

Phyton (Austria)	Vol. 15	Fasc. 3—4	239—249	15. VII. 1974
------------------	---------	-----------	---------	---------------

Modalités d'action de différents extraits d'*Evernia prunastri* et de *Cornicularia muricata* chez la *Nigella damascena*

Par

Jean L. RAMAUT, Noël DEGRAEVE & Jean MOUTSCHEN *)

Avec 2 figures

1. Introduction

Plusieurs travaux ont relaté soit l'action inhibitrice des acides lichéniques, soit des extraits de thalles sur la germination de nombreuses graines d'Angiospermes. Parmi ceux-ci retenons ceux de FOLLMANN & al. 1966 qui constatent que certains acides ou homogénéisats de thalles sont capables de réduire la taille et la biomasse des plantules soumises à leur action; celui de PYATT 1967 qui remarque que, dans des associations dunales envahies par *Peltigera canina*, on assiste à une inhibition de la germination de diverses graminées ainsi qu'à un ralentissement de leur croissance.

Fréquemment, l'inhibition observée a été attribuée à un ou plusieurs acides lichéniques spécifiques (Depsides et Depsidones) présents dans le thalle, bien que l'on soit conscient de leur faible solubilité en milieu aqueux. En réalité, l'inhibition n'est pas nécessairement due aux seuls acides lichéniques présents, mais peut très bien dépendre soit de leurs produits d'hydrolyse, soit d'autres substances non encore identifiées. Ainsi, RAMAUT & THONAR 1972 ont montré que l'action des extraits de thalles d'*Evernia prunastri* dépendait peu de l'acide évernique, mais pratiquement de deux de ses produits d'hydrolyse, l'orcicol et le sparassol.

Si, jusqu'à présent, nous sommes bien informés quant à l'action de nombreux extraits de thalles et des acides lichéniques qu'ils contiennent sur la germination des graines et la croissance des plantules, nous sommes beaucoup moins renseignés sur la manière dont ces extraits ou ces acides agissent à l'échelle cellulaire.

*) Prof. Dr. J. L. RAMAUT, Université de Liège, Département Botanique, Botanique Pharmaceutique, Sart Tilman, B-4000 Liège; et Prof. Dr. J. MOUTSCHEN, Laboratoire de Génétique, 15 rue Forgeur, B-4000 Liège.

GEROLA 1947 constate que les mitoses des racines de blé sont totalement bloquées par un extrait aqueux d'*Usnea* et fortement ralenties par un extrait aqueux d'*Evernia*. RONDON 1966 signale une action antimitotique importante de la part de *Roccella fucoides* vis-à-vis des caryopses de blé. GOUDARD 1969 traitant des racines d'*Allium* par des extraits de ce même lichen conclut à une action mitoclasique typique. L'extrait de *Roccella* semble se comporter comme un poison du fuseau altérant le fonctionnement de cet appareil et inhibant la formation de la plaque équatoriale, ce qui donne des aspects atypiques aux métaphases.

Enfin, récemment, STURELID & LUNDSTRÖM 1972 ont étudié l'influence d'extraits aqueux de quatre lichens sur les cellules méristématiques de *Vicia faba*.

Les extraits de *Nephroma arcticum* ont une activité antimitotique importante; ceux de *Peltigera aptosa* et de *Hypogymnia physodes* sont moins actifs et ceux de *Cetraria islandica* sont pratiquement inactifs.

Aucune lésion des chromosomes n'a été observée.

En présence du peu d'informations touchant le mécanisme d'action des extraits de thalle de lichens, nous nous sommes attachés à étudier le mode d'action de trois types d'extraits de thalles d'*Evernia prunastri* et de *Cornicularia muricata* au niveau des cellules radiculaires de la Nigelle de Damas, espèce connue pour sa grande sensibilité à beaucoup d'agents mutagènes physiques et chimiques (MOUTSCHEN & MOUTSCHEN-DAHMEN 1965).

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel

Les thalles d'*Evernia prunastri* et de *Cornicularia muricata* sont récoltés au mois de décembre.

Ils sont lyophilisés puis réduits en poudre en vue de préparer les trois types d'extraits.

a) Extraits aqueux

25 grammes de poudre de lichen sont mis à macérer pendant environ 15 heures dans 100 ml d'eau distillée. L'extrait est alors filtré et conservé à 4 ° C; il constitue une solution mère de concentration 25% ou extrait aqueux à 25%.

b) Extraits selon la méthode de STOLL & al. 1947.

