

# À LA CONQUÊTE DE L'USNÉE

Emilie Girard et Evelyne Mc Kenzie

## ABSTRACT

In Québec, the risks of having a mycosis are increasing. However, the medicines that are given to cure this infection have many side effects and medical contraindications. They are also very expensive (Internet 1). *Usnea*, a little-known lichen of the boreal forest, is recognised as an antifungal. According to the scientific community, it is the usnic acid in this lichen that has this effect (Internet 2). The first hypothesis is that *usnea* has an antifungal effect on *Mucor hiemalis*, a specie of mold. The second one is that the antifungal effect increases with the concentration of usnic acid. The first step of the experimentation was to pick the lichen in the forest. When the lichen was dry, the usnic acid was extracted from *Usnea* by many steps. Ethanol was used as a solvent for the extraction. Also, *Mucor hiemalis* was sown in several agar that were prepared previously. Many solutions of different concentrations of canola oil and usnic acid were put in Petri plates. After many hours in a heat chamber at 25 °C, the growth of the mold was evaluated and the inhibition radius were measured. A graph proved that there is no link between the inhibition radius and the concentration of usnic acid, because the coefficient of determination is nearly zero. Consequently, both hypotheses are refuted.

**MOTS CLÉS :** Biologie, usnée, lichen, acide usnique, antifongique, moisissure.

## 1.0 INTRODUCTION

Les mycoses, infections causées par un mycète, mieux connu sous le nom de champignons et moisissures, sont un problème de santé très fréquent au Québec. Un grand nombre d'hommes et de femmes doivent alors utiliser un antifongique pour soigner ces mycoses. Cependant, ces produits médicamenteux peuvent être coûteux, représenter des risques pour la santé et avoir de nombreuses contre-indications. Par exemple, les femmes allaitantes doivent à tout prix les éviter (Internet 2). Ces mêmes antifongiques sont également

reconnus pour réagir avec plusieurs médicaments (Internet 2). Selon la littérature scientifique, l'usnée, lichen peu utilisé de la forêt boréale, serait reconnue pour ses propriétés antifongiques et antibactériennes. Cet organisme méconnu représente un grand potentiel pour traiter les mycoses (Internet 1).

L'expérimentation cherchera alors à vérifier les deux hypothèses suivantes. L'usnée a un effet antifongique sur *Mucor hiemalis*, un zygomycète. Aussi, plus la concentration en usnée est élevée, plus l'effet antifongique est efficace.

### 1.1 Usnée

Un lichen est un organisme formé d'un mycète et d'une algue en symbiose, c'est-à-dire une association où chacun en tire des bénéfices (Campbell, 2012). L'usnée est en genre de lichen poussant sur les branches et les troncs des épinettes noires et des sapins assez âgés. Son thalle est vert pâle et forme de très fins filaments élastiques (Internet 3). *Usnea filipendula*, aussi appelée *Usnea barbata*, est l'espèce d'usnée la plus abondante dans la forêt boréale. Toutes les espèces d'usnée contiennent de l'acide usnique en très grande quantité contrairement aux genres *Alectoria* et *Evernia* qui en contiennent peu (Charbonneau, 2019).

### 1.2 Acide usnique

L'acide usnique,  $C_{18}H_{16}O_7$ , a été isolée pour la première fois en 1844 par le scientifique allemand Wilhelm Knop (Internet 4). Cette substance est une poudre jaune très fine dont le point de fusion est de 204 °C (*Handbook* édition 72). L'acide usnique est surtout reconnu pour ses propriétés antimicrobiennes et antifongiques. Cette substance est couramment utilisée dans les produits de cosmétique et de parfumerie en tant qu'agent de conservation (Internet 5).

### 1.3 *Mucor hiemalis*

*Mucor hiemalis* est un zygomycète, c'est-à-dire une moisissure qui se reproduit de façon sexuée par la fusion des gamètes afin de produire des œufs appelés zygospores (Internet 6). Cette moisissure formant une colonie de couleur ocre assure la décomposition des végétaux. Elle se développe à une température

d'incubation de 25 °C dans une gélose de dextrose de patate (Internet 7).

### 1.4 Rayon d'inhibition

Un rayon d'inhibition est la mesure de la surface sur laquelle la croissance d'un organisme est ralentie ou bloquée (Internet 8).

### 1.5 Huile de canola

L'huile de canola est une substance pouvant moisir. Elle n'est alors pas supposée inhiber la croissance de *Mucor hiemalis* (Internet 9).

