



Investigation du métabolome de végétaux et de lichens issus de la nordicité

Mémoire

Jean-Christophe Séguin

Maîtrise en chimie - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

Investigation du métabolome de végétaux et de lichens issus de la nordicité

Mémoire

Jean-Christophe Séguin

Sous la direction de :

Pr Normand Voyer, directeur de recherche

Pr Stéphane Boudreau, codirecteur de recherche

Résumé

Le plus grand défi qui se pose pour les générations actuelles et futures est celui des changements climatiques. Les impacts se feront sentir pour les humains, les sociétés, mais aussi pour les écosystèmes. Ces changements climatiques entraînent déjà des modifications de la faune et la flore des écosystèmes autour du globe et il est accepté que les régions du Nord subiront les modifications les plus drastiques de leurs conditions menaçant ainsi les ressources naturelles qu'elles renferment. De nombreux secrets et les connaissances associées pourraient donc disparaître avec les changements climatiques.

Les plantes et les lichens produisent toute une kyrielle de molécules jouant divers rôles dans leur croissance, leur survie, leur reproduction, leur communication, etc. Un nombre considérable de ces produits naturels issus de végétaux sont d'ailleurs utilisés en pharmaceutique, en cosméceutique, en cosmétique, en parfumerie, en alimentation, etc. Les organismes produisent des métabolites en réponse aux stress qu'ils subissent et ces stress sont très différents dans la nordicité en comparaison des autres écosystèmes de la planète ce qui peut avoir un impact sur la composition moléculaire des végétaux et des autres organismes qui s'y trouvent.

Le métabolome de végétaux issus de la nordicité a été étudié, en analysant les huiles essentielles de *Rhododendron groenlandicum*, *Rhododendron subarcticum* et *Myrica gale*, ainsi que la fraction volatile de *Betula glandulosa* par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les huiles essentielles ont été comparées à des huiles essentielles des mêmes espèces ne provenant pas de la nordicité. Pour *Betula glandulosa*, il s'agissait de la première investigation de sa fraction volatile. Les huiles essentielles des deux *Rhododendron* ont également été évaluées pour diverses activités biologiques. Aussi, l'impact de la nordicité a été évalué en développant une méthodologie permettant la comparaison de la composition en métabolites secondaires d'échantillons de lichens prélevés à différentes latitudes.

Abstract

The biggest challenge for current and future generations is climate change. Impacts will be felt by humans and society but also by ecosystems. Climate change already modifies fauna and flora around the world and the most intense modifications of ecosystem conditions will take place in the northern regions. The natural resources found in northern regions have a great potential. Their ecosystems are still full of secrets, knowledge that could very well disappear with climate change.

Plants and lichens produce a variety of molecules playing diverse roles in their growth, their survival, their reproduction, their communications, etc. and a great number of natural products from plants are used in pharmaceuticals, cosmeceuticals, cosmetics, perfumes, foods, etc. Organisms produce secondary metabolites in response to stresses they are enduring and those are very different in northern regions compared to ecosystems elsewhere, which certainly have an impact on molecular composition of plants and other organisms evolving there like lichens.

Metabolome of some plants from Nunavik have been studied, by analysis of essential oils from *Rhododendron groenlandicum*, *Rhododendron subarcticum* and *Myrica gale* and of the volatile fraction of *Betula glandulosa* by gas chromatography-mass spectrometry. Those essential oils have been compared with essential oils from the same species growing outside Nunavik. The investigation of volatile fraction from *Betula glandulosa* was the first ever. Essential oils from both *Rhododendron* species have been submitted to biological activity assays. Also, the impact of latitude has been examined by developing a method allowing comparison of secondary metabolites in lichens collected over a gradient of latitudes.

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières	iv
Liste des figures.....	ix
Liste des schémas	xi
Liste des tableaux.....	xii
Liste des annexes.....	xiii
Liste des abréviations	xiv
Remerciements.....	xvi
Introduction	1
1 Écosystèmes de la nordicité	1
1.1 Nordicité	1
1.1.1 Définition	1
1.1.2 Les indices de nordicité.....	2
1.2 La végétation de la nordicité.....	3
1.2.1 Forêt boréale.....	4
1.2.2 Toundra forestière.....	5
1.2.3 Toundra.....	6
1.3 Écosystèmes en changement	6
1.3.1 Progression des écosystèmes vers le nord	8
1.3.2 Densification arbustive.....	8
1.3.3 Impacts des changements sur les écosystèmes.....	10
1.3.4 Importance des écosystèmes du nord	11
2 Produits naturels	12
2.1 Les végétaux et les lichens : sources importantes de métabolites intéressants	12
2.1.1 Historique.....	12
2.1.2 Applications.....	14
2.1.3 L'ethnobotanique comme source d'inspiration en chimie des produits naturels	14
2.2 Métabolome.....	15
2.2.1 Métabolites secondaires	16
2.2.2 Chimiotype	17
2.2.3 Huile essentielle	18
2.2.4 Extraits	19
2.2.5 Facteurs influençant le métabolome	20
2.2.6 Perte de biodiversité et perte de chimiodiversité.....	22

2.3	Utilisation responsable des ressources	23
2.3.1	Extraction de métabolites	23
2.3.2	Semi-synthèse ou hémisynthèse	24
2.3.3	Synthèse totale	24
2.3.4	Génie génétique.....	25
3	Portée et objectifs des travaux de recherche	25
Chapitre 1 : Méthodologie d'investigation phytochimique d'huiles essentielles et d'extraits volatils		29
1	Conventions et nomenclature	29
2	Choix des organismes à étudier.....	29
3	Récolte et traitement de la matière première	31
3.1	Choix du site.....	31
3.2	Identification des organismes.....	32
3.3	Échantillonnage.....	32
3.4	Conservation de la matière première	32
3.5	Traitement préalable de la matière première.....	33
3.6	Détermination de la masse sèche	33
4	Extraction	34
4.1	Préparation d'huiles essentielles et de fractions volatiles.....	34
4.1.1	Hydrodistillation.....	35
4.1.2	Entrainement à la vapeur	36
4.1.3	Extraction de la fraction volatile	36
5	Analyse des extraits	37
5.1	Détermination du rendement.....	37
5.2	Caractérisation des huiles essentielles et fractions volatiles	37
5.2.1	Analyses par GC-MS	37
Chapitre 2. Investigation phytochimique d'huiles essentielles de <i>R. groenlandicum</i> , <i>R. subarcticum</i> et <i>M. gale</i> provenant d'écosystèmes nordiques		45
1	Objectifs spécifiques	45
2	Présentation générale des plantes.....	45
2.1	<i>Rhododendron groenlandicum</i>	46
2.1.1	Classification et description botanique.....	46
2.1.2	Utilisations traditionnelles.....	46
2.1.3	Justification du choix	49
2.2	<i>Rhododendron subarcticum</i>	49
2.2.1	Classification et description botanique.....	49
2.2.2	Utilisations traditionnelles.....	50
2.2.3	Justification du choix	51

2.3	<i>Myrica gale</i>	52
2.3.1	Classification et description botanique	52
2.3.2	Utilisations traditionnelles	52
2.3.3	Justification du choix	53
3	Revue de littérature sur les huiles essentielles et la phytochimie des arbustes à l'étude	53
3.1	Rôles biologiques des huiles essentielles	53
3.2	Applications actuelles et potentielles d'huiles essentielles	54
3.3	<i>Rhododendron groenlandicum</i> et son huile essentielle	54
3.3.1	Métabolites secondaires	54
3.3.2	Activités biologiques	56
3.4	<i>Rhododendron subarcticum</i> et son huile essentielle	56
3.4.1	Métabolites et chimiotypes	56
3.4.2	Activités biologiques	59
3.5	<i>Myrica gale</i> et son huile essentielle	60
3.5.1	Métabolites et chimiotypes	60
3.5.2	Activités biologiques	61
4	Partie expérimentale	63
4.1	Solvants, réactifs et standards	63
4.2	Matière végétale	64
4.3	Préparation des huiles essentielles	66
4.4	Caractérisation des huiles essentielles	68
4.5	Tests d'activités biologiques	69
5	Résultats	71
5.1	Préparation des huiles essentielles	71
5.2	Caractérisation	72
5.2.1	<i>Rhododendron groenlandicum</i>	72
5.2.2	<i>Rhododendron subarcticum</i>	79
5.2.3	<i>Myrica gale</i>	85
5.3	Activités biologiques	92
5.4	Discussion	93
5.4.1	<i>Rhododendron groenlandicum</i>	93
5.4.2	<i>Rhododendron subarcticum</i>	96
5.4.3	<i>Myrica gale</i>	98
5.4.4	Activités biologiques	99
5.5	Conclusion	101
Chapitre 3 Caractérisation de la fraction volatile de <i>B. glandulosa</i> provenant du Nunavik		103
1	Objectifs spécifiques	103

2	Présentation générale de l'arbuste.....	103
2.1	Classification et description botanique	103
2.2	Utilisations traditionnelles.....	104
2.3	Importance, impacts et considérations.....	104
2.4	Justification du choix	105
3	Revue de littérature sur la phytochimie de <i>B. glandulosa</i> et du genre <i>Betula</i>	106
3.1	Métabolites secondaires.....	106
4	Partie expérimentale	107
4.1	Solvants, réactifs et standards	107
4.2	Matière végétale.....	108
4.3	Préparation des extraits	108
4.4	Caractérisation	109
5	Résultats	110
5.1	Préparation de l'extrait	110
5.2	Caractérisation	110
6	Discussion.....	120
6.1.1	Caractérisation de la fraction volatile	120
6.1.2	Comparaison avec d'autres espèces du genre <i>Betula</i>	121
7	Conclusion	122
Chapitre 4 Investigation de l'impact de la nordicité sur le métabolome des lichens <i>C. stellaris</i> et <i>S. paschale</i>		124
1	Objectifs spécifiques	124
2	Présentation générale des lichens à l'étude.....	125
2.1	<i>Cladonia stellaris</i>	125
2.1.1	Description et classification botanique	125
2.2	<i>Stereocaulon paschale</i>	125
2.2.1	Description et classification botanique	125
2.3	Justification du choix	125
2.3.1	Vaste répartition géographique	126
2.3.2	Abondance de la matière	126
2.3.3	Caractéristiques intrinsèques.....	126
3	Revue de littérature sur les extraits des lichens <i>Cladonia stellaris</i> et <i>Stereocaulon paschale</i>	126
3.1	Les métabolites lichéniques	126
3.2	Rôles biologiques des métabolites lichéniques.....	127
3.3	Influence des facteurs biotiques et abiotiques.....	128
4	Développement et validation d'une méthode d'extraction normalisée pour l'analyse semi-quantitative des échantillons lichéniques	129

4.1	Développement de méthode	129
4.2	Partie expérimentale	130
4.2.1	Solvants, réactifs et étalons	130
4.2.2	Récolte et traitement des échantillons	130
4.2.3	Préparation des étalons internes	131
4.2.4	Préparation des extraits	131
4.2.5	Analyse des extraits	132
4.2.6	Choix des étalons internes	133
4.2.7	Comparaison des échantillons	133
4.2.8	Normalisation des étapes	134
4.2.9	Rejet de données aberrantes	134
4.3	Validation	134
4.3.1	Spécificité	135
4.3.2	Précision de l'instrument	135
4.3.3	Répliquabilité	135
4.3.4	Répétabilité	136
4.3.5	Stabilité des analytes	136
5	Résultats	136
6	Discussion	141
7	Conclusion	147
	Conclusion	149
	Annexes	151
	Bibliographie	165

Liste des figures

Figure 1. Limite du nord de l'Amérique du Nord selon les critères établis par Louis-Edmond Hamelin en 1968.	2
Figure 2. Carte des principaux types de végétation du Québec et du Labrador.	3
Figure 3. Zones de végétation de la nordicité au Québec et au Labrador.	3
Figure 4. Hétérogénéité du couvert de végétation de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik, Nunavik, Québec.	5
Figure 5. Projections de la progression des classes de végétation dans les régions du nord.	7
Figure 6. Modes de densification arbustive.	8
Figure 7. Métabolites secondaires majoritaires des chimiotypes principaux du thym commun, <i>Thymus vulgaris</i> , dans la région de Saint-Martin-de-Londres.	17
Figure 8. Matières premières naturelles obtenues à la suite d'une distillation par entraînement à la vapeur à partir de feuilles de <i>Rhododendron subarcticum</i> .	19
Figure 9. Quelques facteurs externes qui peuvent influencer le métabolome des organismes.	21
Figure 10. Préparation d'huile essentielle de fleurs d' <i>Achillea millefolium</i> à différents stades de développement de la plante.	22
Figure 11. Hémisynthèse du paclitaxel à partir de produits naturels provenant de sources durables.	24
Figure 12. Appareil d'hydrodistillation circulaire de type Clevenger tel que rapporté dans l' <i>European pharmacopoeia</i> .	35
Figure 13. Montage d'entraînement à la vapeur de laboratoire.	36
Figure 14. Détermination de l'indice de rétention d'un composé à partir d'une solution de standards n-alcanes C ₇ – C ₃₀ .	42
Figure 15. Plantes de <i>Rhododendron groenlandicum</i> en fleurs.	46
Figure 16. Plantes de <i>Rhododendron subarcticum</i> .	49
Figure 17. Plantes de <i>Myrica gale</i> .	52
Figure 18. Sites de récolte des échantillons végétaux de <i>R. groenlandicum</i> , <i>R. subarcticum</i> , <i>M. gale</i> et <i>B. glandulosa</i> .	65
Figure 19. Photos montrant le couvert de végétation des sites de récoltes dans la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	66
Figure 20. Alambic portable conçu dans le cadre de ce projet d'investigation d'huiles essentielles.	67
Figure 21. Montage d'hydrodistillation avec appareil de type Clevenger.	67
Figure 22. Échantillons d'huile essentielle de feuilles de <i>R. groenlandicum</i> provenant de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	72
Figure 23. Échantillon d'huile essentielle obtenu par hydrodistillation des feuilles de <i>R. subarcticum</i> .	72
Figure 24. Chromatogrammes obtenus par analyse en GC-MS pour les trois échantillons d'huile essentielle de <i>R. groenlandicum</i> .	73
Figure 25. Structures des métabolites principaux des huiles essentielles de <i>R. groenlandicum</i> en provenance de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	74
Figure 26. Chromatogramme de l'échantillon d'huile essentielle de feuilles de <i>R. subarcticum</i> provenant du Nunavik.	79
Figure 27. Structures des métabolites principaux de l'huile essentielle de <i>R. subarcticum</i> en provenance du Nunavik.	80
Figure 28. Structure de l'ascaridole avec annotations correspondant à la caractérisation par RMN ¹ H.	84
Figure 29. Graphique des proportions relatives de l'ascaridole et de son produit de dégradation, l'isoascaridole, en fonction de la température du port d'injection.	84
Figure 30. Dégradation de l'ascaridole en isoascaridole en fonction de la température du port d'injection.	85
Figure 31. Chromatogrammes obtenus par analyse en GC-MS pour les trois échantillons d'huile essentielle de <i>M. gale</i> provenant de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	86
Figure 32. Structures des métabolites principaux des huiles essentielles de <i>M. gale</i> en provenance de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	92