20 grammes de poudre de lichen sont mis à macérer pendant environ 15 heures dans un mélange de 97,5 ml d'une solution de glucose à 5% et de 2,5 ml d'une solution de NaOH 0,1 N.

Après filtration, l'extrait est conservé à 4 ° C. Nous le désignons „Extrait selon Stoll à 20%“.

c) Extraits selon la méthode de BUSTINZA 1948

30 grammes de poudre de lichen sont mis à macérer pendant environ 15 heures dans 100 ml d'une solution de tampon phosphate (selon Soerensen) à pH 7.0.

Après filtration, l'extrait est conservé à 4 ° C. Nous le désignons „Extrait selon Bustinza à 30%“.

Les solutions à diverses concentrations utilisées pour les traitements sont préparés extemporanément par dilution des extraits de départ.

Le matériel traité, la graine de *Nigella damascena*, a été amplement décrit (MOUTSCHEN & MOUTSCHEN-DAHMEN 1965). Son utilisation dans les recherches sur les effets cytotoxiques des radiations ionisantes et des substances mutagènes a été soulignée à diverses reprises (GILOT & al. 1967; MOUTSCHEN 1968; MOUTSCHEN & al. 1969).

Au cours des présentes expériences, c'est à la variété horticole 'Miss Jekyll double' que nous avons eu recours.

2.2. Méthodes

a) Traitement des graines

Les graines sont immergées pendant 6 heures dans les solutions de traitement. Elles sont ensuite lavées puis mises à germer en boîtes de Pétri (9 cm de diamètre) sur papier filtre imbibé d'eau distillée, à raison de 50 graines par boîte, à l'étuve à 20 ° C. Après 60 heures de germination, période qui correspond à la première mitose consécutive au début de la germination, les méristèmes sont fixés.

b) Traitement des racines

Les graines sont d'abord mises à germer dans les conditions décrites ci-dessus pendant une période de 5 à 6 jours. Les racines sont alors immergées pendant 2 heures dans les solutions de traitement. Elles sont ensuite lavées, puis replacées dans les conditions normales de culture jusqu'au moment, de la fixation. Les méristèmes radiculaires sont fixés respectivement 2, 6, 24 et 48 heures après la fin du traitement.

c) Techniques cytologiques

Après fixation au mélange de Carnoy (2 à 24 heures), le matériel est coloré par la méthode de Feulgen et préparé en squash. Les préparations sont montées au Depex. Notons que les racines devant servir à l'observation de métaphases sont traitées pendant 2 heures par une solution de coldicine à 0.05% avant la fixation.

3. Résultats

3.1. Traitement des graines

A. Inhibition de la germination. Les extraits aqueux ainsi que ceux préparés selon Bustinza à partir de thalles d'*Evernia* inhibent fortement la germination des graines de *Nigella* (figure 1). A la concentration de 10%, il s'agit surtout d'un retard de la germination; pour des concentrations supérieures, le nombre de graines développant une racine principale est plus

faible et à la concentration de 20%, l'inhibition est totale. Les extraits préparés suivant la technique de Stoll sont moins actifs: à la concentration de 20%, 35% des graines ont germé avec cependant un retard de plusieurs jours par rapport au groupe témoin.

Tous les extraits de *Cornicularia muricata* sont presque totalement inactifs. Aux concentrations maximales utilisées, le pourcentage de germination est proche de celui du groupe témoin (figure 2).

B. Effets radiomimétiques. Aux concentrations utilisées, les extraits d'*Evernia* et de *Cornicularia* ont induit des taux de lésions en méta-phase du même ordre de grandeur que celui observé chez le groupe témoin (tableau 1).