## 2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans un premier temps, l'usnée a été cueillie dans la forêt près du lac Guilman. Pour les deux sorties, un total de 309,7 g d'usnée séchée a été récoltée.



Figure 1. Usnée.

Dans un deuxième temps, 20 géloses ont été préparées. Afin de préparer deux ballons à fond plat de solution, un poids de 9,75 g de dextrose de patate a été inséré dans chaque ballon avec 250 mL d'eau. Ils ont ensuite été portés à ébullition avec un agitateur magnétique. Une fois les solutions translucides, elles ont été placées dans l'autoclave à 121 °C. Lorsque la préparation était stérilisée, environ 3 mL de solution a été versée dans chaque vase de Pétri stérile. Une fois les géloses durcies, *Mucor hiemalis* se

trouvant dans le tube de transport a été ensemencé dans deux des vases de Pétri. Pour ce faire, dans un champ stérile formé par deux brûleurs Bunsen, de petits morceaux de la gélose du tube ont été prélevés à l'aide d'une anse bouclée préalablement stérilisée à la flamme. Ils ont ensuite été déposés sur les nouvelles géloses de dextrose de patate en s'assurant de mettre en contact le côté des moisissures avec celle-ci.

Par la suite, l'extraction de l'acide usnique à partir de l'usnée a été réalisée. Pour ce faire, 5 ballons de 1000 mL ont chacun été remplis de 20 g d'usnée et de 500 mL d'éthanol. Ces ballons ont chauffé à reflux durant 30 minutes selon le montage de la figure 2.

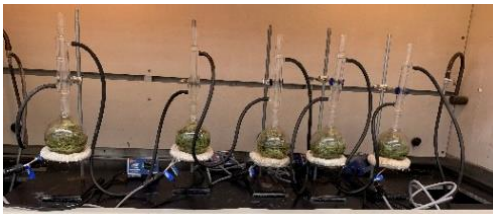


Figure 2. Montage du chauffage à reflux.

Le contenu des ballons a ensuite été filtré à l'aide d'un entonnoir et d'un papier filtre. Le filtrat contenu dans 5 béchers de 600 mL contenant chacun un agitateur magnétique a été placé dans un bain de glace durant 3 heures afin de faire cristalliser l'acide usnique selon la figure 3.

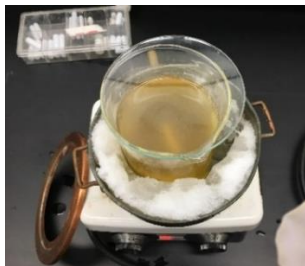


Figure 3. Montage de la cristallisation.

Une fois l'acide usnique cristallisé, une filtration sur Büchner a été effectuée selon la figure 4. Avant de sécher, les cristaux ont été lavés à l'éthanol. Les filtres contenant la poudre ont été déposés dans des vases de Pétri en verre.



Figure 4. Montage de la filtration sur Büchner.

Ensuite, la poudre séchée a été grattée. Avec ce solide, un test de point de fusion a été effectué afin de vérifier si la substance obtenue était bien de l'acide usnique.

Par la suite, des solutions de diverses concentrations contenant de l'acide usnique et de l'huile de canola ont été préparées. À l'aide de la formule de la concentration, un volume de 4 mL de la solution mère de 0,05 g/mL a été préparé en mélangeant 0,2 g d'acide usnique avec 4 mL d'huile de canola. Les autres concentrations ont été obtenues par des dilutions selon l'annexe 1. Les formules suivantes ont été utilisées afin de préparer les solutions:

$$C = \frac{m}{v}$$

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Pour continuer, dans un champ stérile, le reste des vases de Pétri, c'est-à-dire 17, ont été ensemencés dans le centre avec un

petit morceau d'une des gélases de moisissures précédemment préparées. Un scalpel stérilisé à la flamme a été utilisé afin de couper les moisissures. Dans chacun des vases de Pétri, deux tampons trempés dans une même solution préalablement préparée ont été déposés de chaque côté du morceau de moisissure selon la figure 5.

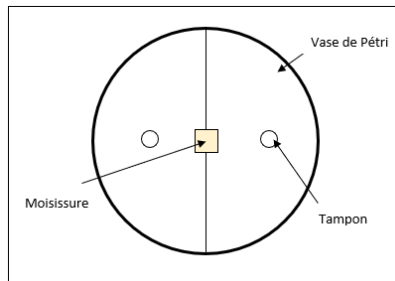


Figure 5. Disposition des vases de Pétri.

Chaque vase de Pétri a été réalisé selon les concentrations du tableau 1.

