acide usnique apparait sous forme d'un spot jaune, la pariétine apparait sous forme d'un spot orange..

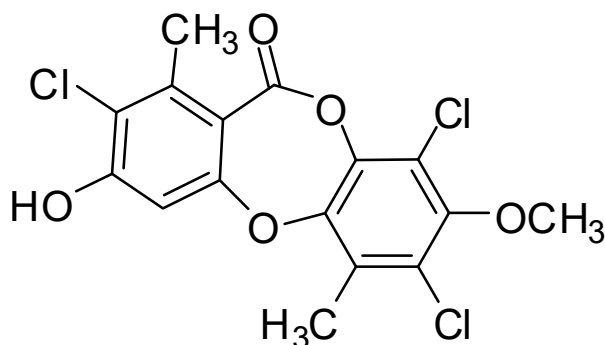
3.4.2 Sous UV

La plaque peut aussi être observée sous UV et généralement elle est observée à 2 longueurs d'onde : 254 et 365 nm.

A 254 nm, on observe les composés qui possèdent des systèmes conjugués et aromatiques.

A 365 nm, on observe les composés qui possèdent une fluorescence naturelle.

Ainsi chaque composé possède des caractéristiques qui lui sont propres et c'est la raison pour laquelle il est important de visualiser la plaque à 2 (voire 3) longueurs d'onde différentes.



Exemple de composé aromatique (diploicine) visible à 254 nm car possédant des doubles liaisons conjuguées.

3.4.3 Après pulvérisation de réactifs chimiques

Certains composés ne seront pas visibles sous UV ou dans le visible car ne possèdent ni doubles liaisons conjuguées, ni fluorescence naturelle. On peut néanmoins quelquefois les révéler en vaporisant sur la plaque des solutions (appelées réactif de révélation) pour les rendre colorés.

Plusieurs réactifs peuvent être utilisés comme le montre le tableau de la page suivante. ⇨⇨⇨

L'anisaldéhyde sulfurique est couramment employé car il réagit de façon aspécifique avec de très nombreux types de molécules, dont la plupart des composés lichéniques en leur conférant des colorations qui sont diverses (violet, rouge, jaune, gris...) et qui constituent ainsi une aide supplémentaire pour l'identification des composés.

Pour certains composés, on peut également utiliser l'*ortho*-dianisidine mais c'est une solution de révélation plus spécifique et moins universelle.

réactif	composition	méthodologie	Composés mis en évidence	Couleur des taches
Anisaldéhyde sulfurique	0,5mL d'anisaldéhyde dans 10mL de CH₃COOH additionné de 85ml de MeOH puis 5mL d'H₂SO₄	Pulvérisation et 5min à 120°C	Stéroïdes, saponines, terpènes, iridoïdes	<u>En lumière visible</u> : Brun à rose, bleu ou violacé
Chloramine T (CAT)	Solution alcoolique à 5%	pulvérisation	Acide usnique	Jaune (peu sensible)
FeCl ₃	Solution alcoolique à 1%	pulvérisation	Depsides et depsidones	Tache pourpre ou brun rouge
Réactif de Gibbs (mono-chlorhydrate de 2,6-dichloroquinone)	Solution acétonique à 0,05%	pulvérisation	Composés phénoliques qui renferment un groupement H ou COOH en para du OH phénolique	Couleur variée
Ortho-dianisidine	1g dans 100mL d'éthanol	pulvérisation	Composés aldéhydiques aromatiques	Jaune à orange
Paraphénylènedi amine	Solution alcoolique à 1% (instable)	pulvérisation	Composés phénoliques qui renferment un groupement OH en ortho du CHO	Jaune à orange
Permanganate de potassium	1g dans 500 mL NaOH 0.5N	Trempe dans un bocal (éventuellement chauffage léger)	Composés susceptibles d'être oxydés	Taches blanches ou jaunes sur fond rose
Thymol sulfurique	1g de thymol dans 100mL EtOH/H ₂ SO ₄ (9/1)	Pulvérisation et 10-15min à 105°C	Sucres, composés glycosylés	<u>En lumière visible</u> : Rose, rouge-violacé à orangé, brun pâle
Vanilline sulfurique	2g de vanilline dans EtOH/H ₂ SO ₄ (98/2)	Pulvérisation puis 2min à 100°C	Alcools supérieurs, cétones, phénols, stéroïdes, terpènes, limonoïdes, composés carbonylés	Large gamme de couleur en lumière visible

4. Mode d'emploi en images pour la CCM d'extraits lichéniques

Dans le scénario ci-après, voici en 17 étapes la réalisation d'une chromatographie sur couche mince à partir d'un lichen dont vous voulez étudier la composition chimique.