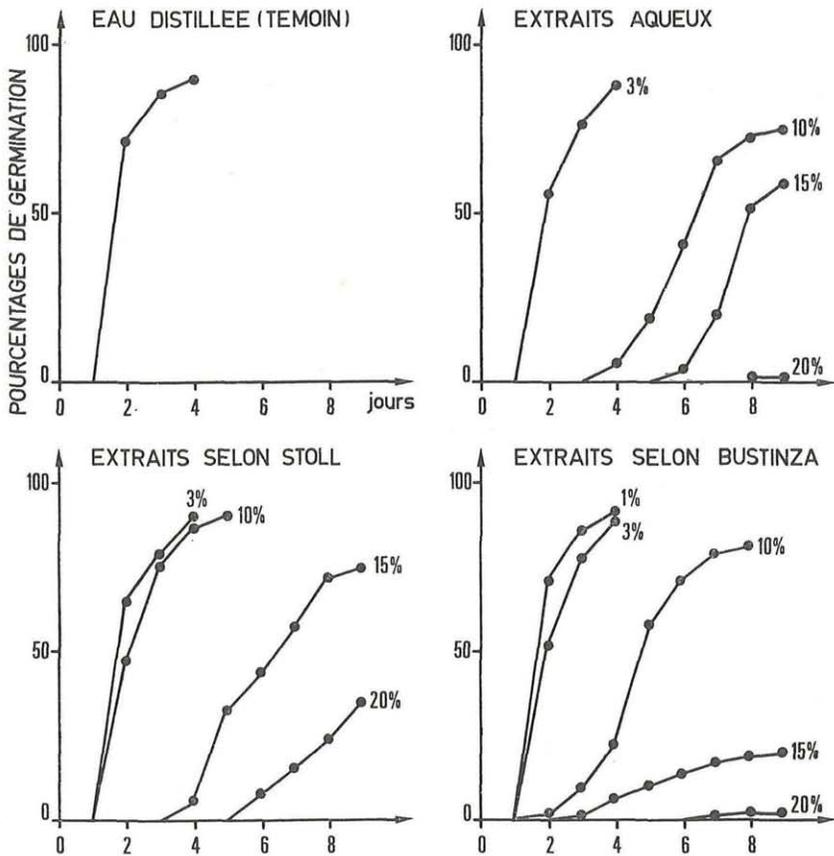


Figure 1

Inhibition de germination induite par des extraits d'*Evernia* (graines de *Nigella damascena* traitées 6 heures). Pourcentages de germination pour 2×50 graines.

3.2. Traitement des racines

A. Effets cytotoxiques. Les extraits d'*Evernia* exercent des effets cytotoxiques marqués (pynose, caryolyse, caryorhexis) et provoquent une inhibition mitotique croissante avec leur concentration. Aux doses les plus élevées, on note une dégénérescence méristématique.

La séquence selon laquelle les effets ont été observés est la suivante:

— 2 heures après la fin du traitement

Extraits aqueux

1‰: le méristème a un aspect normal

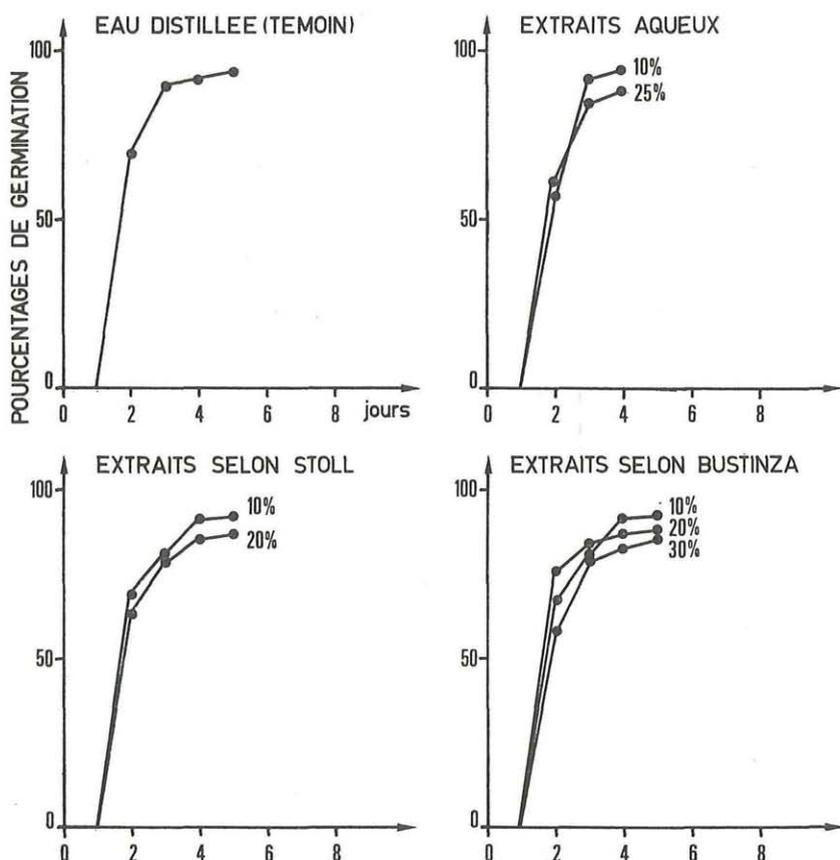


Figure 2

Inhibition de germination induite par des extraits de *Cornicularia* (Graines de *Nigella damascena* traitées 6 heures). Pourcentages de germination pour 2×50 graines.