Tableau 1. Concentration en acide usnique selon le vase de Pétri.

| Nom du vase de Pétri | Concentration (g/mL) |
|----------------------|----------------------|
| 1A                   | 0                    |
| 1B                   | 0                    |
| 2A                   | 0,05                 |
| 2B                   | 0,05                 |
| 2C                   | 0,05                 |
| 3A                   | 0,03                 |
| 3B                   | 0,03                 |
| 3C                   | 0,03                 |
| 4A                   | 0,02                 |
| 4B                   | 0,02                 |
| 4C                   | 0,02                 |
| 5A                   | 0,01                 |
| 5B                   | 0,01                 |
| 5C                   | 0,01                 |
| 6A                   | 0,005                |
| 6B                   | 0,005                |
| 6C                   | 0,005                |

L'évolution de *Mucor hiemalis* a été évaluée après 51 heures et après 78 heures.

Afin d'obtenir plus de résultats, dix autres vases de Pétri ont été préparés avec la même méthode que précédemment. En remplacement des solutions d'acide usnique, des pâtes concentrées contenant de la poudre d'acide usnique et quelques gouttes d'huile ont été préparées. Pour un des vases, cette pâte a été déposée sur un tampon alors qu'elle a été apposée directement sur la gélose pour les autres. Des tampons secs et d'autres seulement trempés dans l'huile ont également été utilisés. Les vases de Pétri ont été réalisés selon le tableau 2.

Tableau 2. Contenu pour la deuxième expérimentation.

| Nom du vase de Pétri |
|----------------------|
| Pâte 1 (sur tampon)  |
| Pâte 2               |
| Pâte 3               |
| Pâte 4               |
| Huile                |
| Tampon sec           |

L'évolution de la croissance de la moisissure a été évaluée après 24 h, 26 h, 28 h et 47 h.

### 3.0 RÉSULTATS

Le point de fusion expérimental de l'acide usnique était de 199,7 °C.

Le graphique de la figure 6 présente les rayons d'inhibition des deux côtés de chaque vase de Pétri de la première partie de l'expérimentation en fonction de la concentration en acide usnique selon les données de l'annexe 2. Ce graphique

contient les données des rayons pris après 51 h dans l'étuve à 25 °C.

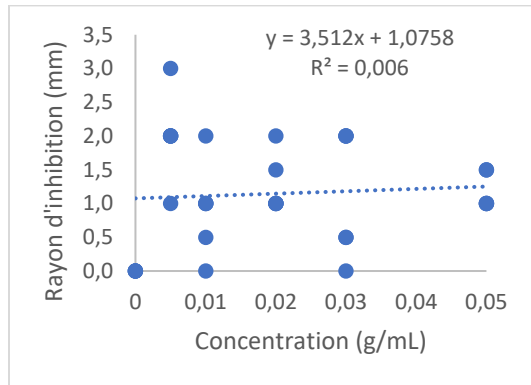


Figure 6. Graphique des rayons d'inhibition en fonction de la concentration en acide usnique.

Après 78 h, la moisissure recouvrait entièrement la gélose. Aucune donnée n'a alors été prise.

Le tableau 3 contient les rayons d'inhibition des deux côtés de chaque vase de Pétri de la deuxième partie de l'expérimentation. Ces rayons ont été pris après 47 h dans l'étuve à 25 °C.

Tableau 3. Rayons d'inhibition selon le contenu du vase de Pétri.

| Contenu de la gélose | Rayon d'inhibition côté 1 (mm) | Rayon d'inhibition côté 2 (mm) |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Tampon               | 0                              | 0                              |
| Huile                | 1                              | 0                              |
| Pâte 1 (sur tampon)  | 0                              | 0                              |
| Pâte 2               | 0                              | 0                              |
| Pâte 3               | 0                              | 0                              |
| Pâte 4               | 0                              | 0                              |

## 4.0 DISCUSSION

Les résultats de la figure 6 infirment la première hypothèse disant que l'usnée a un effet antifongique sur *Mucor hiemalis*. En effet, le coefficient de détermination de la figure 6 est de 0,006 ce qui signifie qu'il n'y a aucun lien entre les variables. Pour la seconde hypothèse, même si l'équation du graphique est positive, comme il n'y a pas de liens entre le rayon d'inhibition et la concentration, il n'est pas possible de confirmer que le rayon d'inhibition augmente avec la concentration d'acide usnique.