Figure 33. Résultats de tests préliminaires d'évaluation d'activités biologiques à applications cosméceutiques pour les échantillons d'huile essentielle de <i>Rhododendron groenlandicum</i> et de <i>Rhododendron subarcticum</i> .	92
Figure 34. Feuilles de <i>B. glandulosa</i> Michaux.	103
Figure 35. Plants de <i>Betula glandulosa</i> Michaux.	103
Figure 36. Chromatogrammes des échantillons d'extraits volatils de feuilles de <i>B. glandulosa</i> provenant de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	111
Figure 37. Structures des métabolites principaux des extraits volatils de <i>B. glandulosa</i> en provenance de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	111
Figure 38. Tapis de lichen <i>Cladonia stellaris</i>	124
Figure 39. Un échantillon du lichen <i>Stereocaulon paschale</i> séché.	124
Figure 40. Localisation des sites d'échantillonnage des lichens <i>S. paschale</i> et <i>C. Stellaris</i> suivant un gradient latitudinal entre les municipalités de Matagami et d'Umiujaq.	129
Figure 41. Compilation des rendements d'extraction des échantillons du lichen <i>S. paschale</i> selon le site d'échantillonnage.	138
Figure 42. Chromatogrammes représentatifs des échantillons de lichen <i>S. paschale</i> (km 476) obtenus par analyse HPLC-PDA (280 nm) aux deux volumes d'injections.	138
Figure 43. Résultats d'analyse semi-quantitative de la concentration des métabolites secondaires non valides observés dans le lichen <i>Stereocaulon paschale</i> en fonction de la latitude.	139
Figure 44. Résultats d'analyse semi-quantitative de la concentration des métabolites secondaires observés dans le lichen <i>Stereocaulon paschale</i> en fonction de la latitude.	140

Liste des schémas

Schéma 1. Méthodologie générale de caractérisation d'une huile essentielle.....	63
Schéma 2. Méthodologie générale de caractérisation d'un extrait volatil.	107

Liste des tableaux

Tableau 1. Facteurs influençant la production et la composition des métabolites secondaires des végétaux..	21
Tableau 2. Utilisations médicinales traditionnelles du <i>R. groenlandicum</i> par les communautés autochtones de la forêt boréale canadienne.	47
Tableau 3. Utilisations médicinales traditionnelles du <i>R. tomentosum</i> Harmaja* par les communautés autochtones de la forêt boréale canadienne.	51
Tableau 4. Utilisations médicinales traditionnelles du <i>Myrica gale</i> L. par les communautés autochtones de la forêt boréale canadienne.	53
Tableau 5. Description des chimiotypes recensés pour l'huile essentielle de <i>R. tomentosum</i> (<i>Ledum palustre</i>).	58
Tableau 6. Description de la provenance et de la matière végétale récoltée pour les échantillons de <i>R. groenlandicum</i> , <i>R. subarcticum</i> et <i>M. gale</i>	65
Tableau 7. Rendement de production des huiles essentielles obtenues pour les échantillons de feuilles de <i>R. groenlandicum</i> , <i>R. subarcticum</i> et <i>M. gale</i> provenant de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	71
Tableau 8. Métabolites observés et identifiés et proportion relative identifiée pour les échantillons d'huile essentielle de feuilles de <i>R. groenlandicum</i>	73
Tableau 9. Métabolites secondaires identifiés dans les échantillons d'huile essentielle de feuilles de <i>Rhododendron groenlandicum</i> provenant de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	75
Tableau 10. Métabolites observés et identifiés et proportion relative identifiée pour l'échantillon d'huile essentielle de feuilles de <i>R. subarcticum</i>	79
Tableau 11. Métabolites secondaires identifiés dans l'échantillon d'huile essentielle de feuilles de <i>Rhododendron subarcticum</i> provenant de la région de la rivière Boniface, Nunavik.	81
Tableau 12. Métabolites observés et identifiés et proportion relative identifiée pour les échantillons d'huile essentielle de feuilles de <i>M. gale</i>	86
Tableau 13. Métabolites secondaires identifiés dans l'échantillon d'huile essentielle de feuilles de <i>Myrica gale</i> provenant de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	87
Tableau 14. Proposition de chimiotypes en fonction des compositions en métabolites secondaires observés et rapportés dans la littérature pour <i>R. groenlandicum</i>	94
Tableau 15. Utilisations traditionnelles de <i>Betula glandulosa</i> par les communautés autochtones de la forêt boréale du Canada.	104
Tableau 16. Description de la provenance et de la matière végétale récoltée pour les échantillons de <i>B. glandulosa</i>	108
Tableau 17. Masses d'extraits obtenues pour les échantillons de feuilles de <i>B. glandulosa</i> provenant de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	110
Tableau 18. Métabolites observés et identifiés et proportion relative identifiée pour les échantillons d'extraits volatils de feuilles de <i>B. glandulosa</i>	111
Tableau 19. Métabolites secondaires identifiés dans les échantillons d'extraits volatils de feuilles de <i>Betula glandulosa</i> provenant de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.	112
Tableau 20. Information concernant la récolte des échantillons des lichens <i>Stereocaulon paschale</i> et <i>Cladonia stellaris</i> au printemps 2016.	131
Tableau 21. Résumé de la méthode d'extraction des échantillons de lichen.	132
Tableau 22. Rendements d'extraction des échantillons de lichen <i>Stereocaulon paschale</i> prélevés à différentes latitudes.	137

Liste des annexes

Annexe 1. Spectre RMN ¹ H de la fraction 41 de l'huile essentielle de <i>Rhododendron subarcticum</i> contenant le métabolite majoritaire, identifié comme étant l'ascaridole.....	151
Annexe 2. Résultats de la validation de la précision de l'instrument pour la méthode d'analyse semi-quantitative d'échantillons de lichen <i>S. paschale</i>	152
Annexe 3. Illustration de la spécificité pour la méthode d'analyse semi-quantitative d'échantillons de lichen <i>S. paschale</i>	153
Annexe 4. Résultats de la validation de la réplicabilité pour la méthode d'analyse semi-quantitative d'échantillons de lichen <i>S. paschale</i>	154
Annexe 5. Résultats de la validation de la répétabilité pour la méthode d'analyse semi-quantitative d'échantillons de lichen <i>S. paschale</i>	157
Annexe 6. Résultats de la validation de la stabilité des analytes pour la méthode d'analyse semi-quantitative d'échantillons de lichen <i>S. paschale</i>	158
Annexe 7. Tableaux de compilation de résultats d'analyse des échantillons du lichen <i>Stereocaulon paschale</i> récoltés à différentes latitudes.....	159

Liste des abréviations

ACN	Acétonitrile
AN	Analyte
B.	<i>Betula</i> (genre de plante)
BeGl	Extrait de <i>Betula glandulosa</i>
C.	<i>Cladonia</i> (genre de lichen)
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
C18	Phase stationnaire octadécylsilane
CCM	Chromatographie sur couche mince
CS	Extrait de <i>Cladonia stellaris</i>
CV	Coefficient de variation
DB5	Phase stationnaire non polaire de (5 %-phényl)-méthylpolysiloxane
DCM	Dichlorométhane
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ELSD	Détecteur évaporatif à diffusion de lumière (acronyme anglais)
EI	Ionisation électronique
EO	Huile essentielle (acronyme anglais)
Exp.	Expérimental
FA	Acide formique (acronyme anglais)
FAEEs	Esters éthyliques d'acides gras (acronyme anglais)
FAMEs	Esters méthyliques d'acides gras (acronyme anglais)
FDA	Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (acronyme anglais)
FFNSC	Base de données de spectrométrie de masse <i>Flavours and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds</i> (acronyme anglais)
FID	Détecteur par ionisation à flamme (acronyme anglais)
GC	Chromatographie en phase gazeuse (acronyme anglais)
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (acronyme anglais)
GC-FID	Chromatographie gazeuse couplée à un détecteur par ionisation à flamme (acronyme anglais)
GLV	Métabolites volatils de feuilles vertes (acronyme anglais)
HE	Huile essentielle
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance (acronyme anglais)
ICH	Conseil international d'harmonisation (acronyme anglais)
IOFI	Organisation internationale de l'industrie des arômes alimentaires (acronyme anglais)
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
IUPAC	Union internationale de chimie pure et appliquée (acronyme anglais)
L.	<i>Ledum</i> (genre de plante)
Lit.	Littérature
LRI	Indice de rétention linéaire (acronyme anglais)
m/z	Rapport masse/charge
M.	<i>Myrica</i> (genre de plante)
MeOH	Méthanol
MS	Spectrométrie de masse
MyGa	Extrait de <i>Myrica gale</i>
NME	Nouvelle Entité Moléculaire (acronyme anglais)
NIST	Institut national des normes et de la technologie (acronyme anglais)
PDA	Détecteur à barrettes de diodes (absorption UV) (acronyme anglais)
R.	<i>Rhododendron</i> (genre de plante)
RhGr	Extrait de <i>Rhododendron groenlandicum</i>
RhSu	Extrait de <i>Rhododendron subarcticum</i>

RMN	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
RMN ¹ H	Étude RMN 1D du proton
RMN ¹³ C	Étude RMN 1D du ¹³ carbone
RMN COSY	Étude RMN 2D de type <i>Correlation Spectroscopy</i>
RMN HMBC	Étude RMN 2D de type <i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy</i>
RMN HSQC	Étude RMN 2D de type <i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation spectroscopy</i>
S.	<i>Stereocaulon</i> (genre de lichen)
SP	Extrait de <i>Stereocaulon paschale</i>
UV	Détecteur UV-visible
UV-visible	Rayonnements ultraviolets et visibles
VAPO	Valeurs polaires
W-K	Whapmagoostui-Kuujuarapik

Remerciements

Je veux évidemment débiter mes remerciements par mon directeur de recherche, le professeur Normand Voyer. Merci de m'avoir fait confiance en m'offrant un projet ambitieux et rempli d'opportunités. Je tiens aussi à souligner son ouverture aux idées et la liberté qui m'a été accordée pour l'orientation de mes travaux. Je remercie aussi mon codirecteur de recherche, le professeur Stéphane Boudreau, pour ses conseils et ses réponses concernant le domaine de la biologie et de l'écologie, des domaines qui m'étaient assez étrangers. Son aide et sa collaboration, ainsi que celles de ses étudiants, pour l'identification et la collecte des plantes et des lichens, des tâches essentielles à la réalisation d'études en phytochimie et en chimie des produits naturels, sont évidemment un élément crucial dans la poursuite de mes travaux de maîtrise.

Je veux aussi souligner l'impact important qu'a eu le professeur Xavier Fernandez, de l'Université Côte d'Azur, ainsi que son équipe de recherche, sur mon parcours. Merci de m'avoir accueilli dans votre groupe et de m'avoir offert une opportunité incroyable d'apprentissage afin de pouvoir poursuivre mes travaux de recherche avec un bagage important qu'il m'aurait été difficile d'obtenir autrement. Je suis aussi reconnaissant pour le support, les conseils et les réponses que le professeur Fernandez a continué de me fournir pour le reste de mon parcours à la maîtrise. Il ne fait aucun doute que son expertise dans le domaine des huiles essentielles et des produits naturels a été un élément important pour mener à bien les projets de recherche qui m'ont été confiés.

Évidemment, un parcours universitaire aux cycles supérieurs implique une équipe, un groupe de recherche, et en ce sens, je tiens à remercier tous mes collègues, du groupe de Normand Voyer, mais aussi de l'Université Côte d'Azur. À mes collègues de Québec : merci pour le bon temps passé à l'école, pour l'ambiance de travail et pour les bonnes relations que nous avons pu développer. Merci aussi pour le temps passé ensemble à l'extérieur du cadre scolaire. La complicité qui s'est installée entre nous a contribué à l'appréciation de ces années, même avec ces quelques mois bien particuliers qui ont bouleversé nos parcours. Un merci spécial à Sarah Bélanger, qui a considérablement contribué à l'avancement de mes travaux lors de ses stages dans notre laboratoire. À mes collègues de Nice : merci pour l'accueil et l'intégration, vous avez grandement contribué à rendre mon passage sur le Vieux Continent des plus agréables.

Pour terminer, je voudrais remercier ma famille, qui m'a toujours appuyé malgré mon parcours scolaire chaotique, mes indécisions et mes difficultés comme mes réussites. Merci d'avoir toujours accepté mes choix et d'avoir été présents pour moi pendant toutes ces nombreuses années d'études.

Introduction

1 Écosystèmes de la nordicité

1.1 Nordicité

1.1.1 Définition

Le terme « nordicité » est un mot relativement récent, un concept inventé par un géographe québécois, M. Louis-Edmond Hamelin, dans les années 1960, mais qui a fait son entrée dans les dictionnaires seulement dans les années 1980.¹ Avant son apparition, le terme « nordique » existait, mais faisait plutôt référence au monde scandinave, aux pays du nord de l'Europe. Le terme « nord » était aussi utilisé ici et là, mais sa définition était peu étoffée, les critères pour désigner ce qui pouvait être qualifié de « nord » étaient flous.²

Il y avait pourtant un besoin de termes, particulièrement au Canada, pour définir la dimension de « zone froide » d'une large portion du pays et pour s'identifier, en tant que gens de pays froids, à un concept. En science, que ce soit en géographie, en écologie, en biologie ou dans n'importe quel domaine, il était difficile de définir ce qui pouvait faire partie du Nord, des régions froides. Les indices se rapportant à la température étaient trop variables et ne prenaient pas en compte nombre de paramètres importants. Les indices latitudinaux étaient très restrictifs et eux aussi très variables. Il était nécessaire, pour les chercheurs, mais aussi pour le public, de définir la nordicité!²

Même avant l'apparition du concept de nordicité, différents indices étaient utilisés pour qualifier les zones froides. Des termes comme polaire, arctique, boréal, nordique ainsi que leurs dérivés étaient employés, mais les définitions et les critères étaient mal définis ou leur définition était si restrictive que les chercheurs en déviaient, ce qui donnait lieu à toutes sortes d'interprétation des concepts, selon la nécessité. Louis-Edmond Hamelin s'est donc affairé à développer, en plus du terme et du concept, un système d'évaluation du niveau de nordicité, un indice de nordicité, qui est présenté ci-dessous.²

Il est important de souligner l'importance de ce géographe québécois dont les travaux ont permis de mieux définir la nordicité, mais qui ont aussi permis aux peuples de la nordicité de mieux se définir. Louis-Edmond Hamelin est décédé au cours de l'accomplissement des travaux de maîtrise présentés dans ce mémoire, il demeurera connu comme le père de la nordicité.