1 Le Matériel nécessaire pour la réalisation de la CCM

le kit de sécurité



Des gants et des lunettes

le kit » pour le broyage et l'extraction

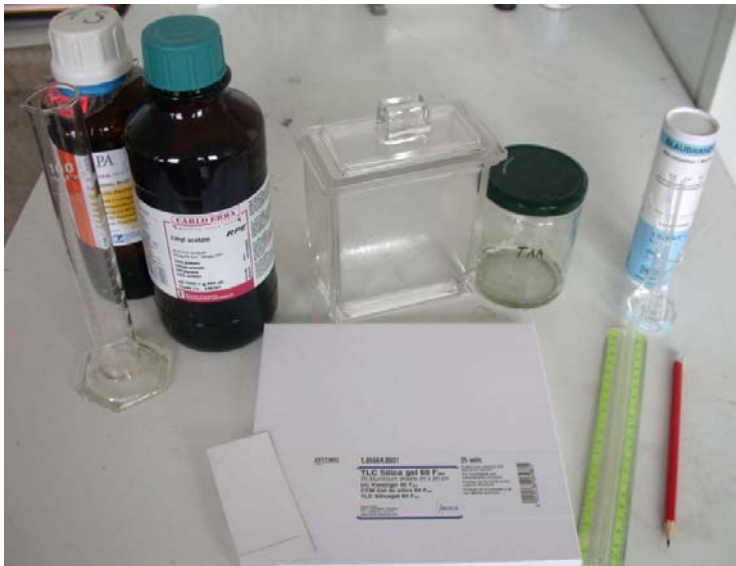


Un mortier, des tubes en verre, le solvant pour l'extraction.

le kit révélation



Réactif de révélation, pulvérisateur ; récipient pour mettre le réactif de révélation ; source de chaleur (décapeur, plaque chauffante).



Le kit pour le dépôt et la migration des échantillons sur les plaques de gel de silice



Plaques CCM (photo du haut) et *micropipettes* (photo du bas)



Cuves de migration (ou pots de confiture)



Les divers *solvants*

1^{ère} étape



Prélever environ 50-100 mg d'échantillon (si la quantité est inférieure, ajuster alors la quantité de solvant nécessaire).



2^{ème} étape

Broyer le thalle de lichen prélevé et mettre la poudre (fragments) dans un tube en verre. Le solvant extraira d'autant mieux les composés s'il arrive à pénétrer dans les couches internes du lichen

3^{ème} étape

Ajouter environ 1 ml de solvant (acétone de préférence). Laisser macérer au moins 3 heures en agitant de temps en temps



Le solvant change de couleur car il extrait les composés du lichen : la partie liquide est maintenant appelée extrait (de lichen).

4^{ème} étape

Pendant ce temps, préparez la cuve en vue de la migration. Prendre les différents solvants (en fonction de la phase mobile choisie) et les mélangez en fonction de leurs proportions.



Introduire ce système de solvant dans la cuve de migration (bien refermer ensuite la cuve pour que les solvants ne s'évaporent pas) et attendre au moins 30 minutes avant d'introduire la plaque.

5^{ème} étape



- Prendre un morceau de coton et le disposer à l'intérieur du tube pour qu'il « bloque » la poudre.
- Aspirez avec une pipette pasteur l'extrait, en appliquant celle-ci contre le coton.
- Transvasez l'extrait dans un nouveau tube en verre.

6^{ème} étape




- Prendre une plaque CCM et la couper aux dimensions nécessaires selon le nombre de dépôts (compter environ 1.5 cm entre 2 dépôts).
- Tracer un trait au crayon à papier en bas de la plaque = trait du dépôt des extraits.