3‰: légère inhibition mitotique

6‰: inhibition mitotique totale, les cellules sont tuées

Extraits selon Stoll

1‰: aspect normal

3‰: il ne reste que quelques mitoses; beaucoup de cellules sont pycnotiques; les chromosomes sont vacuolisées

Extraits selon Bustinza

6‰: aspect normal

10‰: inhibition mitotique totale, les cellules sont tuées

— 6 heures après la fin du traitement

Extraits aqueux

1‰: aspect normal

Tableau 1

Action radiomimétique des extraits lichéniques après traitement de graines de *Nigella damascena* pendant 6 heures.

Extrait	Pourcentage de lésions
1. <i>EVERNIA</i>	
a) aqueux 3%	1.50
10%	1.00
15%	2.50
b) selon Stoll 3%	1.50
10%	3.50
15%	0.00
20%	1.00
c) selon Bustinza 3%	2.00
10%	2.50
15%	0.00
2. <i>CORNICULARIA</i>	
a) aqueux 10%	1.00
25%	2.00
b) selon Stoll 10%	0.50
20%	1.50
c) selon Bustinza 10%	1.50
20%	1.50
30%	1.50
3. <i>TEMOIN</i>	
eau distillée	1.00

3^o/_o: forte inhibition mitotique

6^o/_o: inhibition mitotique totale

Extraits selon Stoll

1^o/_o: aspect normal

3^o/_o: inhibition mitotique totale, pycnose

Extraits selon Bustinza

6^o/_o: aspect normal

10^o/_o: inhibition mitotique totale, pycnose

— 24 heures après la fin du traitement

Extraits aqueux

3^o/_o: aspect normal

6^o/_o: inhibition mitotique totale; les cellules perdent leur aspect méristématique

Extraits selon Stoll:

1^o/_o: aspect normal

3^o/_o: inhibition mitotique totale, les cellules sont peu colorées et forment des files

Extraits selon Bustinza

6^o/_o: aspect normal

10^o/_o: début de dégénérescence du méristème; on retrouve des cellules, mais elles ont perdu leur aspect méristématique: caryolyse et caryorhexis

— 48 heures après la fin du traitement

Extraits aqueux

3^o/_o: aspect normal

6^o/_o: méristème totalement désagrégé

Extraits selon Stoll

1^o/_o: aspect normal

3^o/_o: méristème complètement dégénéré

Extraits selon Bustinza

6^o/_o: aspect normal

10^o/_o: méristème complètement désagrégé

Les extraits de *Cornicularia* ne produisent ni nécrose ni effets cytotoxiques marqués.

On note seulement une légère inhibition mitotique 2 heures après les traitements à la concentration de 20^o/_o par les extraits aqueux et selon Bustinza.

B. Effets radiomimétiques. Dans tous les cas où des métaphases ont pu être observées, la fréquence des lésions chromosomiques n'est pas significativement supérieure à celle des témoins quels que soient la concentration et le type d'extraction pour les deux lichens (tableau 2).

On peut donc considérer que les extraits testés produisent peu ou pas de lésions, visibles au niveau des chromosomes, susceptibles d'être transmises héréditairement, quelle que soit la phase du cycle mitotique traitée.

4. Discussion

Les expériences réalisées montrent que les extraits d'*Evernia prunastri* exercent à la fois une inhibition mitotique et des effets dégénératifs au niveau nucléaire pouvant aller jusqu'à la disparition de la zone méristématique. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les observations faites à propos de la germination de certaines graines d'angiospermes (RAMAUT & THONAR 1972).