1.1.2 Les indices de nordicité

Avec les critères mal établis ou mal adaptés qui étaient parfois associés aux autres concepts définissant les zones froides de l'hémisphère nord, il était difficile de s'y retrouver. La latitude limitrophe était difficile à établir, les indices de températures aussi. Il fallait aussi considérer d'autres facteurs, humains, sociaux, dans ces concepts. C'est avec tout cela en tête que Louis-Edmond Hamelin a élaboré l'indice de nordicité selon 10 critères chiffrés. Il a tout de même fixé une latitude minimale au 45^e parallèle. Cet indice s'exprime en VAPO, en valeurs polaires. L'indice est une valeur de 0 à 1000, avec 1000 comme nordicité maximale. Les critères permettant d'établir le niveau de nordicité sont au nombre de 10 et sont évalués sur 100 points chacun.²

On retrouve parmi ces critères certains égards à des dimensions géographiques et climatiques, mais aussi d'autres qui sont d'ordre démographique et économique. En effet, selon M. Hamelin, la nordicité n'est pas qu'une question de simple localisation, la nordicité implique tout un concept vaste aux dimensions multiples et son appartenance dépend autant de la localisation que de dimensions socio-économiques telles que les conditions dans lesquelles vivent les habitants.² Évidemment, ces critères établis en 1968² évoluent avec le temps, mais ils demeurent de bons indicateurs du niveau de nordicité.

Pour le Canada, la portion qui fait partie de la nordicité, selon ces critères, est illustrée à la figure 1. Cette limite sud du Nord correspond à l'isonord de 200, soit la ligne qui est tracée en suivant les lieux qui obtiennent 200 VAPO, le seuil minimal.² On y remarque que, pour le Québec, la nordicité s'étend bien au sud du Nunavik (dont la limite sud est le 55^e parallèle), ce qui implique que tout ce territoire fait partie de la nordicité.

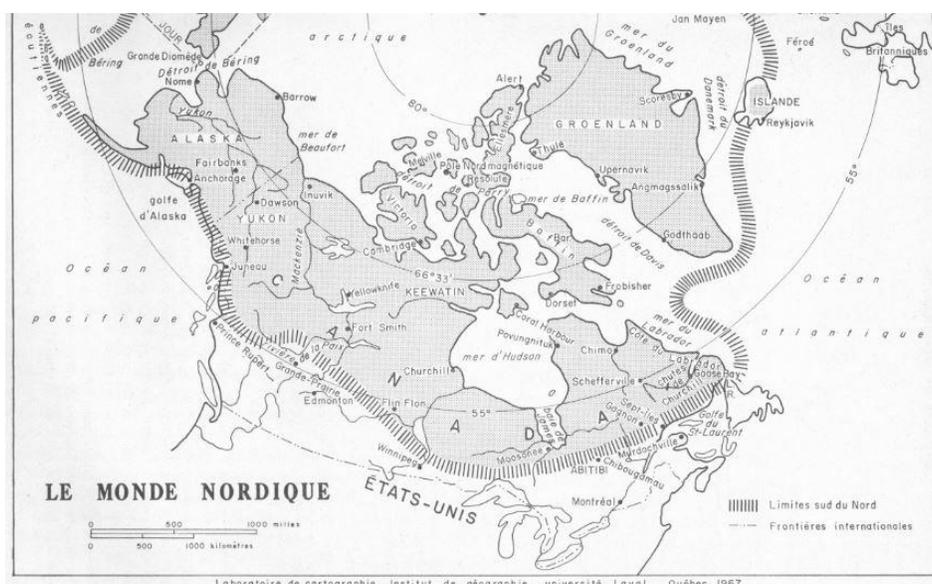
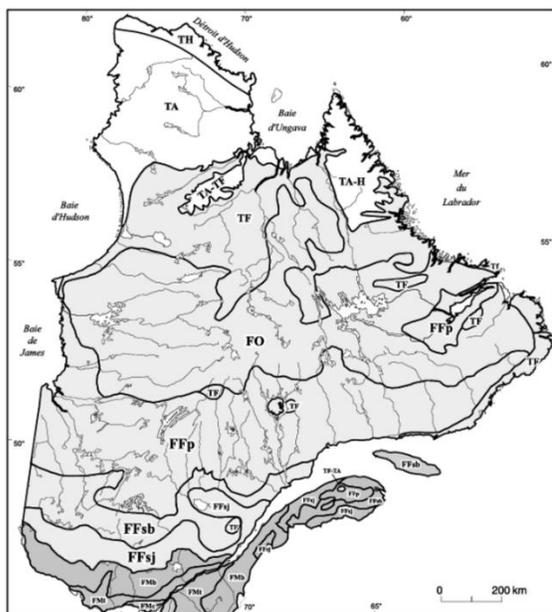


Figure 1. Limite du nord de l'Amérique du Nord selon les critères établis par Louis-Edmond Hamelin en 1968.²

1.2 La végétation de la nordicité

Les zones de végétation des régions du Nord occupent une superficie importante de la planète. Sur d'aussi grandes étendues de territoire, avec des conditions climatiques, écologiques, géographiques, géologiques, biotiques, etc. qui sont variées, on retrouve plusieurs zones de végétation différentes qui sont associées à la nordicité.⁴ Et même parmi ces zones, la végétation n'est pas homogène.⁵ Dans le nord-est de l'Amérique, principalement le Nord du Québec et du Labrador, qui sont souvent étudiés ensemble puisqu'ils forment une étendue de terre continue, on retrouve plusieurs zones de végétation, dont la structure et le fonctionnement sont semblables à des zones de végétation retrouvées tout autour du globe. Les zones de végétation du Québec et du Labrador nordique ont ceci de particulier : ce sont les zones boréales, subarctiques et arctiques les plus basses en latitude que l'on retrouve dans l'hémisphère Nord.⁴ Dans cette section sera présenté un survol des zones de végétation majeures du Nord-est américain, en mettant l'accent sur les points importants concernés par les travaux de recherche présentés dans ce mémoire.



- | | |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> □ Forêt coniférienne boréale FFfj : Forêt fermée (Sapinière à Bouleau jaune) FFsb : Forêt fermée (Sapinière à Bouleau blanc) FFp : Forêt fermée (Pessière à mousses) FO : Forêt ouverte (Pessière à lichens) TF : Toundra forestière | <ul style="list-style-type: none"> ■ Forêt mixte FMc : Érablière à caryer FMt : Érablière à tilleul FMb : Érablière à Bouleau jaune □ Toundra arctique TA : Toundra arbustive TH : Toundra herbacée |
|---|--|

Figure 2. Carte des principaux types de végétation du Québec et du Labrador.³

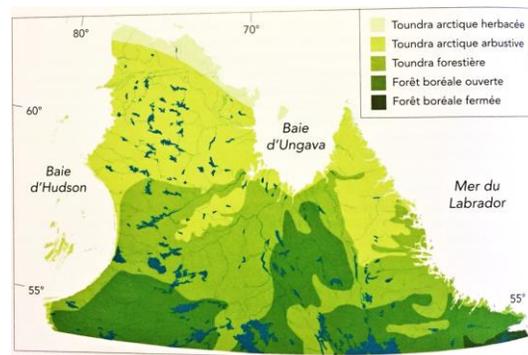


Figure 3. Zones de végétation de la nordicité au Québec et au Labrador.⁴

La figure 2 montre la répartition des grandes zones de végétation du Québec et du Labrador. On y voit la succession des types de végétation, avec la forêt mixte, au sud, caractérisée par une forte proportion de feuillus, puis la forêt boréale, avec une prédominance des conifères et finalement la toundra arbustive, au nord de la limite des arbres. Évidemment, ces grandes zones représentent le portrait général des communautés végétales du

Nord du Québec mais leur la composition est complexe et renferme une importante diversité d'espèces végétales et lichéniques.³ La figure 3 montre la portion qui est considérée dans la Flore nordique du Québec et du Labrador du professeur Serge Payette qui se limite à la portion au nord du 54^e parallèle.⁴ La description de

la végétation concernera ce territoire puisque ce sont principalement ces zones qui sont pertinentes aux travaux présentés dans ce mémoire, toutefois le domaine de la pessière à mousses (forêt boréale fermée) est aussi considéré alors que les zones de forêt mixte ont été exclues de même que les domaines de la sapinière à bouleau (blanc ou jaune).

La végétation et certaines caractéristiques des zones de végétation concernées par les travaux présentés ici seront maintenant décrites, de manière non exhaustive, afin de brosser un portrait des écosystèmes où les échantillons dont il sera question plus loin ont été récoltés.

1.2.1 Forêt boréale

La première grande zone de végétation dont il sera question ici est la forêt boréale. Comme spécifié ci-haut, elle ne sera pas prise en compte dans son entièreté ici, car les zones les plus au sud ne font pas partie de la nordicité, si l'on se réfère à la définition de Louis-Edmond Hamelin² et à la limite de la nordicité (figure 1).

Principale zone de végétation d'Amérique du Nord en superficie, elle est généralement subdivisée en trois sous-zones : forêt ouverte, forêt fermée et toundra forestière. Cette dernière forme une zone de végétation transitoire entre la forêt boréale et la toundra arbustive et est parfois considérée comme une zone distincte.⁴ Dans les zones les plus au sud de la forêt boréale, la forêt fermée, on retrouve des forêts dominées par les conifères accompagnés de différentes espèces de feuillus. Dans la portion nord de la forêt boréale fermée, les pessières à mousses dominent le paysage. On y retrouve des épinettes (épinette noire, *Picea mariana*, en particulier), des mousses hypnacées ainsi que quelques bryophytes, arbustes et herbacées.⁴

Plus au nord, on retrouve la forêt boréale ouverte, une zone assez vaste dans le Nord-est américain, qui s'étend sur plus de deux degrés de latitude, de la Baie d'Hudson à la mer du Labrador. Elle est dominée par des pessières à lichens, dont les principales espèces sont l'épinette noire et les lichens du genre *Cladonia*. L'abondance et la diversité des lichens dépend du stade de succession après un incendie.⁶ On y retrouve aussi des éricacées pour compléter le couvert végétal dominant. Le climat y est plus rigoureux que dans la forêt fermée et moins humide. La température moyenne annuelle varie entre -2,5 °C et -5 °C.⁴

Au sein de la forêt boréale, il y a aussi des zones en altitude où l'on retrouve une végétation de toundra. Les espèces y sont influencées par des facteurs environnementaux particuliers dont une forte exposition aux vents, entraînant une composition spécifique de ces écosystèmes, différente de celle des écosystèmes de toundra de basse altitude, plus au nord.⁷

1.2.2 Toundra forestière

La toundra forestière est un vaste écotone, c'est-à-dire une zone de transition, entre la forêt boréale et la toundra.⁵ Elle est composée d'arbustes et de lichens sur les collines et de peuplements forestiers dans les vallées peu exposées.⁸ Les écotones sont des zones de transition entre les grandes zones de végétation.⁹ C'est le cas de la toundra forestière du Québec qui représente un vaste territoire hétérogène caractérisé par différents types de formations végétales¹⁰ La toundra forestière fait partie de la forêt boréale, mais en représente le segment subarctique et est considérée par plusieurs comme une zone de végétation distincte de par sa grande superficie et son caractère très différent des zones voisines (la forêt boréale et la toundra arbustive).⁴ Cet écotone a une répartition circumpolaire avec de très grandes similarités au niveau des familles de végétaux qui le composent bien que les espèces varient selon les régions.¹¹

La température annuelle moyenne dans cet écotone qui s'étend principalement entre le 55^e et le 58^e parallèle se situe entre -4 °C et -7,5 °C, selon l'emplacement (le climat est différent le long des côtes de celui à l'intérieur des terres). Selon la topographie et les sols, on retrouve dans cette large bande de végétation des forêts à mousses avec des arbustes dans les creux, des forêts ouvertes à lichens et des écosystèmes de toundra arbustive dominés par les lichens et par de petits arbustes retrouvés principalement sur les collines exposées.⁴ La figure 4 présente bien l'hétérogénéité de la végétation à l'échelle locale, avec l'exemple de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik, deux communautés du Nunavik situées sur la côte de la Baie d'Hudson. On y observe que, selon la topographie, le couvert végétal varie beaucoup, avec des zones dominées par les espèces arborescentes, d'autres par des arbustes, des lichens ou des espèces herbacées.¹⁰

On peut subdiviser la toundra forestière en deux sous-zones. La portion plus au sud est caractérisée par un couvert forestier étendu et correspond à la sous-zone forestière. Dans cette sous-zone, les sommets des collines et les surfaces bien drainées sont occupés par des lichens et des arbustes. La portion plus au nord est la sous-zone arbustive dans laquelle les forêts sont retrouvées surtout dans les vallées à l'abri du vent. Le couvert végétal est plus généralement composé de lichens, d'éricacées et d'espèces arbustives comme le bouleau

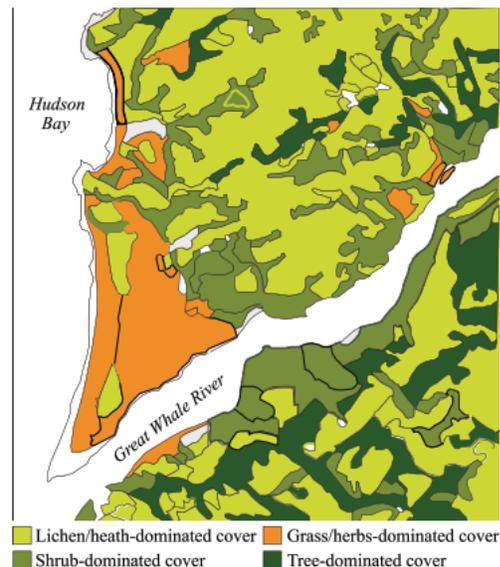


Figure 4. Hétérogénéité du couvert de végétation de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik, Nunavik, Québec.¹⁰

glanduleux (*Betula glandulosa*). La limite septentrionale de la toundra forestière se situe à la limite des arbres, au-delà de laquelle la zone de végétation est la toundra arbustive.⁴