Plusieurs causes d'erreurs peuvent expliquer ce résultat. Premièrement, l'acide usnique n'était pas entièrement pur. Comme le point de fusion expérimental était inférieur à celui théorique, cela est un signe de la présence d'impuretés. Ces dernières sont probablement de la matière organique ou des substances polluantes de l'air qui ont été en contact avec ce lichen dans la nature. De plus, en hiver, l'usnée peut contenir moins de molécules actives qu'en été afin de se protéger du froid. Aussi, comme 4 béchers contenant l'acide usnique cristallisé et l'éthanol, c'est-à-dire plus du deux tiers des solutions, ont passé une nuit dans un réfrigérateur avant d'être filtrés sur Büchner, le solvant et la température peuvent avoir joué un rôle dans la pureté, car ils peuvent avoir détérioré l'acide usnique.

Deuxièmement, aucun des vases de Pétri n'était identique. Effectivement, les morceaux de moisissures n'avaient pas la même forme et la même position sur les géloses. Les tampons aussi n'étaient pas

aux mêmes endroits. Cela a pu influencer la vitesse de croissance de *Mucor hiemalis* ainsi que l'effet de l'acide usnique dans certains vases de Pétri.

Troisièmement, il n'était pas possible d'observer la croissance des moisissures durant toute la journée. Certains moments importants ont alors pu être manqués.

Pour la deuxième série de résultats, même si la concentration en acide usnique était beaucoup plus élevée pour les pâtes que pour la première partie de l'expérimentation, il n'y a eu aucun rayon d'inhibition. Le seul résultat obtenu était un rayon de 1 mm pour un tampon imbibé d'huile.

Ce résultat peut laisser penser que *Mucor hiemalis* n'aime pas l'huile, car cette dernière pourrait l'empêcher d'avoir accès aux nutriments de la gélose. C'est pourquoi elle aurait contourné le tampon afin de bien croître.

Pour les deux séries de résultats, rien n'était stérile. Des substances dans l'air, sur le matériel et sur nous ont pu entrer en contact avec l'acide usnique, diminuant sa pureté, ainsi que sur les géloses. Le développement des moisissures a pu en être affecté.

## 5.0 CONCLUSION

La première hypothèse était que l'usnée a un effet antifongique sur *Mucor hiemalis*. Il n'est pas possible d'affirmer que l'hypothèse est vraie. En effet, aucun lien n'a été trouvé entre les concentrations en acide usnique ainsi que les rayons d'inhibition formés.

La deuxième hypothèse était que plus la concentration en acide usnique est élevée, plus l'effet antifongique est efficace. Cette hypothèse est également infirmée, car aucun effet antifongique n'a été prouvé.

Le laboratoire dans lequel les expérimentations ont été effectuées ne permettait pas d'avoir les conditions optimales afin d'obtenir une substance pure. La limite de matériel et la contrainte de temps ont aussi nui aux résultats.

## 6.0 SUGGESTIONS ET PERSPECTIVES D'AVENIR

Afin d'accélérer le processus d'extraction, il serait judicieux d'évaporer une partie de l'éthanol avant d'effectuer la cristallisation ce qui faciliterait la filtration sur Büchner en plus de sauver beaucoup de temps. De plus, l'installation d'une caméra dans l'étuve permettrait d'avoir plus de données pour les rayons d'inhibition.

Cette expérimentation pourrait également être effectuée avec d'autres espèces de moisissures ou même avec des bactéries.

## REMERCIEMENTS

Nous voulons remercier notre tuteur, Martin Imbeault, pour nous avoir guidées tout au long du projet. Nous devons également souligner la grande aide et disponibilité de Jessica Maltais, technicienne en laboratoire, pour s'être déplacée la fin de semaine afin de nous permettre de surveiller l'évolution des moisissures. Nous remercions aussi Steve Gamache, enseignant en chimie et tuteur

du cours, pour sa précieuse aide lors de l'élaboration de l'extraction ainsi que Jean-Norbert Fournier, enseignant en mathématiques et en physique, pour son soutien lors de l'analyse des résultats. Nous sommes particulièrement reconnaissantes de l'aide de Samuel Girard sans qui ce projet n'aurait pas pu se faire avec une plante de la forêt

boréale, en plus de nous avoir grandement aidées pour la cueillette. Nous remercions aussi Jo-Annie Charbonneau pour son petit cours sur les lichens. Finalement, nous voulons souligner l'aide de Audrey Fortin, enseignante en anglais, pour l'aide lors de la composition de l'abstract.

## RÉFÉRENCES :

Internet 1: Situations à risque ou déconseillées. *Antifongiques : les points essentiels*. Pharmacomédicale. (30 mai 2018). Consulté le 10/04/2019. <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/antifongiques-les-points-essentiels>.