Par contre, nous n'avons pas observé d'effets stathmocinétiques comme l'avait signalé GOUDARD 1969, après traitement de racines d'*Allium* par des extraits de *Roccella fucoides*, qu'il s'agisse de figures mérosthathmocinétiques, classiquement décrites dans la littérature sous le nom de C-mitoses ou totale-

Tableau 2

Action radiomimétique des extraits lichéniques après traitement de racines de *Nigella damascena* pendant 2 heures. (Pourcentages de lésions pour 200 métaphases)

Extraits		Temps après la fin du traitement (en h.)			
1. EVERNIA					
a) aqueux	1%	0.5	2.0	1.0	1.0
	3%	1.0	0.0	2.0	1.0
	6%	—	—	—	—
b) selon Stoll	1%	2.0	0.0	1.0	1.0
	3%	—	—	—	—
c) selon Bustinza	1%	1.0	0.5	0.0	0.5
	3%	2.0	1.0	0.0	2.0
	6%	2.5	0.5	0.5	0.5
	10%	—	—	—	—
2. CORNICULARIA					
a) aqueux	5%	1.5	0.5	2.0	1.5
	10%	1.0	0.0	1.0	0.5
	20%	2.5	1.5	1.0	1.0
b) selon Stoll	5%	2.0	1.0	0.0	0.5
	10%	0.5	1.5	1.0	3.0
c) selon Bustinza	20%	2.5	1.0	1.0	2.5
	5%	3.5	2.0	2.0	1.0
	10%	2.5	2.0	2.0	0.0
	20%	1.5	1.0	1.0	0.5
3. TEMOIN					
eau distillée		1.0	0.0	0.0	1.0

ment stathmocinétiques et aboutissant dans ce cas à une autopolyploidisation des cellules méristématiques.

Les taux de lésions chromosomiques obtenus dans les racines traitées sont toujours du même ordre de grandeur que chez les plantes témoins. Ceci confirme les résultats de STURELID & LUNDSTRÖM 1972 chez *Vicia*.

Rappelons d'ailleurs que LEVAN & TJIO 1948, traitant des racines d'*Allium* par des solutions d'orcinol, n'ont observé aucune aberration chromosomique mais seulement des effets cytotoxiques banaux semblables à ceux que nous avons décrit.

Les extraits de *Cornicularia*, contrairement à ceux d'*Evernia*, ne montrent pratiquement aucune toxicité chez la *Nigella*.

Chimiquement, entre *Evernia* et *Cornicularia*, une différence majeure existe. *Evernia* abrite des corps phénoliques tels que l'atranorine, l'acide évernique, le sparassol et l'orcinol. *Cornicularia* renferme les acides rangiformique et protolichestérinique qui sont respectivement un acide tribasique et un acide lactonique monobasique. Ici, il ne s'agit donc pas de molécules phénoliques.

Il semble donc bien que les effets observés chez la *Nigella* peuvent être attribués à ces molécules phénoliques et plus particulièrement sans doute à l'orcinol et au sparassol.

Ces substances n'exerceraient cependant que des effets inhibiteurs banaux et ne provoqueraient pas de remaniements dans la structure chromosomique.

5. Résumé

En vue d'étudier le mécanisme d'action des extraits lichéniques au niveau cellulaire, des extraits d'*Evernia prunastri* et de *Cornicularia muricata* ont été préparés selon trois techniques: extraits aqueux, extraits dans un mélange glucose-NaOH (méthode de Stoll), extraits dans un tampon phosphate (méthode de Bustinza).

Des graines de *Nigella damascena* ont été traitées pendant 6 heures par diverses concentrations de ces extraits. Les extraits d'*Evernia* inhibent la germination, alors que ceux de *Cornicularia* sont inactifs. Aucun effet cytologique n'a été observé dans les premières mitoses radiculaires.

Une étude des effets d'un traitement de racines pendant 2 heures a également été réalisée au moyen de prélèvements effectués de 2 à 48 heures après la fin du traitement.

Aucun effet radiomimétique n'a été obtenu, mais les extraits d'*Evernia* induisent des anomalies nucléaires (pyncnose, caryorhexis, caryolyse), ainsi qu'une forte inhibition mitotique et, aux concentrations les plus élevées, une dégénérescence du méristème.

Les relations entre les effets observés et les acides lichéniques contenus dans les divers extraits sont envisagées.

6. Zusammenfassung

Um den Einfluß von Flechtenextrakten auf weitere Zellsysteme zu untersuchen, wurden aus *Evernia prunastri* und aus *Cornicularia muricata* je drei verschiedene Extrakte hergestellt und zwar: wässriger Extrakt, Extrakt in einem Gemisch von Glucose-NaOH nach der Stoll-Methode und Extraktion in Phosphatpuffer nach der Bustinza-Methode.

Samen von *Nigella damascena* wurden während 6 Stunden mit den Flechtenextrakten verschiedener Konzentration behandelt. *Evernia*-Extrakte hemmten das Keimen der Samen, während *Cornicularia*-Extrakte ohne Einfluß blieben. Ebenso wurden in den Wurzelspitzen während der ersten Mitosen keine abweichenden zytologischen Befunde festgestellt.