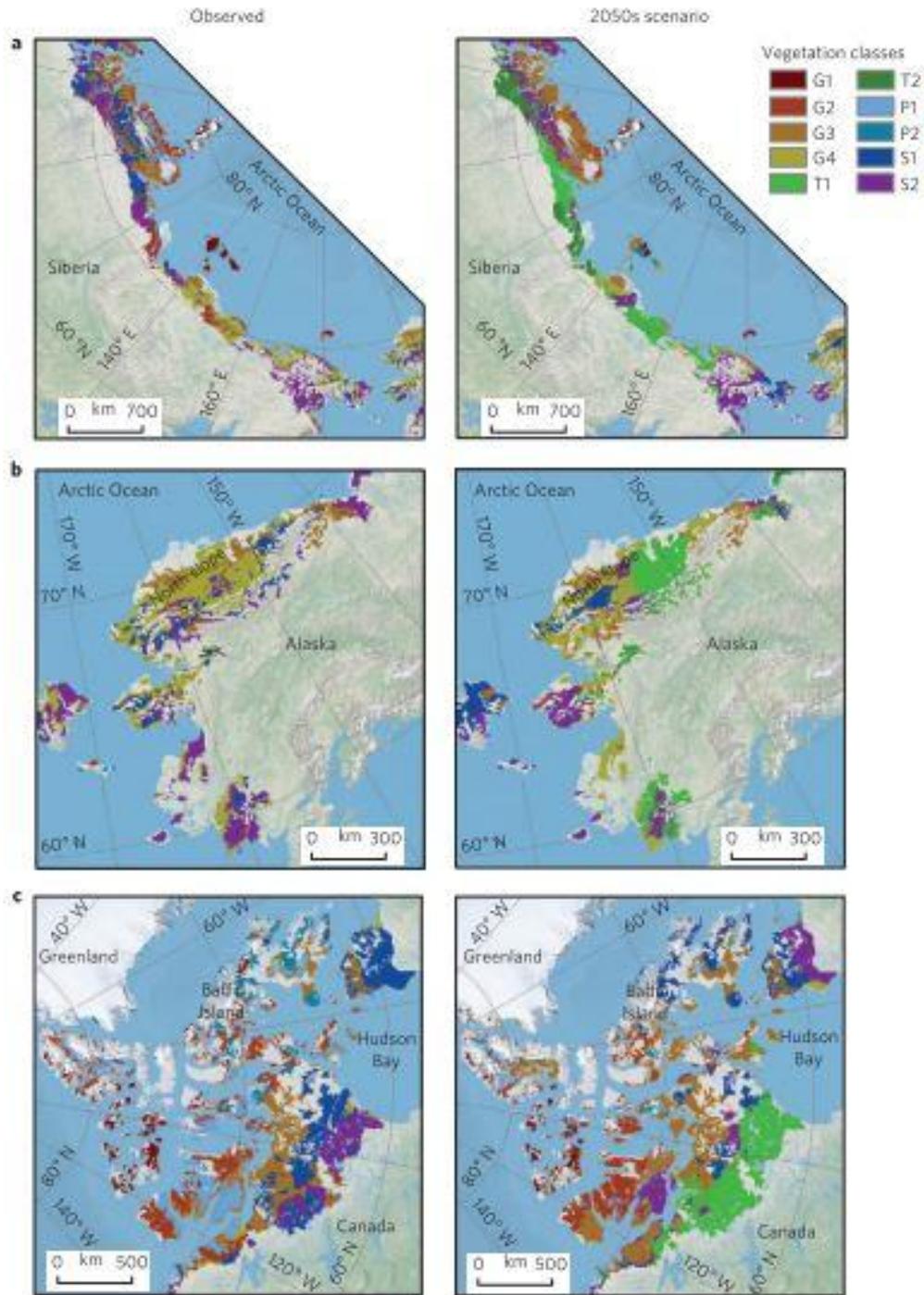
1.2.3 Toundra

La toundra est une grande zone de végétation à la répartition circumpolaire qui est d'abord caractérisée par l'absence d'arbres. Au Québec, elle est retrouvée dans la portion nord du Nunavik. C'est la zone de végétation la plus froide et la plus sèche du Québec.⁴ En effet, la température moyenne annuelle y varie entre -5 °C et -8 °C selon l'endroit. Cette zone étant la plus au nord, elle est définie par des limites géographiques comme les mers, les détroits, les baies et autres vastes étendues d'eau qui scindent et influencent sa répartition. Au niveau des sous-zones de la toundra, on retrouve le Haut-Arctique et le Bas-Arctique. La première est divisée elle aussi en deux, le désert polaire et le semi-désert polaire, où la végétation est discontinue et ouverte. Dans le Bas-Arctique, la végétation dominante inclue des lichens, des plantes herbacées, des éricacées et d'autres espèces arbustives. Au Québec, on retrouve principalement la végétation du Bas-Arctique, avec néanmoins quelques zones, en altitude, qui s'apparentent au Haut-Arctique. Le Bas-Arctique québécois se divise à son tour, comme illustré à la figure 3, en toundra arbustive et toundra herbacée. La toundra arbustive représente la bande la plus au sud de cette zone et est dominée par des lichens et des arbustes comme le bouleau glanduleux et des saules. La toundra herbacée est quant à elle dominée par des plantes herbacées, bien que quelques arbustes parviennent à y croître.⁴ Les arbustes sont d'ailleurs les seuls végétaux érigés que l'on retrouve dans les zones de végétation arctiques, au nord de la limite des arbres.¹²

1.3 Écosystèmes en changement

Les changements climatiques entraînent des perturbations dans les écosystèmes à travers le monde : des hausses de températures, des perturbations dans les saisons, dans les conditions climatiques telles que les précipitations et les vents, etc. Le moindre changement dans le climat entraîne des modifications de l'équilibre écosystémique (qui implique à la fois les composantes biotiques telles que la flore, la faune et le microbiome tout comme les éléments abiotiques comme les cours d'eau, les minéraux, etc.).¹³

Les écosystèmes nordiques sont particulièrement perturbés par les changements climatiques et sont les plus touchés.¹² En effet, la température de l'air de surface de l'Arctique se réchauffe environ deux fois plus rapidement que l'ensemble de la planète.¹⁴ L'adoucissement des conditions dans les zones froides entraîne une avancée des écosystèmes vers les pôles. Cette avancée progressive, qui implique des formations végétales méridionales, résulte en une diminution de l'espace disponible pour les écosystèmes traditionnellement retrouvés dans les environnements nordiques.¹³



Description des classes de végétation : G1. Paille/herbe, phorbe, toundra de type cryptogramme; G2. Graminoides, arbustes nains prostrés, toundra de phorbe; G3. Cyperacées pas en tussack, arbustes nains, toundra de mousse; G4. Cyperacées de tussack, bouleau nain, toundra de mousse; P1. Arbustes nains prostrés, toundra herbacée; P2. Toundra d'arbustes nains prostrés et hémiprostrés; S1. Toundra d'arbustes nains érigés; S2. Toundra d'arbustes bas; T1. Mosaïque de couverts forestiers; T2. Couvert forestier.

Figure 5. Projections de la progression des classes de végétation dans les régions du nord.¹⁴

Les températures plus chaudes, ainsi que les répercussions qu'elles ont sur différents facteurs, modifient les processus biotiques et abiotiques dans les écosystèmes et sont considérées comme la principale cause des transformations de la végétation de la toundra arctique.^{15, 16, 17} Avec cela, on assiste à diverses modifications de la flore des écosystèmes arctiques et subarctiques : une augmentation générale de la productivité primaire, favorisant certaines espèces en particulier,^{18, 19} des changements dans la composition des communautés végétales^{17, 19} et une expansion de l'étendue de certaines espèces vers le nord et les hautes altitudes²⁰.

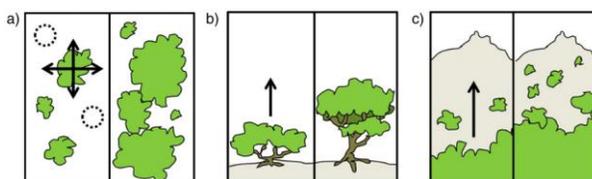
1.3.1 Progression des écosystèmes vers le nord

Un des phénomènes qui est remarqué dans les écosystèmes de la nordicité, mais aussi dans des zones plus au sud, dans l'hémisphère Nord, est la progression graduelle des écosystèmes vers le pôle, vers les latitudes plus élevées.^{12, 20} Les changements climatiques, qui impliquent un réchauffement global, font en sorte que les conditions particulières à un endroit donné se modifient, se réchauffent, et permettent entre autres aux organismes des écosystèmes plus au sud, de les coloniser, jusqu'à remplacer les espèces qui s'y retrouvaient.²¹

Dans le Nord, on assiste à un important verdissement des écosystèmes, principalement associé à la progression des espèces arbustives dans les écosystèmes de la toundra rase qui étaient auparavant dominés par des espèces de mousses et des lichens.^{5, 12, 14-16, 22, 23} La figure 5 montre la progression anticipée, selon des modèles, des classes de végétaux dans les écosystèmes arctiques et subarctiques. On peut y voir que les classes de végétation changent de manière assez importante en quelques décennies selon le scénario de 2050, avec les arbres (classes T1 et T2) prenant de l'importance dans les zones plus au sud des écosystèmes arctiques. De plus, les arbustes nains (classes S1, S2, P1 et P2) devraient également progresser dans certaines régions, alors que dans d'autres zones, ils vont ralentir leur avancée vers le nord. Comme les impacts des changements climatiques peuvent s'opposer pour certains paramètres et avoir des effets contraires autant que des effets complémentaires, il est difficile de prévoir ce qui se produira réellement.¹⁴

1.3.2 Densification arbustive

La densification arbustive est un phénomène qui reçoit beaucoup d'attention de la part des scientifiques puisqu'il a un impact important sur la dynamique des écosystèmes subarctiques. Il est un des changements les plus évidents et les plus rapides qui sont observés dans les écosystèmes arctiques et



a) Remplissage de populations existantes; b) augmentation de la croissance; c) progression de la limite arbustive.

Figure 6. Modes de densification arbustive.¹²

subarctiques. Il correspond à l'augmentation de la biomasse arbustive, au niveau du couvert et/ou de l'abondance.¹² Les changements climatiques récents ont en effet augmenté la production primaire des écosystèmes arctiques et subarctiques.^{24, 25, 26} Tous les arbustes n'ont pas le même potentiel en ce qui a trait à leur capacité à imposer leur dominance dans les écosystèmes qu'ils colonisent, mais certaines espèces arbustives ont des avantages compétitifs vis-à-vis des autres plantes de la toundra.¹² Lorsque les changements climatiques apportent des conditions plus favorables dans certains écosystèmes, certains arbustes (principalement des espèces appartenant aux familles des *Betulaceae* (des bouleaux^{16, 27}, aulnes¹⁶) et des *Salicaceae* (saules)¹⁶ profitent des hausses de température et d'apports plus grands en azote pour s'établir et croître rapidement, en profitant de leur capacité à allonger leurs pousses et leurs tiges rapidement pour surpasser les plantes environnantes en hauteur et profiter du soleil, souvent aux dépens d'autres espèces plus basses.¹² Dans le nord du Québec, l'espèce qui est principalement responsable de ce phénomène est le bouleau glanduleux (*Betula glandulosa* Michx.)^{5, 22, 23}, mais d'autres espèces arbustives comme l'aulne vert (*Alnus crispa* (Ait.) Pursh)²⁸ ont également connu une progression vers le nord. Des organismes comme les lichens peuvent être grandement affectés par l'établissement d'un couvert arbustif dense.¹²

La densification arbustive est un phénomène observé dans le nord de l'hémisphère Nord à l'échelle de la planète, mais il se produit de manière hétérogène, selon les caractéristiques particulières à l'échelle locale.^{5, 22} Elle peut s'opérer selon différents modes, tel qu'illustré à la figure 6. Le couvert arbustif peut se densifier par l'établissement de nouveaux individus ou par la croissance latérale des individus déjà établis. Il peut également se densifier par un développement en hauteur, une croissance verticale. Il est aussi possible que la limite arbustive progresse en elle-même, avec la colonisation de nouveaux sites par les arbustes.¹² Les zones correspondant au Bas-Arctique, comme c'est le cas pour une portion du Nunavik, sont parmi celles qui sont le plus impactées par ce phénomène, car elles se trouvent dans une zone qui devient favorable à la croissance des espèces arbustives.^{11, 29}

Plusieurs facteurs sont à l'origine et influencent la densification arbustive. Certains favorisent la densification arbustive comme le réchauffement de l'atmosphère, les perturbations de l'écosystème par les humains, les feux de forêt, les animaux et les thermokarst, alors que d'autres comme les herbivores qui s'attaquent aux arbustes, peuvent être défavorables à la progression de ces plantes. Plusieurs autres facteurs ont des effets qu'il reste à déterminer.¹² L'impact des hardes de caribous sur le couvert lichénique, lui, peut être favorable à la densification arbustive.³⁰ Les interactions sont donc complexes et il est difficile d'avoir des modèles fiables pour prédire l'évolution de ce phénomène et ses impacts.¹² Il semble que la principale limitation quant à la progression des espèces arbustives soit la faible viabilité de leur pollen et de leurs graines à la limite de leur répartition, viabilité qui est liée à la température.^{31, 32}

1.3.3 Impacts des changements sur les écosystèmes

Les impacts sur les écosystèmes de ces perturbations sont difficiles à prédire avec exactitude. De nombreux paramètres entrent en ligne de compte en influençant les écosystèmes et de nombreux paramètres se retrouvent modifiés. Les modèles ne prédisent pas tous les mêmes impacts. En effet, la densification arbustive, par exemple, se trouve à modifier des processus comme la dynamique de formation du couvert de neige, les dynamiques hydrologiques, les échanges de nutriments, la balance de carbone, l'albedo ou encore les flux d'énergie. Certaines modifications de ces paramètres vont avoir des effets opposés, en compétition, ce qui rend l'issue difficile à prédire.¹² Voici quelques exemples des impacts que les changements climatiques peuvent entraîner sur la dynamique des écosystèmes.