Internet 2 : Description. *Usnée barbue*. Santé o naturel. (4 décembre 2017). Consulté le 10/04/2019. <https://www.santeonaturel.com/plante-actif/usnee-barbue/>.

Internet 3 : Description usnée. *Usnea barbata (L.) Weber ex F.H. Wigg.* Mi-aime. Consulté le 10/04/2019. [http://www.mi-aime-a-ou.com/usnea\\_barbata.php](http://www.mi-aime-a-ou.com/usnea_barbata.php).

Internet 4: Identification. *Acide usnique*. Wikipédia. (8 janvier 2019). Consulté le 10/04/2019. [https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide\\_usnique](https://fr.wikipedia.org/wiki/Acide_usnique).

Internet 5 : Utilisations. *Acide usnique végétaux remède*. Apex Biotech LTD. (13 juin 2016). Consulté le 10/04/2019. <http://fr.apexnature.com/info/usnic-acid-herbal-remedy-852400.html>.

Internet 6 : Zygomycète. *Champignons*. Encyclopaedia Universalis. Consulté le 10/04/2019. <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/champignons/>.

Internet 7 : Diagnostic. *Mucor hiemalis*. La mycologie sur le Web. Consulté le 10/04/2019. <http://coproweb.free.fr/mycoweb/texte/7.htm>.

Internet 8: Définition. *Inhibition*. Notre famille. Consulté le 24/04/2019. <https://www.notrefamille.com/dictionnaire/definition/inhibition/>.

Internet 9 : Vigneault, A. Huile de canola. *Dangereux, les aliments rances?*. La Presse. Consulté le 24/04/2019. [http://mi.lapresse.ca/screens/cae21a8b-b03a-48e8-9e28-6c65878a9f67\\_7C\\_0.html](http://mi.lapresse.ca/screens/cae21a8b-b03a-48e8-9e28-6c65878a9f67_7C_0.html).

Internet 10 : Protocole d'extraction. *Procédé pour isoler l'acide (+) -usnique de usnea barbata l.* Google Patents. Consulté le 24/04/2019. <https://patents.google.com/patent/FR2503708A1/fr>.

Campbell. (2012). *Biologie*. 4<sup>e</sup> édition. ERPI SCIENCES. PEARSON. 1458 pages.

Charbonneau, J-A. Enseignante en milieu naturel. *L'usnée* (Entrevue). CEC à Chibougamau. Hiver 2019.

Lide, D. R. 1991-1992. *Handbook of chemistry and physics*. 72<sup>e</sup> édition. Édition CRC.

## Annexe I

Tableau 4. Volumes et concentrations des solutions d'acide usnique.

| Concentration de la solution mère (g/mL) | Volume de solution mère (mL) | Concentration finale (g/mL) | Volume final (mL) | Volume d'huile ajouté (mL) |
|------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------|----------------------------|
| 0,05                                     | 0,6                          | 0,030                       | 1                 | 0,4                        |
| 0,05                                     | 0,4                          | 0,020                       | 1                 | 0,6                        |
| 0,05                                     | 0,2                          | 0,010                       | 1                 | 0,8                        |
| 0,05                                     | 0,1                          | 0,005                       | 1                 | 0,9                        |

## Annexe II

Tableau 5. Rayons d'inhibition selon la concentration d'acide usnique.

| <b>Nom du vase<br/>de Pétri</b> | <b>Concentration<br/>(g/mL)</b> | <b>Rayon d'inhibition<br/>côté 1 (mm)</b> | <b>Rayon d'inhibition<br/>côté 2 (mm)</b> |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 1A                              | 0,000                           | 0,0                                       | 0,0                                       |
| 1B                              | 0,000                           | 0,0                                       | 0,0                                       |
| 2A                              | 0,050                           | 1,0                                       | 1,0                                       |
| 2B                              | 0,050                           | 1,0                                       | 1,0                                       |
| 2C                              | 0,050                           | 1,5                                       | 1,5                                       |
| 3A                              | 0,030                           | 0,5                                       | 0,5                                       |
| 3B                              | 0,030                           | 2,0                                       | 0,0                                       |
| 3C                              | 0,030                           | 2,0                                       | 2,0                                       |
| 4A                              | 0,020                           | 1,0                                       | 1,0                                       |
| 4B                              | 0,020                           | 1,5                                       | 1,0                                       |
| 4C                              | 0,020                           | 1,0                                       | 2,0                                       |
| 5A                              | 0,010                           | 2,0                                       | 0,0                                       |
| 5B                              | 0,010                           | 1,0                                       | 1,0                                       |
| 5C                              | 0,010                           | 1,0                                       | 1,5                                       |
| 6A                              | 0,005                           | 3,0                                       | 2,0                                       |
| 6B                              | 0,005                           | 2,0                                       | 2,0                                       |
| 6C                              | 0,005                           | 1,0                                       | 2,0                                       |

### Annexe III

Exemple de mesure de rayon d'inhibition pour le vase de Pétri 3C.