7^{ème} étape



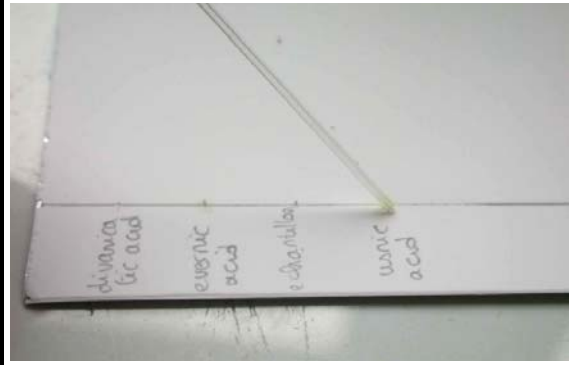
Mettre un signe à l'endroit où vous déposerez votre échantillon et annotez-le.

8^{ème} étape




Saisir une micropipette et la plongez dans l'extrait : le liquide monte alors par capillarité.

9^{ème} étape




Mettre en contact pendant **1 seconde** la micropipette et la plaque de silice à l'endroit annoté précédemment (attention !!! plus le contact sera long et plus le dépôt sera large mais dilué).

10^{ème} étape




Répéter cette étape 5 fois en séchant le dépôt (à l'aide d'un sèche-cheveux) entre chaque étape.

11^{ème} étape



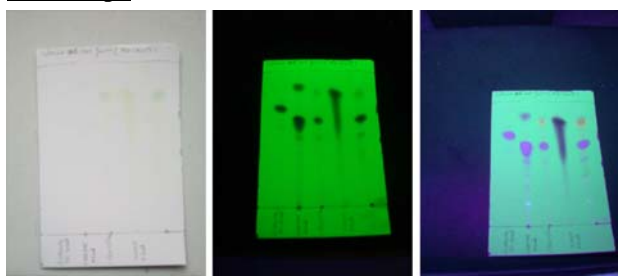
Saisir la plaque et disposez-la verticalement dans la cuve.

12^{ème} étape



Lorsque le solvant est arrivé à environ 1.5 cm du haut de la plaque, ouvrir la cuve et disposez la plaque, debout, à l'extérieur de la maison afin qu'elle sèche (bien refermer ensuite la cuve pour que les solvants ne s'évaporent pas). Avant le séchage, tracer le front de solvant au crayon à papier.


13^{ème} étape



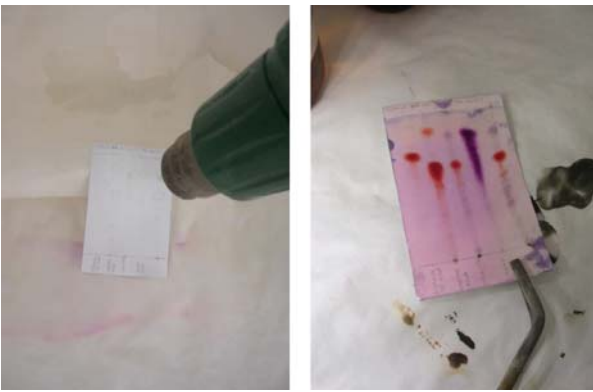
Regardez cette plaque en lumière visible, sous la lampe UV tout d'abord à 254 nm puis à 365 nm. Entourez ces taches au crayon à papier avec une codification précise selon la longueur d'onde (ex : trait plein pour 254 nm et trait pointillé pour 365 nm).

14^{ème} étape

Dans un endroit adapté et ventilé, pulvérisez ou trempez la plaque avec une solution de révélation (comme l'anisaldéhyde sulfurique).



15^{ème} étape



Chauffez la plaque sur plaque chauffante ou au décapeur thermique jusqu'à apparition des couleurs.