Parmi les phénomènes qui ont été observés, on peut d'abord noter que la densification arbustive influence le couvert de neige de la toundra. Le couvert nival dans les peuplements arbustifs est plus épais et représente un isolant plus efficace pour le sol. En absence d'arbustes, la neige est bien souvent balayée par les vents, ce qui résulte en un faible couvert nival.^{33, 34} Un couvert de neige plus épais sous les arbustes que sur les lichens (neige plus exposée aux vents) entraîne une plus grande décomposition des résidus organiques durant l'hiver par son effet isolant, qui augmente la température du sol. Il peut aussi résulter en une plus grande disponibilité de l'eau à la fonte des neiges.^{34, 35} Le réchauffement des écosystèmes entraîne donc une augmentation du rythme de décomposition et du cycle des nutriments, enrichissant le sol et favorisant encore davantage les espèces arbustives, qui nécessite un sol plus riche et épais que les lichens, par exemple.²⁷

La modification du couvert végétal au profit des espèces arbustives modifie également les échanges de carbone (dont le CO₂) et d'énergie entre les écosystèmes et l'atmosphère, ce qui a des impacts sur le climat. Les arbustes ont pour effet de diminuer l'albedo de la toundra (le ratio entre la radiation solaire réfléchi et entrante) en absorbant davantage la radiation solaire, ce qui mène à de plus grands flux de chaleur dans l'atmosphère.^{14, 36, 37} L'influence sur les échanges de CO₂ écosystèmes-atmosphère est difficile à prédire, puisqu'il y a des phénomènes qui ont des effets inverses. L'augmentation du nombre d'arbustes et de leur taille devrait augmenter l'absorption de CO₂, mais l'influence de cette modification de la biomasse sur les émissions en carbone des écosystèmes affectés est difficile à prédire, rendant les prédictions des impacts sur la balance globale en carbone imprécises.³⁸ Les réserves de carbone dans le sol de la toundra et de la forêt boréale, qui pourraient être relarguées avec la fonte du pergélisol, une des modifications observées dans les écosystèmes de la nordicité, pourraient avoir des impacts significatifs sur la quantité de gaz à effet de serre dans l'atmosphère. Selon la balance de ces phénomènes, le réchauffement global, à l'échelle planétaire, pourrait être accéléré par les impacts que les changements climatiques ont sur les écosystèmes nordiques.³⁹

Les changements de la végétation disponible dans les zones arctiques et subarctiques pourraient aussi perturber l'alimentation des espèces animales de ces écosystèmes. L'habitat du caribou, par exemple, subit les impacts de la progression des espèces arbustives vers le nord, ce qui altère la disponibilité des espèces végétales et lichéniques qui composent généralement l'alimentation de cet ongulé. Bien que plusieurs espèces arbustives sont consommées par le caribou, certains arbustes contiennent davantage de mécanismes de défense (structurels ou chimiques) contre les herbivores, en comparaison des espèces herbacées des écosystèmes de toundras, et ont aussi des teneurs en nutriments bien différentes.^{40, 41}

La biodiversité sera aussi perturbée par les changements qui se produisent dans les régions de la nordicité. Au niveau de la végétation, des diminutions importantes de la répartition de certaines espèces sont à prévoir et les risques d'extinctions pour certaines de ces espèces vont s'accroître. La progression des écosystèmes vers le nord risque de compresser certaines zones de végétation à l'extrémité nord du territoire, les empêchant de se retrancher plus au nord pour survivre.¹⁴ Même au niveau des espèces végétales et lichéniques dont la survie n'est pas menacée directement par ces modifications, il est possible d'observer des impacts sur leur morphologie, en lien avec des modifications de l'environnement dans la foulée des changements climatiques. La morphologie d'un végétal est liée à sa stratégie de croissance et à des compromis faits en réponse aux facteurs externes. Les changements climatiques peuvent modifier la morphologie de certaines plantes, ce qui peut avoir des répercussions sur les écosystèmes.⁴²

1.3.4 Importance des écosystèmes du nord

L'Arctique est considéré comme une des zones les plus importantes pour le refroidissement global de la planète en reflétant les rayons du soleil et en rayonnant les gains énergétiques provenant des tropiques. La température de la planète est grandement liée à la composition de l'Arctique.^{11, 37, 43} Les écosystèmes de la nordicité présentent aussi un caractère unique, avec des conditions particulières, une richesse écologique et une biodiversité importante, bien que moins grande que dans certaines autres régions. Au moins 730 taxons sont connus dans la flore nordique du Québec et du Labrador, un territoire hétérogène, varié et vaste, moins densément peuplé par l'Homme que les écosystèmes plus au sud.⁴⁴ La forêt boréale à elle seule, à l'échelle de la planète, occupe environ 10 % de la superficie terrestre.⁴ Ce ne sont donc pas des régions à négliger.

2 Produits naturels

2.1 Les végétaux et les lichens : sources importantes de métabolites intéressants

Les végétaux ont toujours occupé une place importante dans la vie de l'Homme. Leur importance dans l'alimentation va de soi, mais ils sont aussi employés dans une foule d'autres domaines comme la médecine, la pharmaceutique, la cosméceutique, la nutraceutique, la parfumerie, les colorants, la fabrication de biens (vêtements, matériaux de construction, etc.), etc.⁴⁵ Les plantes sont une source majeure de produits naturels, aussi appelés métabolites secondaires, bien que les métabolites secondaires sont aussi retrouvés dans les autres organismes, particulièrement dans les fungi (comme les lichens), les bactéries et autres micro-organismes. Il est estimé que jusqu'à 600 000 produits naturels ont été isolés à ce jour et que les trois quarts proviennent de plantes. Malgré cela, il en reste encore beaucoup à découvrir selon les experts.⁴⁶

Les plantes et les lichens sont donc une importante source de métabolites et ils représentent des matières premières naturelles, un terme qui est régi par une norme ISO (ISO 9235)⁴⁷ et qui se définit comme suit : « Matière première d'origine végétale, animale ou microbiologique, soit prise en l'état, soit transformée par des procédés physiques, enzymatiques ou microbiologiques, soit transformée par des procédés traditionnels de préparation (par exemple, extraction, distillation, chauffage, torréfaction, fermentation). »

Depuis quelques décennies, il y a un regain d'intérêts dans la société et dans le domaine scientifique pour la médecine traditionnelle impliquant des remèdes végétaux, que ce soit en complément de la médecine moderne ou pour apporter des sources de composés bioactifs à la médecine moderne. Cet intérêt pour les produits naturels transparait aussi dans les domaines de l'alimentation, des arômes et des fragrances.⁴⁵

2.1.1 Historique

Les plantes ont été utilisées longtemps avant que l'Homme ne soit au courant de l'existence des petites choses appelées atomes et molécules qui composent la matière. Les utilisations traditionnelles des plantes sont nombreuses, même en excluant l'alimentation pure et simple. Leur usage et leur efficacité sont intrinsèquement liés à leur composition en métabolites secondaires, dans les domaines comme la médecine traditionnelle et la parfumerie. Les utilisations traditionnelles sont basées sur des millénaires d'essais et erreurs qui ont permis, au fil du temps, d'acquérir des connaissances importantes sur les végétaux et leurs effets, positifs comme négatifs.^{48, 49}

On peut distinguer trois grandes ères de développement de la science des produits naturels. Les premiers indices écrits d'utilisation de plantes à des fins médicinales sont retrouvés chez les Sumériens dès le 3^e millénaire av. J.C. Un ouvrage égyptien datant de 1550 av. J.C., le Papyrus Ebers, décrit un grand nombre de médicaments naturels dont certains sont encore utilisés aujourd'hui. Discorides, médecin grecque du 1^{er} siècle A. D., référençait plus de 600 plantes médicinales dans son œuvre *De Materia Medica*.⁵⁰ Ces documents sont le reflet de l'état des connaissances durant cette première ère de développement de la recherche sur les produits naturels.

La deuxième ère a pris naissance au début du 19^e siècle, alors qu'une approche scientifique plus moderne s'est développée, menant à des découvertes importantes dans le domaine de la phytochimie et de la chimie des produits naturels.⁴⁶ La morphine a été isolée à partir de l'opium en 1803.⁵⁰ La structure de la coniine, un alcaloïde neurotoxique présent dans la Grande cigüe (*Conium maculatum*) a été élucidée en 1870. Puis, la recherche dans le domaine des produits naturels s'est élargie avec la découverte en 1928 d'un antibiotique bien connu, la pénicilline, isolée du champignon *Penicillium notatum*. Cette découverte a en quelque sorte marqué le début des découvertes de métabolites secondaires issues de microorganismes.⁴⁶

Les domaines de recherches qui étudient les produits naturels n'ont cessé d'évoluer depuis. Le développement de méthodes d'analyses durant la seconde moitié du 20^e siècle a permis aux chercheurs d'aller plus loin et a mené à de belles découvertes.⁴⁶ La recherche de produits naturels anticancer a débuté dans les années 1950 et après avoir rencontré du succès avec des agents thérapeutiques comme la vinblastine et la vincristine ainsi qu'avec les agents cytotoxiques podophyllotoxines, la *United States National Cancer Institute* (NCI) a débuté en 1960 un programme de recherche qui a fait progresser la science des produits naturels. Le programme visait à investiguer un grand nombre de plantes pour leurs propriétés anticancer, en se concentrant principalement sur les plantes des régions tempérées. Plusieurs nouveaux chimiotypes cytotoxiques ont pu être découverts ainsi. Ce programme a par la suite été arrêté en 1982 puis remis en marche en 1986.⁵¹

Aujourd'hui, les approches bio-informatiques sont à l'avant-garde de la recherche en science des produits naturels. La troisième ère de développement est donc celle qui est considérée comme post-génomique, alors que les connaissances sur la génétique permettent la découverte ciblée de produits naturels à partir de microorganismes. Des approches de bio-informatique sont aussi utilisées en métabolomique des plantes pour accélérer les découvertes et éviter d'isoler des produits naturels déjà connus et étudiés, ce qui permet plutôt de cibler les métabolites nouveaux ou ceux qui présentent des activités biologiques intéressantes.⁴⁶

Actuellement, avec l'accroissement de l'intérêt du public pour les produits naturels, dans divers domaines, il est intéressant pour les scientifiques de continuer la recherche de produits naturels.⁴⁵ Ceux-ci continuent d'être pertinents pour les scientifiques pour leurs activités biologiques, mais aussi pour leur diversité

et leur complexité chimique, que l'on peut constater en regardant les structures moléculaires produites par les organismes comme les plantes.⁵²

2.1.2 Applications

Les applications des produits naturels sont variées. Les plantes produisent de nombreux produits naturels économiquement importants, dans des domaines comme la médecine, l'alimentation, les colorants, la cosmétique, la cosméceutique, la nutraceutique, etc.⁵³ Entre autres, les produits naturels et leurs dérivés représentent plus du tiers (38 %) des nouvelles entités moléculaires (*New molecular entities* (NME)) approuvées par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA, *Food and Drug Administration*), mais les statistiques des NMEs approuvées annuellement montrent une baisse de la représentation des produits naturels, pour s'établir autour du quart.⁵⁴ Selon si l'on considère seulement les molécules provenant de source naturelle ou si l'on inclut les dérivés semi-synthétiques ou encore les produits synthétisés en s'inspirant de produits naturels, c'est entre 25 et 50 % des NMEs approuvés par la FDA qui sont dérivés de produits naturels, un taux qui témoigne de l'importance des organismes comme sources de molécules bioactives.⁵⁵ D'ailleurs, plus de 60 % des médicaments anticancer en usage en 2005 étaient d'origine naturelle ou dérivés de produits naturels, provenant de plantes, d'organismes marins et de microorganismes.⁵¹

Outre leur importance en médecine moderne, les plantes médicinales, grâce à leurs métabolites secondaires, demeurent la principale source de soins de santé pour une grande partie de la population mondiale. Il est estimé qu'environ 70-80 % des gens utilisent les plantes médicinales comme source de soins de santé primaire.⁵⁶

Dans le domaine des arômes et des parfums, les huiles essentielles et les métabolites secondaires volatils ont une importance majeure. Plus de 3000 huiles essentielles sont connues et de ce nombre plus de 300 ont une grande importance économique.⁵⁷

2.1.3 L'ethnobotanique comme source d'inspiration en chimie des produits naturels

Depuis des millénaires, les différents peuples qui ont habité la Terre ont développé un savoir sur les plantes médicinales par essais et erreurs, un savoir qui se transmet de génération en génération par la tradition orale.⁴⁸ L'ethnobotanique a été d'une grande importance pour la découverte de nouveaux médicaments, particulièrement jusqu'au milieu du XXe siècle. Par la suite, d'autres méthodes ont été priorisées pour la science des produits naturels bioactifs, mais on assiste maintenant à un regain d'intérêt pour l'ethnobotanique, qui transparait dans la science des produits naturels.⁵⁸

L'ethnobotanique et les connaissances en médecine traditionnelle de communautés indigènes ont permis la découverte par les sociétés « occidentales » de plusieurs médicaments. La cocaïne et la quinine sont des exemples de produits naturels utilisés en médecine qui ont été découverts grâce à des suggestions faites par des indigènes, selon leurs connaissances traditionnelles.⁵⁹ L'artémisinine, un agent antipaludique important, a été découvert à partir d'une plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise, l'*Artemisia annua* L.⁶⁰ La galantamine est un produit naturel qui est utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer pour ralentir le processus de dégénération neurologique. Le médicament a été découvert à partir de *Galanthus woronowii* Losinsk grâce au savoir traditionnel de communautés du Caucase et à l'ethnobotanique, en Russie, dans les années 1950.⁶¹ Il existe de nombreux exemples de médicaments ou de produits naturels applicables à divers domaines qui ont été découverts grâce au savoir traditionnel.