Von Wurzeln, die während zwei Stunden dem Einwirken von Flechtenextrakten ausgesetzt waren, wurden nach Versuchsende Proben in Abständen zwischen 2 und 48 Stunden untersucht. Radiomimetisch konnten keine Effekte beobachtet werden. Die *Evernia*-Extrakte führten dagegen zu Kernanomalien wie Pyknose, Karyorhexis, Karyolyse, und hemmten die Mitosetätigkeit; bei den höchsten Konzentrationen zeigte sich eine Degeneration der Meristeme.

Mögliche Wechselwirkungen zwischen den beobachteten Effekten und den Flechtensäuren in den verschiedenen Extrakten werden diskutiert.

7. Summary

With the scope to elucidate the mechanisms of seed germination inhibition due to lichenic acid extracts were prepared from *Evernia prunastri* and *Cornicularia muricata* thalli following three techniques in distilled water, in a mixture glucose-NaOH or in phosphate buffer.

Nigella damascena seeds were immersed (6 h.) in a solution of each extract at increased concentrations. *Evernia* extracts were more germination inhibiting than *Cornicularia*. No cytological effect was observed during the first mitotic cycle after seed treatment.

In the same way, no radiomimetic effect was obtained from 2 to 48 h. after root tip treatment (2 h.), but with *Evernia* only nucleus anomalies (pynosis, karyorhexis, karyolysis) could be described as well as mitotic inhibition and finally root tip degeneration.

The relationship between the effects obtained so far and the kind of lichenic acids is discussed.

8. Références

- BUSTINZA F. & CABALLERO A. 1948. A contribucion al estudio de los liquenes. — Anales Jard. bot. Madrid 7.
FOLLMANN G. & PETERS G. 1966. Flechtenstoffe und Bodenbildung. — Z. Naturforsch. 21 b: 386—387.
GEROLA F. M. 1947. Prussati e mitosi cellulari. — Atti Ac. Naz. Lincei, Rendic. Cl. Fis. Mat. Nat. 3: 387—389.

- GILOT J., MOUTSCHEN-DAHMEN M. & MOUTSCHEN J. 1967. Mutagenesis with ethylmethanesulfonate in *Nigella damascena* L. — *Experientia* 23: 673.
- GOUDARD M. 1969. Contribution à l'étude du mécanisme de l'action phytocide d'un lichen: *Roccella fucoides* (DICKS.). Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Marseille. Thèse de doctorat en pharmacie.
- LEVAN A. & TJO J. 1948. Induction of chromosome fragmentation by phenols. — *Hereditas* 34: 453—484.
- MOUTSCHEN J. 1968. Some implications of radio induced structural changes of chromosomes in *Nigella damascena* L. — *The Nucleus* 11: 177—183.
- & MOUTSCHEN-DAHMEN M. 1965. A suitable plant material for chromosome breakage studies: *Nigella damascena* L. — *Naturwissenschaften* 20: 566—567.
- — & GILOT J. 1969. Modifications with chelating agents of the effects of γ ray fractionated exposures on chromosome aberrations. — *Experientia* 25: 998.
- PYATT F. B. 1967. The inhibition influence of *Peltigera canina* on the germination and subsequent growth of graminaceous seeds. — *The Bryologist* 70: 326—329.
- RAMAUT J. & THONAR J. 1972. Inhibition de la germination de différentes graines d'Angiospermes par *Evernia prunastri* (L.) ACH. I. & II. — *Anales Quimica, Homenaje al Prof. RIBAS-MARQUES*, 68 (5—6): I: 575—595; II: 597—607.
- RONDON Y. 1966. Action inhibitrice de l'extrait du lichen *Roccella fucoides* sur la germination. — *Bull. Soc. bot. Fr.* 113: 1—2.
- STOLL A., RENZ T. & BRACK A. 1947. Antibiotika aus Flechten. — *Experientia* III/3: 111—113.
- STURELID S. & LUNDSTRÖM H. 1972. The influence of lichen extracts on *Vicia faba* and Chinese Hamster cells. — *Experientia* 27: 1238—1239.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1974

Band/Volume: [15_3_4](#)

Autor(en)/Author(s): Ramut Jean L., Moutschen Jean

Artikel/Article: [Modalités d'action de différents extraits d'*Evernia prunastri* et de *Cornicularia muricata* chez la *Nigella damascena*. 239-249](#)