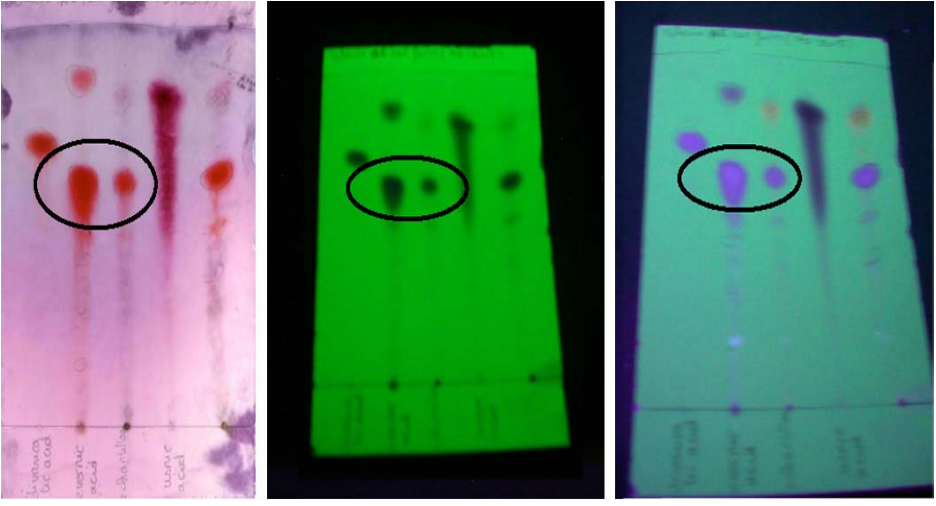
16^{ème} étape



Observez la plaque et cogitez...

17^{ème} étape

Les composés identiques possèdent un profil commun (mêmes Rf, mêmes spots sous lumière UV et après révélation chimique).



2. L'isolement de composés majoritaires pas à pas

1^{ère} étape



Prélever environ 300 mg d'échantillon minimum.
Si la quantité est supérieure, ajuster alors la quantité de solvant nécessaire.

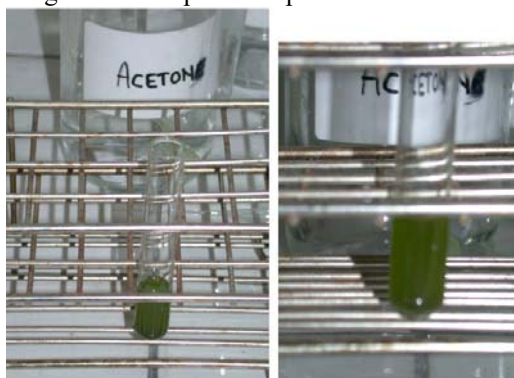
2^{ème} étape



Broyer le thalle de lichen prélevé et mettre la poudre (fragments) dans un tube en verre
Le solvant extraira d'autant mieux les composés s'il arrive à pénétrer dans les couches internes du lichen

3^{ème} étape

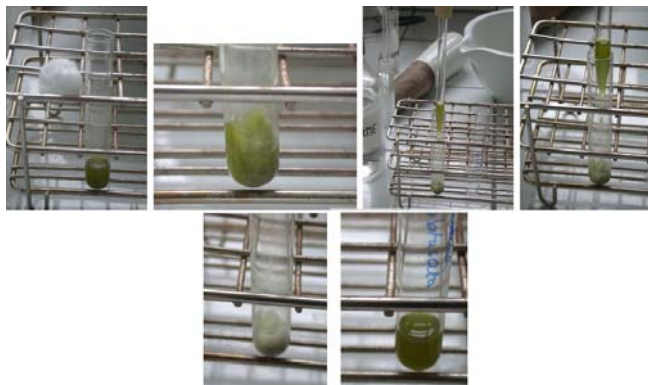
Ajouter environ 10 ml de solvant (acétone de préférence). Laisser macérer au moins 3 heures en agitant de temps en temps



Le solvant change de couleur car il extrait les composés du lichen : la partie liquide est maintenant appelée extrait (de lichen).

4^{ème} étape

- Prendre un morceau de coton et le disposer à l'intérieur du tube pour qu'il « bloque » la poudre.