L'ethnobotanique n'est pas toujours simple. Les enquêtes dans ce domaine sont parfois difficiles à interpréter. Par exemple, il est plus difficile d'utiliser les connaissances en médecine traditionnelle à propos des plantes ayant des propriétés anticancer comparativement aux plantes ayant des propriétés antipaludiques ou anti-inflammatoires par exemple. En effet, le cancer comme maladie est souvent mal défini dans les savoirs traditionnels, alors que la malaria, par exemple, est mieux connue et localisée dans certaines régions du monde ce qui la rend plus facile à définir.⁵¹

Les connaissances traditionnelles sont menacées à bien des endroits sur Terre avec la colonisation et les modes de vie modernes. Il importe donc de documenter et de préserver le savoir traditionnel sur les plantes médicinales autant que de préserver et étudier les végétaux sources de métabolites.⁴⁸ La conservation des plantes médicinales a d'ailleurs une importance particulière lorsqu'il est question de protéger la biodiversité en raison du rôle culturel, de subsistance et économique qu'elles ont dans la vie de nombreuses personnes.⁶² Au Canada, on assiste à une disparition de certains savoirs traditionnels autochtones en ce qui a trait aux plantes médicinales.^{48, 63} D'ailleurs, les recherches en phytochimie et pharmacologie sur les plantes médicinales traditionnelles étaient peu nombreuses au Canada, mais elles se sont accentuées depuis quelques années, permettant de mettre en lumière des plantes et leurs métabolites possédant des activités biologiques intéressantes.⁴⁸

2.2 Métabolome

Le terme métabolome est un concept analogue des concepts plus connus du génome ou du protéome, mais qui concerne les métabolites primaires et secondaires dans les organismes. Il est donc le résultat du métabolisme dans le sens qui est généralement utilisé en phytochimie et en chimie des produits naturels, qui peut être appelé métabolisme intermédiaire, pour être plus précis.⁶⁴ Le génome inclue les molécules qui sont responsables du code génétique, le protéome inclue les peptides et les protéines et le métabolome inclue les

métabolites, de plus petites molécules qui appartiennent à des classes variées : lipides, glucides, acides aminés, nucléotides, métabolites secondaires, etc.⁴⁶

2.2.1 Métabolites secondaires

Un produit naturel, selon le sens utilisé en chimie, est « une petite molécule organique ($M < 1500$ Dalton) générée par une voie métabolique conditionnelle ».⁴⁶ Le terme conditionnel signifie que ces métabolites ne sont pas essentiels à la croissance et au développement de l'organisme, mais qu'ils sont produits selon certaines conditions. Ils sont donc secondaires. Le terme « produit naturel » est interchangeable avec le terme « métabolite secondaire ».⁴⁶

Le terme de « métabolites secondaires » a eu par le passé une connotation négative ou peu prestigieuse, par opposition aux métabolites dits « primaires », mais les métabolites secondaires peuvent être d'une importance primordiale pour les organismes et ne sont donc pas des métabolites de second ordre.⁴⁵ Ils sont dits « secondaires », car ils appartiennent au métabolisme secondaire, un métabolisme qui n'est pas requis pour la survie en laboratoire, mais qui procure des bénéfices indéniables à l'organisme dans son environnement naturel.⁵²

Les métabolites secondaires sont donc qualifiés ainsi par opposition aux métabolites primaires. Ces derniers sont des molécules de différentes classes qui sont essentielles à la vie et sont communes à tous ou à un grand nombre d'organismes. Elles sont produites via le métabolisme primaire, dont les voies de biosynthèse sont essentiellement les mêmes pour tous les organismes, ce qui démontre bien l'unité du vivant et le lien que partagent tous les organismes, peu importe leur nature. Les métabolites primaires incluent des protéines, des glucides, des lipides, des acides aminés, des acides nucléiques, etc. Les métabolites secondaires, eux, sont produits via le métabolisme secondaire par seulement quelques organismes et dans des conditions spécifiques. Leur fonction n'est pas toujours connue, mais il est généralement admis qu'ils sont produits par les organismes pour répondre à un besoin spécifique, pour assurer le bien-être de l'organisme et pour remplir des rôles précis (résistance aux stress, défense, communication, etc.).⁶⁴

Les métabolites secondaires ne remplissent pas de rôles essentiels à la croissance et au développement des plantes. Ils sont souvent biosynthétisés à partir de métabolites primaires, qui eux, dans le cas des plantes, proviennent initialement, de la photosynthèse et du glucose. Leur distribution est parfois limitée à un genre, ou même à une espèce en particulier, ce qui en fait parfois des molécules assez rares. Ils peuvent être présents en forte concentration dans les plantes, jusqu'à 1 - 3 % de la masse fraîche. Les métabolites secondaires présentent souvent des activités biologiques intéressantes, avec des effets marqués sur d'autres organismes, et peuvent être très toxiques. Ils sont parfois produits et accumulés seulement dans certaines

parties des organismes, comme dans les vacuoles, ou des structures secrétaires spéciales comme des trichomes, des conduits, des canaux ou des laticifères.⁴⁵

2.2.2 Chimiotype

Plusieurs espèces sont connues pour avoir de grandes variations intraspécifiques dans leur composition en métabolites secondaires, au niveau de leurs métabolites majoritaires. On parle alors de chimiotypes.⁶⁵ C'est le cas des plantes aromatiques comme la menthe (*Mentha spicata*)⁶⁶, l'origan (*Origanum vulgare*)⁶⁷ ou encore le thym commun (*Thymus vulgaris*)⁶⁵. L'huile essentielle de cette dernière est utilisée comme exemple classique permettant d'illustrer le concept de chimiotype, qu'on peut aussi appeler chémotype. Ce terme désigne un phénotype chimique, c'est-à-dire qu'une même espèce au sens taxonomique peut présenter des divergences au niveau de sa composition en métabolites secondaires.⁶⁵ Le biologiste Rolf Santesson a défini le terme en 1968 comme « des parties d'une population d'individus morphologiquement indistinguables, mais chimiquement caractéristiques ».⁶⁵

La figure 7 permet d'illustrer le concept de chimiotype à partir des différents métabolites secondaires volatils principaux qui sont retrouvés dans les huiles essentielles de thym commun. Le métabolite secondaire majoritaire (parfois les quelques métabolites majoritaires) est utilisé pour définir le chimiotype. Le thym commun présente 6 chimiotypes pour son huile essentielle seulement dans la région très étudiée autour de Saint-Martin-de-Londres, en France, et d'autres chimiotypes sont retrouvés ailleurs sur la côte de la Méditerranée. Ces six chimiotypes sont définis en fonction du métabolite secondaire majoritaire qui est parfois le thymol, le carvacrol, le géraniol, le linalool, l' α -terpinéol ou le 4-thuyanol.⁶⁵

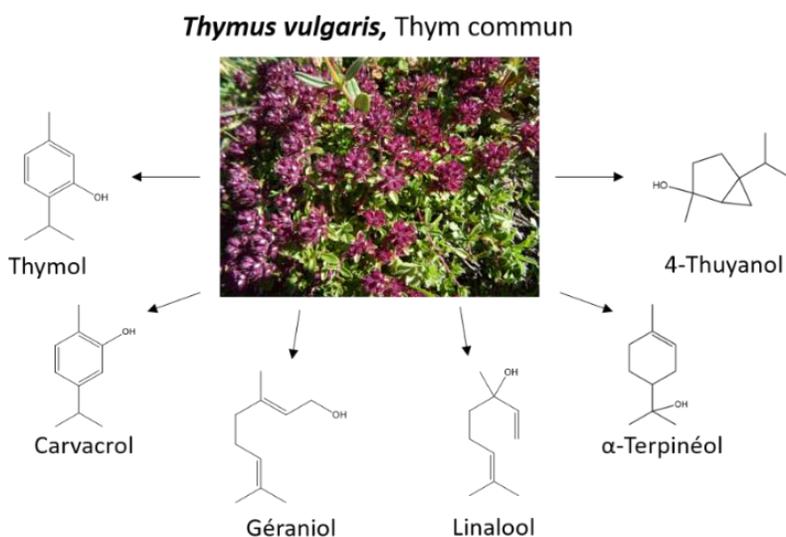


Figure 7. Métabolites secondaires majoritaires des chimiotypes principaux du thym commun, *Thymus vulgaris*, dans la région de Saint-Martin-de-Londres.⁶⁵

Les chimiotypes sont souvent liés aux génotypes, de petites différences dans le bagage génétique d'une plante pouvant influencer grandement la production de métabolites sans pour autant définir un nouveau taxon. Les différences dans la composition moléculaire qui proviennent du chimiotype sont généralement plus importantes que celles qui sont dues à des conditions environnementales.^{65, 68} Des variations géographiques ont malgré tout été rapportées, laissant croire que des chimiotypes peuvent être retrouvés dans certaines régions seulement.⁴⁵ L'analyse de plusieurs échantillons d'huile essentielle de *Thymus caespitius* provenant de différentes îles portugaises sur l'Atlantique a montré qu'il y a possiblement des chimiotypes différents d'une île à l'autre, qui peuvent être dus à des divergences génétiques intraspécifiques ou encore à des facteurs comme la composition du sol.⁶⁹ Les métabolites majoritaires des huiles essentielles de *Zingiber officinale* varient aussi grandement selon qu'ils proviennent de l'Australie, de l'Inde ou du Sri Lanka.⁴⁵

Reconnaitre le chimiotype est important pour la production et l'utilisation d'extraits, car les activités biologiques sont liées à la composition moléculaire et dépendent souvent des métabolites majoritaires. Il faut cependant être prudent avec la définition de chimiotypes parce que les différences peuvent être dues à de nombreux facteurs et parce que des individus d'un même chimiotype peuvent comporter des différences chimiques très grandes au niveau des métabolites non majoritaires. Étant donné que l'activité ou la toxicité d'un extrait comme une huile essentielle peut être liée à un métabolite minoritaire, le chimiotype n'est pas toujours suffisant pour bien définir un extrait végétal.⁶⁵

2.2.3 Huile essentielle

Une huile essentielle est un mélange complexe de métabolites secondaires volatils.⁷⁰ Elles ont souvent une odeur caractéristique, sont généralement liquides à température pièce et sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans les alcools, l'éther et d'autres solvants organiques. Leur densité est plus faible que l'eau (densité < 1), sauf pour quelques exceptions. Elles présentent un indice de réfraction et une activité optique élevés. Les huiles essentielles peuvent être produites par n'importe quelle partie d'une plante, selon les espèces : fleurs, feuilles, rhizomes, graines, fruits, écorce ou bois.⁷¹ Quelques familles de plantes sont particulièrement riches en huile essentielle.⁴⁵ Leur composition moléculaire est variable⁴⁵, les composés volatils des huiles essentielles ont souvent une masse de moins de 300 Da⁷¹ et peuvent présenter des caractéristiques physico-chimiques similaires⁷².

La norme ISO 9235 encadre le vocabulaire relatif aux matières premières aromatiques naturelles, dont les huiles essentielles font partie. Une huile essentielle est ainsi définie comme un « produit obtenu à partir d'une matière première naturelle d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe de fruits de citrus (agrumes), soit par distillation sèche, après séparation de l'éventuelle phase aqueuse par des procédés physiques ». Il est aussi spécifié que l'huile essentielle peut

ensuite être soumise à des traitements physiques comme la filtration, la décantation et la centrifugation, tant que ces traitements ne changent pas sa composition de manière significative.⁴⁷ Le terme huile essentielle remonte au 16^e siècle et est dérivé du terme *Quinta essencia*. L'huile essentielle est considérée comme l'essence de la plante qui la produit.⁷¹ Une huile essentielle est aussi considérée comme une « matière première naturelle »⁴⁷, un terme qui a été défini plus haut.

La figure 8 montre en a) une huile essentielle préparée en respectant la définition de la norme ISO et en b), un flacon contenant cette huile essentielle prélevée également en respectant la norme ISO 9235. Sur cette figure, on peut aussi y observer l'hydrolat, qui se trouve sous l'huile essentielle en a) et qui a été prélevé et mis dans un flacon en b). Un hydrolat est le « distillat aqueux qui subsiste après l'entraînement à la vapeur d'eau et la séparation de l'huile essentielle lorsque c'est possible ».⁴⁷

2.2.4 Extraits

Selon la même norme ISO, lorsqu'on extrait des composés d'une matière première végétale à l'aide d'un ou plusieurs solvants, on le désigne comme un « extrait ».⁴⁷ On peut parler d'extrait volatil ou de fraction volatile pour désigner des extraits composés de métabolites volatils obtenus d'une matière première végétale qui peuvent être extraits grâce à leur capacité à se volatiliser de manière spontanée ou à l'aide d'une technique appropriée.⁷² Il peut s'agir d'un extrait obtenu par extraction à l'aide d'un solvant à partir de l'hydrolat obtenu par distillation. Dans ce cas, on peut aussi parler d'un extrait par solvant à partir de l'eau de distillation.⁷² Il existe plusieurs méthodes d'extraction moderne pour obtenir des extraits volatils, parfois proches d'une huile essentielle en termes de composition moléculaire, mais qui ne peuvent porter ce nom selon la définition qui est faite d'une huile essentielle. Lorsque les métabolites composants un extrait ne sont pas volatils et ne sont pas obtenus grâce à leur volatilité, on parle simplement d'extrait ou d'extrait de plantes, par exemple.⁴⁷



a) En haut, la phase jaune est une huile essentielle, séparée de la phase incolore du dessous, l'hydrolat; b) Les matières premières naturelles séparées, l'hydrolat à gauche et l'huile essentielle à droite.

Figure 8. Matières premières naturelles obtenues à la suite d'une distillation par entraînement à la vapeur à partir de feuilles de *Rhododendron subarcticum*.

2.2.5 Facteurs influençant le métabolome

En définissant les produits naturels comme des molécules provenant d'une voie métabolique conditionnelle, on comprend que les conditions dans lesquelles un organisme évolue ont une influence sur son métabolisme secondaire.⁴⁶ Ainsi, les métabolites secondaires qui sont retrouvés dans un organisme sont sujets à des variations, en fonction de la biologie de l'organisme, mais aussi en fonction des facteurs externes, des stress. De nombreux facteurs peuvent jouer un rôle dans la production de métabolites secondaires par un organisme. Au tableau 1, des catégories de facteurs qui ont une influence sur le métabolome des végétaux sont présentées. Plusieurs de ces facteurs sont des conditions externes qui dépendent du milieu et de l'environnement comme le climat, la pollution, les maladies, les insectes ravageurs, les facteurs édaphiques, la variation géographique, ou encore les blessures qui peuvent être liées aux herbivores. Les facteurs génétiques et l'évolution des espèces, qui peuvent apporter des divergences entre des populations isolées ou même au sein d'une population, jouent aussi un rôle.⁴⁵ Le chimiotype, qui peut résulter principalement de légères variations génétiques, a une grande importance dans la production des produits naturels par un organisme.⁶⁵ Chez certaines espèces ou pour certains types d'extraits comme les huiles essentielles, une grande variabilité est souvent observée et est attribuée à différents facteurs. Elle ne peut toujours être associée à un ou plusieurs facteurs en particulier, elle est parfois plutôt le résultat de l'ensemble des facteurs mis ensemble.⁷³ La figure 9 illustre des facteurs externes, qui dépendent du milieu, qui ont un impact sur le métabolome des organismes.