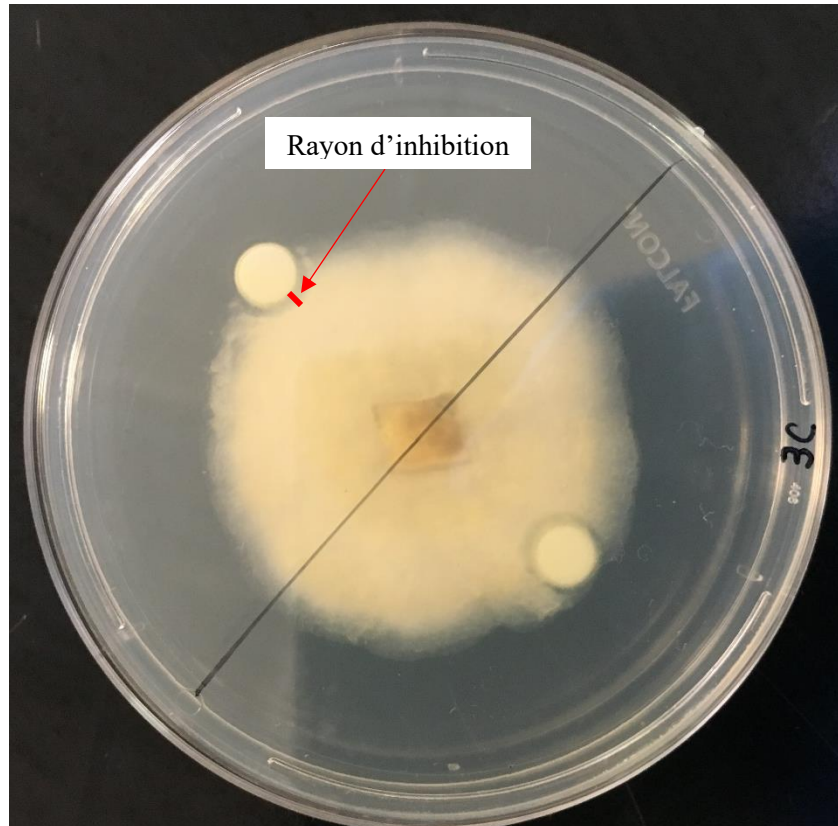


Figure 7. Exemple de mesure du rayon d'inhibition.

#### Annexe IV

Évolution de 2B après 51 h et 78 h.

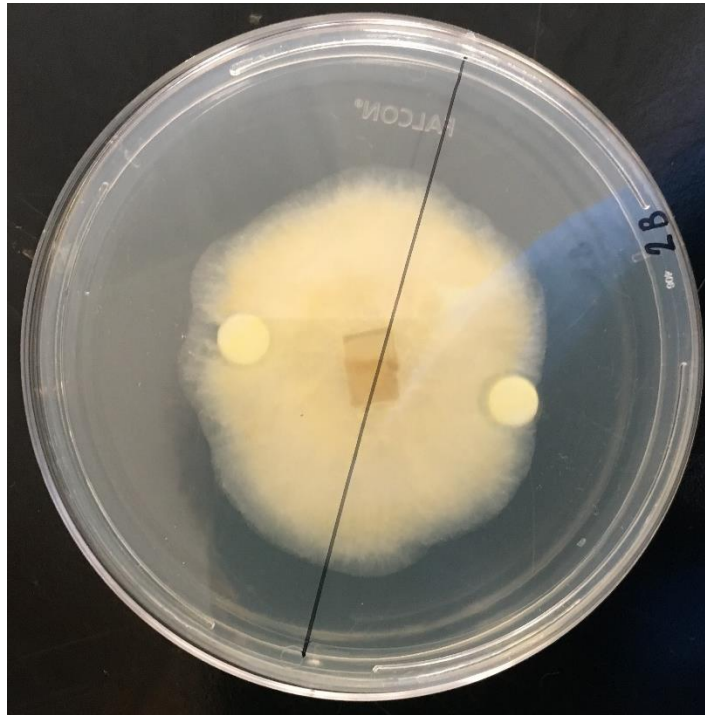


Figure 8. Gélose 2B après 51 h.