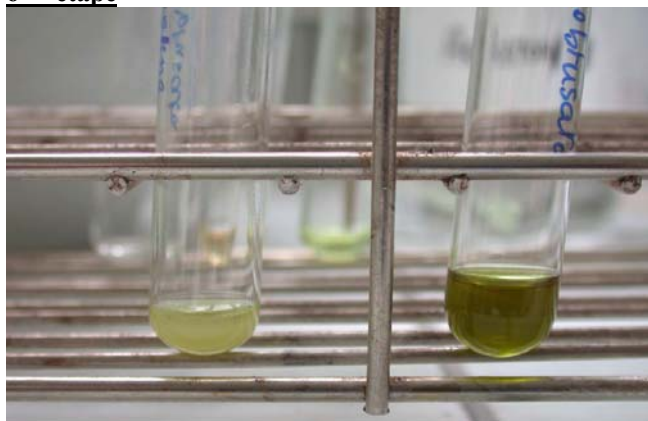
- Aspirez avec une pipette pasteur l'extrait, en appliquant celle-ci contre le coton.
- Transvasez l'extrait dans un nouveau tube en verre.

5^{ème} étape



Laisser le solvant s'évaporer tranquillement en observant régulièrement. Lorsque le seuil de solubilité de la substance est atteint, le composé majoritaire va précipiter au fond du tube.

6^{ème} étape



Prélever le surnageant délicatement en laissant la poudre au fond et transvaser le dans un autre tube (appelé X).

7^{ème} étape

Prélever le surnageant délicatement en laissant la poudre au fond.
Remettre quelques gouttes d'acétone sur la poudre pour la « laver ». Laisser reposer et prélever à nouveau le surnageant pour le mettre dans le tube X. La solution doit posséder une couleur franche.



8^{ème} étape



Laisser le solvant s'évaporer.

On obtient une poudre au fond du tube qui correspond au composé majoritaire du lichen qui peut être alors grattée, stockée et étiquetée.

9^{ème} étape

Pour vérifier sa pureté, il est possible de réaliser une CCM pour voir si un seul composé est présent (au moins majoritairement).

Comment obtenir des composés témoins ?

1. Principe

Après avoir mis à migrer un extrait de lichen, de nombreux spots apparaissent sur la plaque de CCM et il s'agit de pouvoir les identifier. Deux façons sont possibles :

- On dispose d'une échantillothèque de composés témoins qu'il suffira de déposer en même temps que l'échantillon à analyser sur la plaque CCM.
- On ne dispose pas d'échantillons témoins et on fera alors appel dans ce cas à des publications scientifiques rapportant le Rf de nombreux composés lichéniques. Cependant reproduire les mêmes conditions (saturation de la cuve, température...) est difficile et obtenir les mêmes résultats que les publications est parfois difficile.

Il est possible de pouvoir facilement se constituer une échantillothèque chez soi car les lichens ont la caractéristique de posséder des composés de façon majoritaire qui précipitent après l'extraction car devenant rapidement insolubles lorsque le volume de solvant est faible.

Avant d'entreprendre ce travail d'isolement de composés majoritaires, il s'agit de rechercher dans la bibliographie quels sont les composés majoritaires présents de façon non ambiguë dans un lichen particulier.

Ex : *Stereocaulon evolutum* : plusieurs composés sont présents mais l'atranorine est omniprésente et en quantité importante. En respectant le protocole suivant, il sera aisé d'isoler de l'atranorine en quantité suffisante pour qu'elle puisse servir de témoin lors de la mise en œuvre par la suite de CCM.

2. En pratique

De la même façon que pour la mise en œuvre d'une CCM, 9 étapes sont nécessaires à l'isolement de composés de référence (scénario ci-après).



Les précautions énoncées ci-dessus concernant la mise en œuvre de la CCM sont toujours valables.

Par rapport à la mise en œuvre de l'identification d'un composé en utilisant la CCM, l'isolement de composés témoins majoritaires dans le lichen nécessite inévitablement plus de matériel lichénique car le taux maximal d'extraction d'un composé est généralement inférieur à 1% d'autant plus que la méthode d'extraction employée est une macération à froid (le rendement est plus faible qu'avec d'autres techniques).

3. Comment vérifier la pureté et l'identité de la substance ?

La méthode la plus simple et accessible (à défaut d'avoir toutes les techniques disponibles pour l'identification d'une substance comme la RMN, spectrométrie de masse...) est la

réalisation d'une CCM. Si le composé témoin est pur, il n'y aura qu'un seul spot de visible sur la CCM quelque soit la technique de révélation.