La variabilité des métabolites secondaires observés chez les organismes d'une même espèce peut aussi être liée à des facteurs qui découlent de caractéristiques morphologiques, de l'âge de l'organisme, ou encore du moment de la récolte de la matière analysée. Le cycle de production des métabolites secondaires dépend de la période de l'année, comme l'illustre la figure 10, sur laquelle on peut observer que le stade de développement a une grande influence sur la couleur de l'huile essentielle obtenue de l'*Achillea millefolium*, couleur qui est liée à la composition moléculaire.⁴⁵

L'emplacement géographique, ainsi que tous les facteurs qui en découlent, sont connus pour jouer un grand rôle dans la production de métabolites secondaires.⁴⁵ La topographie est un facteur important qui vient influencer plusieurs variables comme l'accumulation de neige, la durée du couvert de neige, la disponibilité des nutriments, l'humidité et la température du sol, ce qui a des impacts sur la croissance et le développement des plantes, à une échelle très locale.⁵ Même au sein d'une région restreinte, on peut observer une variabilité importante du métabolome en raison de différences dans les facteurs d'influence.^{65, 74}

Tableau 1. Facteurs influençant la production et la composition des métabolites secondaires des végétaux. (Traduit de Figueiredo *et al*, 2008)⁴⁵

Variations physiologiques
Développement des organes
Cycle d'activité des pollinisateurs
Type de tissus végétaux (feuilles, fleurs, etc.)
Type de structure sécrétaire
Variation saisonnière
Blessures mécaniques ou chimiques
Conditions environnementales
Climat
Pollution
Maladies et insectes ravageurs
Facteurs édaphiques
Variation géographique
Facteurs génétiques et évolution
Entreposage
Conditions politiques/sociales
Quantité de matière végétale/espace et besoin de travaux manuels

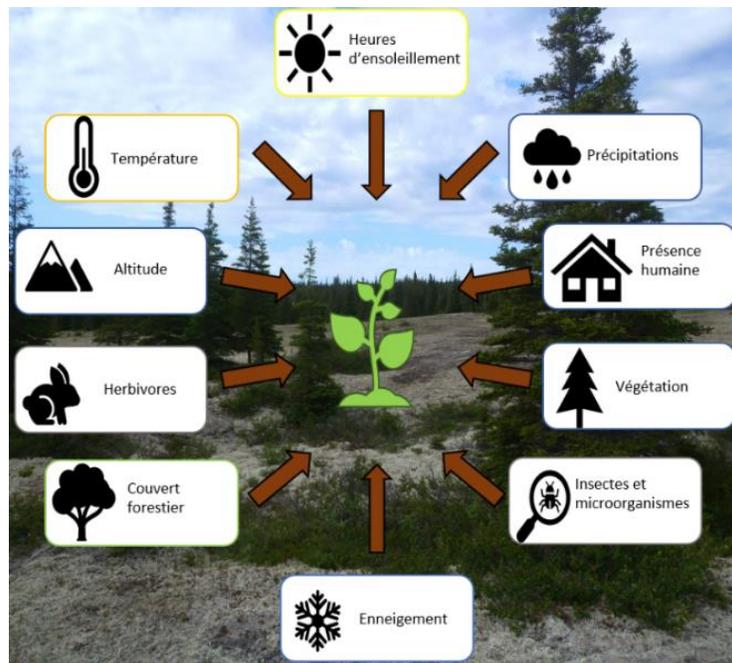


Figure 9. Quelques facteurs externes qui peuvent influencer le métabolome des organismes.



a) fleurs fermées; b) jeunes fleurs ouvertes; c) fleurs complètement ouvertes; d) fleurs séchées à l'air; e) variabilité des couleurs des huiles essentielles obtenues de fleurs sauvages; f) huile essentielle produite au jardin botanique de Lisbonne.

Figure 10. Préparation d'huile essentielle de fleurs d'*Achillea millefolium* à différents stades de développement de la plante.⁴⁵

Bien que les chimiotypes soient responsables d'une grande part de la variabilité et qu'ils soient principalement attribués à des variations génétiques au sein d'une même espèce, les facteurs externes peuvent influencer la production de métabolites secondaires à un certain niveau, particulièrement au niveau des proportions et des métabolites qui ne sont pas majoritaires.⁶⁵ Ainsi, les conditions environnementales jouent un rôle dans la composition en métabolites secondaires et des organismes qui évoluent dans des conditions particulières peuvent présenter un métabolome particulier.

2.2.6 Perte de biodiversité et perte de chimiodiversité

La perte de biodiversité, dont il a été question plus haut dans ce mémoire et dont on entend parler régulièrement dans l'actualité, s'accompagne aussi d'une perte de chimiodiversité. Les organismes produisent, comme expliqué plus haut, des métabolites qui peuvent être propres à l'espèce ou au genre. Il importe donc de protéger les différents écosystèmes pour limiter la perte de biodiversité, dans un premier temps, mais aussi d'investiguer les organismes, dont les végétaux, afin d'en connaître la composition moléculaire, permettant ainsi d'au moins préserver cette richesse.

Des plantes et organismes utilisés en médecine traditionnelle, et encore utilisés aujourd'hui, dans des écosystèmes qui subissent des perturbations, comme les écosystèmes de la nordicité, sont à risque de

disparaître.⁷⁵ Même si des espèces ne sont pas en voie de disparition, le fait que des variations intraspécifiques existent et qu'elles peuvent être liées à la géographie^{45, 69, 76} implique que les perturbations des zones de végétation peuvent entraîner des changements dans les chimiotypes retrouvés et éventuellement la perte de certains d'entre eux.

2.3 Utilisation responsable des ressources

Les recherches en chimie des produits naturels ainsi que l'utilisation des produits naturels dans différents secteurs d'activité peuvent avoir un impact important sur la ressource si la récolte n'est pas faite de façon responsable. Récemment, l'exploitation de ressources végétales de population ou d'écosystèmes fragiles se fait de plus en plus. La forêt boréale est victime de l'exploitation de ses ressources forestières par l'industrie du bois, par exemple, et au niveau des plantes médicinales, plusieurs ont été surexploitées en Amérique du Nord, les amenant parfois à la limite de l'extinction comme l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia* Nutt.) ou encore le ginseng (*Panax ginseng* C.A. Mey).⁷⁷ Cependant, les découvertes faites en phytochimie et en chimie des produits naturels n'impliquent pas nécessairement l'extraction de métabolites à partir de la matière végétale récoltée en milieu naturel. Ce n'est qu'une des méthodes existantes. Il existe plusieurs façons d'obtenir des extraits ou des métabolites intéressants pour pouvoir les utiliser dans divers domaines, qui n'impliquent pas de devoir récolter les végétaux en milieux sauvages et d'endommager la ressource. D'ailleurs, selon les métabolites, les organismes qui les produisent et les besoins de l'industrie, les produits naturels sont déjà obtenus selon différentes méthodes.

2.3.1 Extraction de métabolites

L'extraction de métabolites peut se faire de manière durable en mettant en place des stratégies d'exploitation dans le respect de la ressource. Il est possible de préserver des espèces rares ou des spécimens rares dans des banques de semences, dans des parcs, dans des jardins botaniques, etc. ou encore de cultiver les organismes dans des conditions qui respectent l'environnement et la ressource. Ainsi, il est possible d'obtenir des métabolites secondaires nécessaires en industrie à partir de la ressource naturelle.⁷⁷

Dans les cas de produits naturels qui continuent d'être obtenus par la récolte, il est possible de mettre en place des systèmes d'exploitation responsable ou des méthodes de culture des organismes pour limiter les impacts sur les milieux naturels.⁵⁵ Pour certains composés, il demeure encore nécessaire de les obtenir à partir de la biomasse puisque 50 % des produits naturels n'ont pas encore d'équivalent synthétique et 80 % des systèmes cycliques retrouvés dans des produits naturels n'ont pas encore été reproduit synthétiquement.⁴⁶

Des métabolites secondaires importants pour l'industrie comme l'artémisinine sont obtenus par extraction à partir de la ressource végétale. Il n'y a pas de problèmes actuels pour l'obtention d'artémisinine et

de produits naturels de végétaux du genre *Artemisia*, mais avec l'augmentation de l'utilisation de l'artémisinine et ses dérivés, il pourrait devenir nécessaire d'obtenir ces composés autrement.⁶⁴ Le développement d'autres méthodes d'obtention de l'artémisinine et d'autres produits naturels d'*Artemisia* prend de plus en plus de place sur le marché, mais la principale source demeure la production à partir de plantes cultivées. La sélection et le développement de génotypes d'*Artemisia annua* avec une teneur élevée en artémisinine a permis d'améliorer grandement les rendements et d'obtenir les produits naturels antipaludiques à un coût moins élevé.⁷⁸

2.3.2 Semi-synthèse ou hémisynthèse

La semi-synthèse ou l'hémisynthèse est une méthode de synthèse qui utilise des produits naturels comme produit de départ pour faciliter la synthèse d'un produit final. À partir d'un composé provenant d'une source naturelle, la synthèse est achevée par des étapes de synthèse organique.⁷⁹ Un produit semi-synthétique se définit donc comme un produit naturel qui a été chimiquement modifié.⁵⁴ L'hémisynthèse est souvent particulièrement bénéfique vis-à-vis de la synthèse totale lorsque des centres chiraux sont impliqués, étant donné qu'il est plus facile de conserver la chiralité que de la produire à partir d'un composé achiral.⁷⁹

Le médicament anticancer connu sous le nom de « Taxol », composé du paclitaxel, est un bon exemple des problèmes qui peuvent survenir avec l'utilisation abusive de la ressource naturelle. Ce médicament qui a été découvert dans l'écorce de l'if du Pacifique et qui a été obtenu par extraction à partir de cette ressource naturelle a connu une crise d'approvisionnement importante puisque le *Taxus brevifolia* est principalement retrouvé dans les

vieilles forêts du nord-ouest de la côte du Pacifique, en Amérique du Nord, des forêts qui sont l'habitat de la chouette tachetée, une espèce en danger. La solution à ce problème a été d'utiliser la semi-synthèse en laboratoire pour produire le médicament à partir de métabolites davantage disponibles. La semi-synthèse se fait à partir de Baccatin III, qui est extraite des aiguilles de différents ifs et de β -lactame, tel qu'illustré à la figure 11. Dans ce cas-ci, comme dans bien d'autres, le recours à l'hémisynthèse permet de préserver la ressource naturelle en se tournant vers des sources plus abondantes.⁵⁵

2.3.3 Synthèse totale

Dans certains cas, des métabolites secondaires qui sont utilisés en industrie sont obtenus par synthèse en laboratoire ou encore des molécules inspirées des produits naturels sont synthétisées.⁵⁴ La quinine, qui est

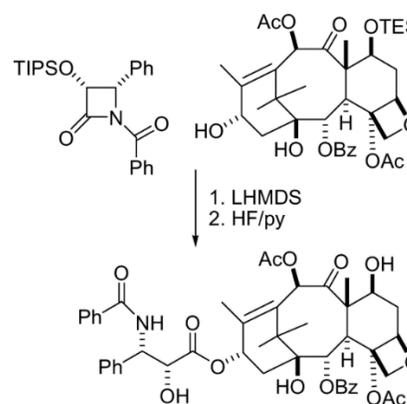


Figure 11. Hémisynthèse du paclitaxel à partir de produits naturels provenant de sources durables.⁵⁵

un alcaloïde, est retrouvée dans l'écorce et les racines des *Cinchona*, un genre dont une douzaine de représentants ont été utilisés pour l'extraction du métabolite. Cet alcaloïde est un antipaludique puissant qui est utilisé depuis longtemps, mais de nombreux dérivés synthétiques ont été développés pour ne pas être dépendant d'une source naturelle de même que pour en améliorer les propriétés, en s'inspirant de sa structure. C'est le cas de médicaments comme la chloroquine, la primaquine et la mefloquine.⁶⁴

2.3.4 Génie génétique

Une autre façon d'obtenir des métabolites secondaires est par la voie du génie génétique. Il s'agit d'un domaine qui prend de plus en plus de place et qui permet la production de produits naturels par modification génétique d'organismes comme des bactéries ou des levures. L'implantation de gènes qui permettent la biosynthèse de certains produits naturels dans ces organismes permet leur production en laboratoire.⁸⁰

Les gènes d'*Artemisia annua* qui codent pour la production d'enzymes responsables des étapes biosynthétiques menant de l'amorphadiène à l'acide artémisinique ont été utilisés en génie génétique pour exprimer ces gènes dans des levures *Saccharomices cerevisiae* et produire de l'acide artémisinique. Ce procédé est commercialisé et permet d'obtenir un produit de départ pour l'hémisynthèse de médicaments antipaludique de manière durable et à plus faible coût.⁶⁴

Il est également possible de modifier génétiquement les organismes produisant naturellement les métabolites d'intérêts pour les amener à en produire en plus grande quantité. Par exemple, la modification génétique de plants de menthe, *Mentha X piperita*, a permis d'améliorer la teneur en menthol de leur huile essentielle.⁸⁰

3 Portée et objectifs des travaux de recherche

Le plus grand défi qui se pose pour les générations actuelles et futures est celui des changements climatiques et de tout ce que ce phénomène entrainera comme perturbations. Les impacts se font sentir pour les humains, les sociétés, mais aussi pour les écosystèmes. Ces changements climatiques entraînent déjà, depuis des années, des modifications au niveau de la faune et de la flore des écosystèmes autour du globe, mais les écosystèmes des régions du nord sont particulièrement affectés et subissent les modifications les plus drastiques de leurs conditions.¹³ Les ressources naturelles issues de la nordicité ont un grand potentiel. Le Nord, les régions froides, représentent une grande superficie, une part considérable de la planète. Régions moins densément peuplées, parfois difficiles d'accès, elles demeurent moins étudiées que les régions du sud. Leurs écosystèmes renferment encore de nombreux secrets, des connaissances, des ressources, qui pourraient disparaître avec les modifications que ces régions subiront au cours des prochaines décennies.