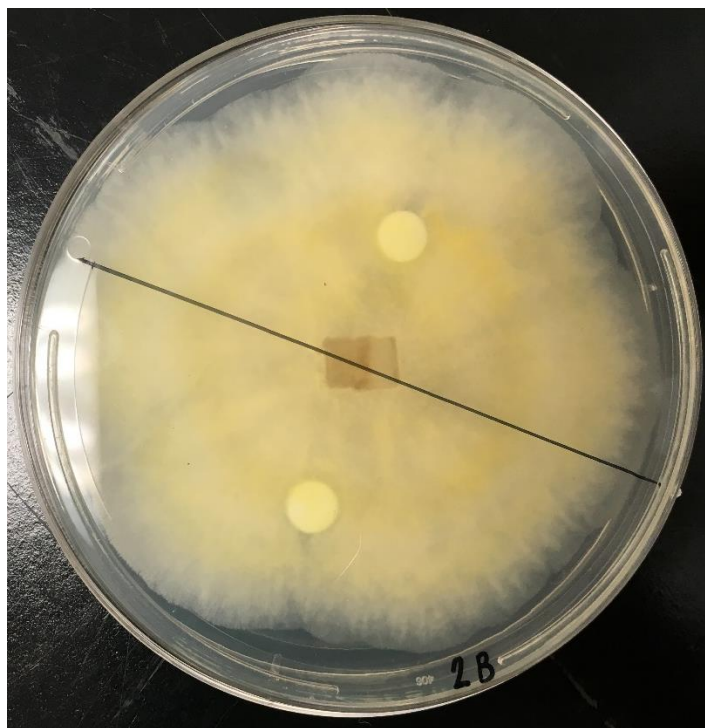


Figure 9. Gélose 2B après 78 h.

## Annexe V

Évolution de pâte 2 après 0 h, 24 h, 26 h, 28 h et 47 h.

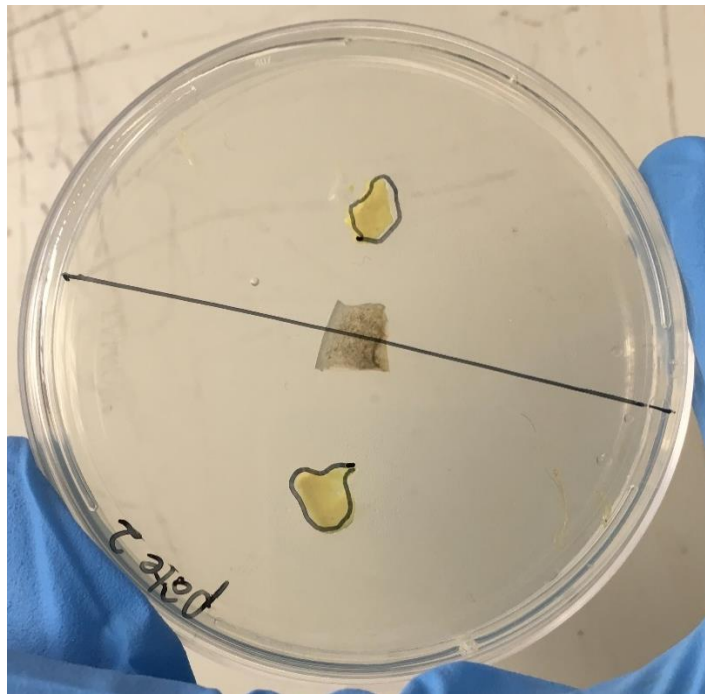


Figure 10. Gélose pâte 2 après 0 h.