Pour vérifier son identité, il faut alors faire des recherches dans des publications scientifiques. Certaines publications comme celles de Culberson rapportent des tables de composés identifiés par leur Rf et ce, en fonction de solvants utilisés. Culberson a utilisé 3 systèmes de solvants A, B, C mais le solvant A n'est plus actuellement utilisé car il contient du benzène reconnu comme cancérigène (Culberson 1972).

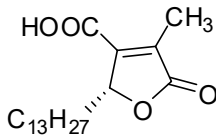
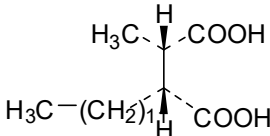
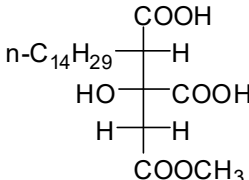
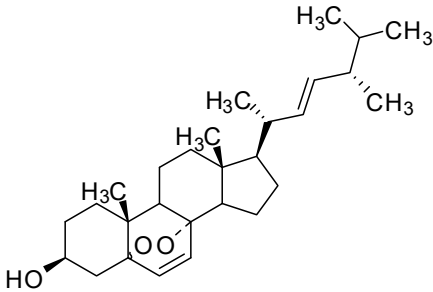
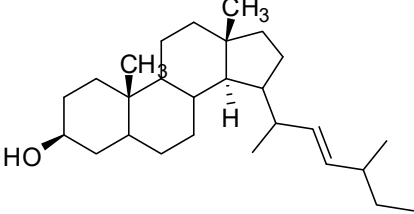
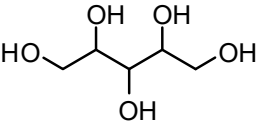
Il reste ainsi les données des solvants B et C. Culberson a également pour éviter les biais dus à la migration en fonction des différentes conditions (température, évaporation des solvants, plaques de silice de marque différente,...) ajouté dans ses tables le Rf de l'acide norstictique et de l'atranorine qui jouent le rôle d'étalons internes afin de normaliser le Rf obtenu.

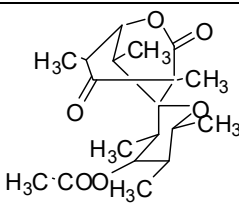
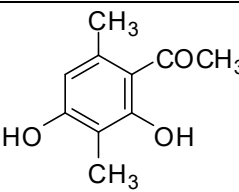
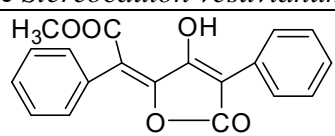
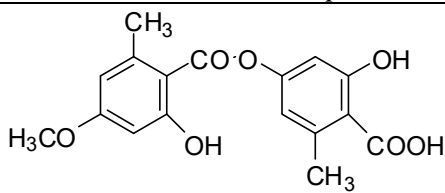
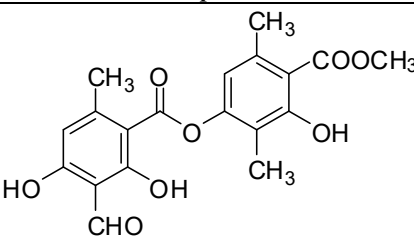
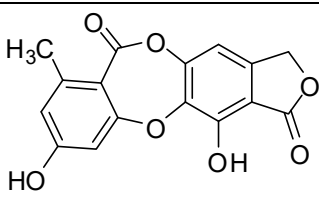
Bibliographie

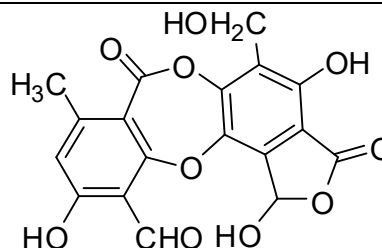
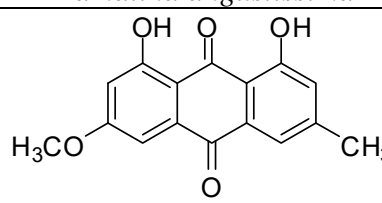
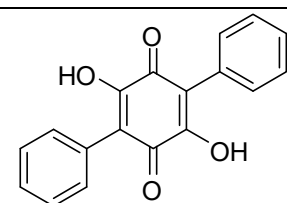
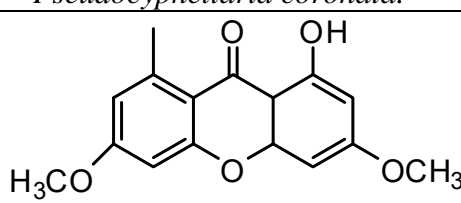
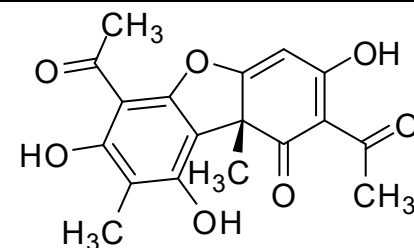
Burgot, G. and J. Burgot (2002). Méthodes instrumentales d'analyse chimiques et applications. Paris, Lavoisier.

Culberson, C. (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.

Tableau 1 : Les grandes familles de composés retrouvés dans les lichens

Famille de molécule		Illustration par la structure
substances aliphatiques	lactoniques	 <p>acide lichestérinique identifié la première fois chez <i>Cetraria ericetorum</i>.</p>
	diacides	 <p>acide rocellique identifié la première fois chez <i>Rocella phycopsis</i></p>
	triacides	 <p>acide capératique identifié la première fois chez <i>Flavoparmelia caperata</i></p>
	Stéroïdes	 <p>peroxyde d'ergostérol extrait de <i>Dactylina artica</i>, <i>Peltigera aphthosa</i> et <i>Usnea florida</i>.</p>
	Terpénoïdes	 <p>brassicasterol isolé de <i>Stereocaulon</i></p>
Polyalcools	 <p>arabitol, identifié la première fois chez <i>Lobaria pulmonaria</i>.</p>	

Substances aromatiques	Composés neutres		 <p>acétylportentol extrait de <i>Rocella fuciformis</i>.</p>	
	Composés aromatiques monocycliques		 <p>Orcinol carboxylate de méthyle extrait de <i>Parmotrema tinctorum</i>, <i>Stereocaulon alpinum</i> et de <i>Stereocaulon vesuvianum</i>.</p>	
	Acides pulviniques		 <p>acide vulpinique identifié la première fois chez <i>Letharia vulpina</i></p>	
	Depsides	<u>Série de l'orcinol</u>		 <p>acide évernique identifié la première fois chez <i>Loxospora elatina</i></p>
		<u>Série du β-orcinol</u>		 <p>atranorine, identifié la première fois chez <i>Parmotrema tinctorum</i></p>
	Depsidones	<u>Série de l'orcinol</u>		 <p>acide variolarique identifié la première fois chez <i>Ochrolechia parella</i></p>
		<u>Série β-orcinol</u>		page suivante ⇨⇨⇨

		<p><u>Série du β- orcinol</u></p>  <p>acide salazinique extrait du genre <i>Parmelia</i>, de <i>Ramalina angustissima</i>...</p>
Quinones	<p><u>Dérivé de l'hydroxy- antra- quinone</u></p>  <p>pariétine identifiée la première fois chez <i>Xanthoria parietina</i></p>	
	<p><u>Dérivés du phénanthrène quinone</u></p> <p>biruloquinone identifié la première fois chez <i>Parmelia birulae</i></p>	
	<p><u>Terphenyl- quinone</u></p>  <p>acide polyporique identifié la première fois chez <i>Pseudocyphellaria coronata</i>.</p>	
Xanthonés		 <p>lichexanthone identifié la première fois chez <i>Hypotrachyna formosana</i>, et <i>Lecidella stogmatea</i>...</p>
Dérivés du benzofurane		 <p>acide usnique, identifié la première fois chez <i>Evernia prunastri</i> (Ac. usnique (+)) et chez <i>Cladonia stellaris</i> (Ac. usnique (-))</p>