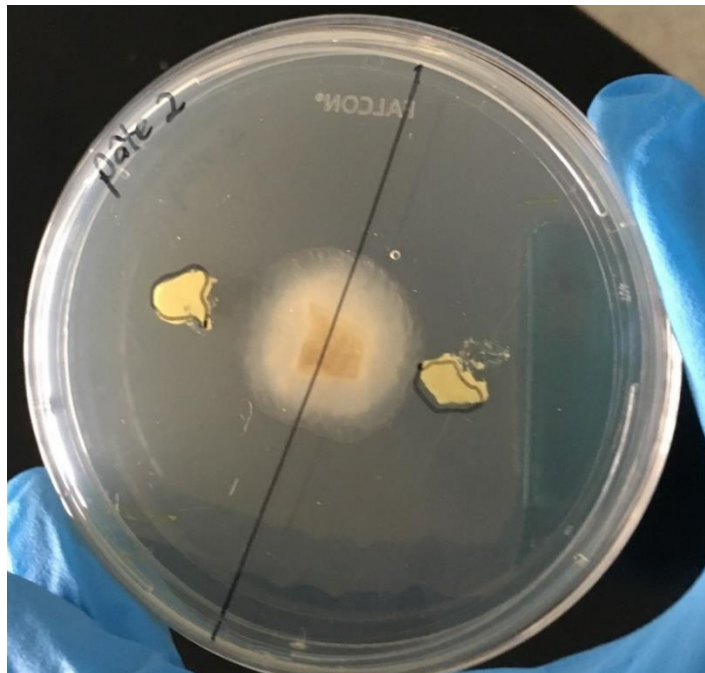


Figure 11. Gélose pâte 2 après 24 h.

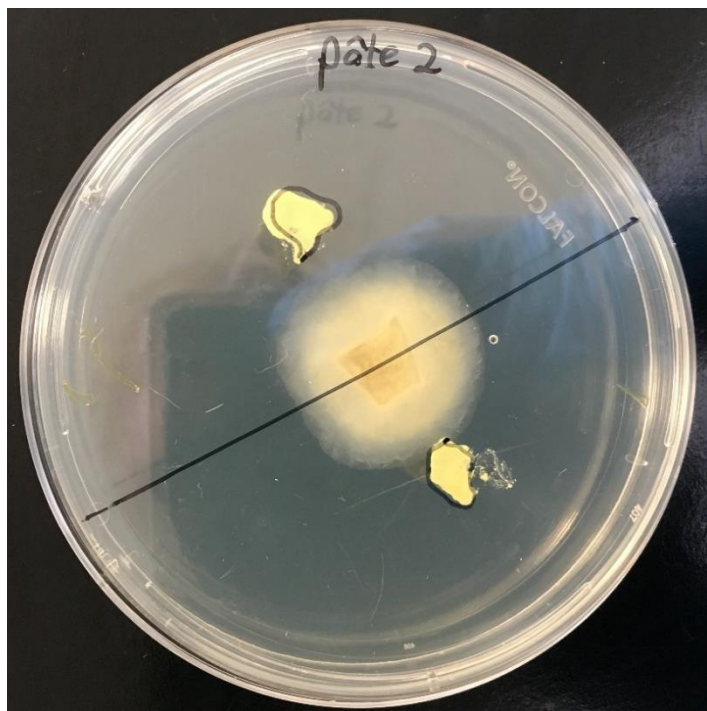


Figure 12. Gélose pâte 2 après 26 h.

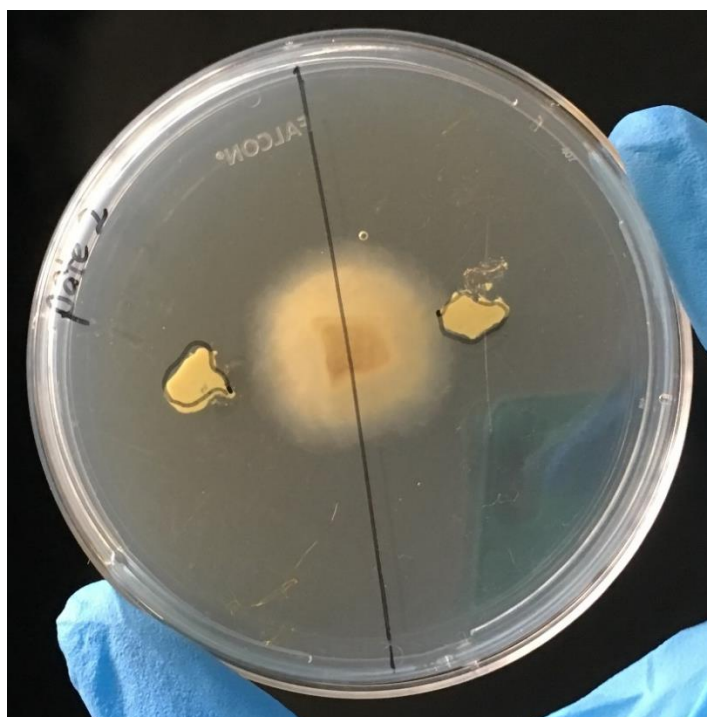


Figure 13. Gélose pâte 2 après 28 h.



Figure 14. Gélose pâte 2 après 47 h.