Nombre de plantes sont utilisées depuis longtemps en médecine traditionnelle et leur utilité a été découverte par essais et erreurs. Dans des régions moins peuplées, il est possible que des plantes aient échappé à la découverte de leurs propriétés. La flore a toujours été d'une grande importance pour l'humain, évidemment pour l'alimentation, mais rapidement dans l'histoire de l'humanité, les plantes ont servi pour soigner différents maux⁵⁰, de même que pour des utilisations variées comme pour des rituels⁷⁵ ou en cosmétique^{81, 82}. Encore aujourd'hui, la flore joue un rôle important dans plusieurs domaines et a un impact considérable dans nos vies. Les plantes produisent toute une kyrielle de molécules jouant divers rôles dans leur croissance, leur survie, leur reproduction, leur communication, etc. Un nombre considérable de produits naturels issus de végétaux ou d'autres organismes sont utilisés aujourd'hui en pharmaceutique, en cosméceutique, en cosmétique, en parfumerie, en alimentation, etc.

La phytochimie est une branche de la chimie qui étudie la composition moléculaire des végétaux. Sa portée est assez grande, les sources et les applications des métabolites végétaux étant variées et multiples. Dans le métabolisme des plantes, l'on distingue deux classes de métabolites : les métabolites primaires, essentiels à la vie et retrouvés dans tous les organismes, et les métabolites secondaires, aussi appelés produits naturels, que les végétaux produisent pour jouer différents rôles, généralement pour des questions de défense et de protection face aux stress. D'autres organismes, comme les lichens, produisent aussi des métabolites secondaires. Les stress que subissent les végétaux et les lichens influencent les métabolites que ceux-ci produisent. Il est donc clair qu'en vivant des stress différents, les plantes et les autres organismes peuvent avoir une composition moléculaire très différente. Les écosystèmes de la nordicité présentent des conditions particulières : températures basses, saison froide longue, saison de croissance courte, heures d'ensoleillement extrêmes, moins d'activité humaine, etc. Ces conditions sont autant de sources de stress ou de facteurs externes qui influencent le métabolome des végétaux qui y croissent. Avec des conditions aussi particulières, la nordicité peut avoir un impact important sur le métabolome. Cependant, avec les modifications des écosystèmes, des pertes de biodiversité sont à prévoir et cela implique aussi des pertes de chimiodiversité.

Les perturbations que connaissent les écosystèmes peuvent aussi, en elles-mêmes, être à l'origine de particularités dans les compositions en métabolites secondaires. Avec le verdissement des écosystèmes nordiques associé principalement à l'avancée des arbustes, les végétaux et les organismes des régions du nord en changement pourraient présenter des profils métaboliques différents. Il est donc intéressant de procéder à des analyses de leur composition moléculaire afin de déceler les impacts de la nordicité sur leur métabolome ou même de déceler des particularités dues au contexte actuel de changements climatiques rapides. Que ce soit les arbustes qui progressent vers le nord en colonisant des écosystèmes qu'ils n'occupaient pas auparavant, des arbustes qui se trouvent à la limite nord de la forêt boréale dans des environnements complètement différents d'où ils sont généralement retrouvés et exploités, des arbustes typiques des écosystèmes nordiques

ou des lichens qu'on retrouve sur un vaste étendu de latitudes, les végétaux et les organismes du Nord peuvent nous permettre d'acquérir des connaissances importantes sur l'impact des stress associés à la nordicité.

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de produits naturels produits par plusieurs plantes. Les arbustes *Rhododendron groenlandicum*, *Rhododendron subarcticum* et *Myrica gale*, qui sont retrouvés au Nunavik, en produisent et subissent forcément les impacts de la nordicité. L'arbuste *Betula glandulosa*, très répandu dans les écosystèmes nordiques de l'Est canadien, produit aussi des métabolites secondaires. Pourtant il demeure une espèce sous étudiée d'un point de vue phytochimique. Ses métabolites volatiles n'ont jamais été étudiés.

Les lichens, quant à eux, sont des organismes particulièrement intéressants. Ils colonisent rapidement les environnements les plus hostiles. Certains lichens comme *Cladonia stellaris* et *Stereocaulon paschale* sont retrouvés sur une grande plage de latitudes et représentent de bons candidats pour évaluer l'impact de la nordicité sur leur métabolome. De plus, leur croissance lente pourrait permettre d'observer des différences entre les échantillons qui seraient à l'image de l'écosystème global dans lequel ils évoluent plutôt que des variations dues à des facteurs externes ponctuels.

Avec tous les points qui ont été énoncés ci-haut, les projets qui sont présentés dans ce mémoire ont le potentiel de permettre de belles découvertes. Ces découvertes pourraient être : des chimiotypes nouveaux ou rares; des métabolites nouveaux, inédits, ou bien des métabolites peu communs; des activités biologiques intéressantes, pour des extraits déjà connus ou bien pour des extraits avec des compositions en métabolites secondaires particulières ou inédites, provenant de la nordicité; ou des divergences marquées entre des extraits provenant d'écosystèmes nordiques et les mêmes types d'extraits provenant d'écosystèmes de plus basses latitudes.

Étant donné que les végétaux et les lichens produisent des métabolites secondaires pour se protéger des stress qu'ils subissent, que les régions faisant partie de la nordicité présentent des stress particuliers, que ces écosystèmes sont en transformation rapide en raison des changements climatiques, qu'il y a encore beaucoup à découvrir en science des produits naturels et que les métabolites secondaires ont démontré à maintes reprises leur utilité dans différents domaines, il importe de remédier au manque de connaissances scientifiques sur la phytochimie et la chimie des produits naturels de la nordicité.

Avec les changements climatiques et les modifications que subissent les écosystèmes de la nordicité, décrits plus haut, certains végétaux et organismes vont disparaître, emportant avec eux des découvertes potentielles. D'autres végétaux et organismes, plutôt que de disparaître, vont s'adapter aux nouvelles conditions et cela peut affecter leur métabolome. En phytochimie, il reste de grandes lacunes à combler pour ce qui est de

l'étude des végétaux du Nord. Il s'agit donc d'un premier grand objectif des travaux décrits ici, soit d'étudier la phytochimie de végétaux et le métabolome de lichens issus d'écosystèmes nordiques afin d'améliorer les connaissances dans ces domaines. L'évaluation de l'impact de la nordicité, de ses facteurs environnementaux et de ses conditions particulières sur le métabolome des organismes qui y évoluent était aussi un objectif visé. Parmi les autres grands objectifs des projets présentés ici, il y a l'objectif de démontrer la richesse des écosystèmes de la nordicité, avec des exemples au Nunavik, ainsi que la mise en valeur des ressources végétales du Grand Nord québécois.

Ainsi, trois projets de recherche seront présentés dans les prochains chapitres. Les objectifs précis et spécifiques de ces projets seront présentés dans leurs chapitres respectifs. Le premier projet, présenté au chapitre 2, visait la caractérisation de la composition moléculaire d'huiles essentielles d'arbustes du Nunavik, afin d'apporter des connaissances sur la phytochimie du Nord, ainsi que la comparaison de ces extraits avec ceux des mêmes espèces provenant d'autres régions du monde pour possiblement observer des indices de l'impact de la nordicité sur ces végétaux. Les arbustes étudiés sont le *Rhododendron groenlandicum*, le *Rhododendron subarcticum* ainsi que le *Myrica gale*. Le second projet de recherche a porté sur l'investigation de la composition en métabolites secondaires volatils de *Betula glandulosa* afin, encore une fois, d'acquérir des connaissances sur la chimiodiversité du Nord, cette fois par l'étude d'un arbuste négligé par les phytochimistes dont la composition en métabolites secondaires n'est pratiquement pas étudiée. Le troisième et dernier projet dont il sera question visait à évaluer l'impact de la latitude, avec tout ce que ça implique comme différences au niveau des différents facteurs externes, grâce au développement d'une méthode permettant l'extraction et l'analyse d'échantillons des lichens *Cladonia stellaris* et *Stereocaulon paschale* prélevés selon un gradient latitudinal.

Chapitre 1 : Méthodologie d'investigation phytochimique d'huiles essentielles et d'extraits volatils

Pour réaliser des investigations phytochimiques, il existe différentes méthodologies, qui sont le reflet de la variété de métabolites secondaires et de leurs caractéristiques, de la variété de sources de produits naturels et de la variété d'objectifs visés. Dans ce chapitre seront présentées les différentes étapes et la méthodologie utilisée pour la réalisation des études phytochimiques d'huiles essentielles ainsi que d'extraits volatils tels que présentées dans les chapitres 2 et 3. Il vise à permettre une meilleure compréhension du travail impliqué dans ce type de projet. Les détails expérimentaux seront par la suite précisés dans la présentation de chacun des projets réalisés, dans le chapitre correspondant.

1 Conventions et nomenclature

Quelques normes de présentation des travaux et des résultats de recherches en phytochimie et en chimie des produits naturels sont à préciser. Au niveau de la nomenclature, les noms de métabolites secondaires qui seront présentés dans ce mémoire seront prioritairement les noms communs donnés au composé, souvent par le découvreur. Par exemple, le nom « limonène » sera utilisé plutôt que le nom IUPAC « 1-méthyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexène ». La nomenclature systématique devient rapidement difficile à utiliser avec la complexité structurale de certains produits naturels. Si un nom commun est absent, le nom qui sera utilisé sera une version francisée du nom généralement retrouvé dans la littérature sur les produits naturels, des noms qui permettent de retrouver le composé en question dans la littérature ou les bases de données et qui sont en règle générale le nom donné par le découvreur du métabolite.⁶⁴

2 Choix des organismes à étudier

Le choix des organismes est une étape cruciale dans la réalisation de projets d'études en phytochimie et en chimie des produits naturels. Différents critères peuvent être appliqués lors de la sélection selon les objectifs visés. Dans le cas de mes projets de maîtrise, les organismes à l'étude ont été sélectionnés pour répondre directement aux objectifs qui étaient poursuivis dans chacun des projets.

Pour dresser une liste préliminaire de végétaux potentiellement intéressants, nous avons demandé des suggestions à notre collaborateur, également mon codirecteur de recherche, le professeur Stéphane Boudreau

du département de biologie de l'Université Laval, qui connaît bien les végétaux du Nunavik. Pour les projets de recherche d'investigation phytochimique d'huiles essentielles et d'extraits volatils de végétaux issus de la nordicité, les plantes qui ont été analysées ont été choisies selon les critères suivants.

Possibilité de comparatifs

Puisque l'investigation phytochimique d'huiles essentielles de végétaux issus de la nordicité prévoyait des comparaisons avec des huiles essentielles préparées des mêmes végétaux, mais provenant de latitudes plus au sud, il était nécessaire d'avoir des comparatifs. Les végétaux récoltés devaient avoir déjà été étudiés et la composition moléculaire de leur huile essentielle devait avoir déjà été rapportée, avec des échantillons provenant de différents lieux, avec des caractéristiques différentes de nos sites de récoltes.

À partir de la liste de végétaux potentiellement intéressants qui a été élaborée avec l'aide du Pr Stéphane Boudreau, une revue de littérature a été faite afin de vérifier quels végétaux présents dans le Nunavik avaient déjà été étudiés par des phytochimistes et quels végétaux étaient déjà connus pour leur huile essentielle. Les recherches ayant déjà porté sur les huiles essentielles des végétaux considérés devaient avoir porté sur des échantillons ne provenant pas d'écosystèmes de la nordicité ou à tout le moins, provenant d'écosystèmes différents des sites d'échantillonnage prévus pour ce projet, et présenter des caractéristiques différentes.

Aspect novateur

Dans certains autres cas, l'objectif principal n'était pas de pouvoir démontrer une particularité liée à la nordicité, mais plutôt d'investiguer des végétaux caractéristiques du Nunavik qui n'ont encore jamais été analysés par des phytochimistes ou du moins, pas leur huile essentielle ou leurs composés volatils. Ce volet du projet avait donc des visées plus novatrices, c'est-à-dire que le but était d'effectuer la première caractérisation de la composition moléculaire de l'huile essentielle ou de la fraction volatile de plantes de la nordicité. La sélection s'est faite, encore une fois, à partir de suggestions du Pr Boudreau, mais cette fois, en orientant la revue de littérature pour trouver des végétaux dont la composition en métabolites volatils est inconnue.

Ethnobotanique et utilisations traditionnelles

L'ethnobotanique est une science qui a souvent apporté des informations intéressantes à d'autres domaines d'étude comme la phytochimie. Les connaissances traditionnelles accumulées au fil des siècles ou des millénaires peuvent permettre d'orienter la recherche moderne. C'est aussi un critère qui a été utilisé pour le choix des végétaux étudiés. Les utilisations traditionnelles rapportées dans la littérature pour les végétaux potentiellement intéressants pour nos investigations phytochimiques ont été prises en considération puisque cela indique que ces plantes peuvent produire des métabolites secondaires bioactifs intéressants. De plus, cela

peut permettre d'apporter des informations scientifiquement prouvées qui viennent appuyer les connaissances traditionnelles. Les suggestions des membres des communautés autochtones résidant près des sites de récoltes ont été prises en compte afin d'étudier des plantes qui leur sont connues, qui les intéressent et qu'ils utilisent.

Disponibilité et abondance de la matière

Un autre critère important qui a été pris en compte est, évidemment, la disponibilité et l'abondance de la matière première. La préparation d'huiles essentielles ou d'extraits volatils à l'échelle visée demande de récolter une quantité considérable de matière végétale. De plus, la valorisation de la composition moléculaire de végétaux est préférable lorsque ces végétaux sont abondants. Les végétaux sélectionnés devaient donc être non seulement présents dans les écosystèmes nordiques du Nunavik, mais aussi y être présents en assez grande quantité. Il existe des risques associés à la récolte abusive de plantes dans les habitats naturels et il était préférable de choisir des plantes assez abondantes.⁷⁷

3 Récolte et traitement de la matière première

Une fois les organismes sélectionnés, l'étape suivante est la planification de l'échantillonnage et la récolte en elle-même. Il s'agit aussi d'une étape cruciale puisqu'il est important, afin de pouvoir poursuivre les investigations, de bien récolter les organismes selon les besoins spécifiques des projets et de traiter et conserver les matières premières naturelles.

3.1 Choix du site

Avec comme principal objectif l'investigation d'organismes provenant de la nordicité, il est évident que le choix des sites de récolte doit se faire dans des régions du Nord. La nordicité des sites de récolte dépend de la définition de Louis-Edmond Hamelin², en prenant en compte les différents critères d'évaluation de la nordicité, mais avec une attention particulière pour les critères écologiques et géographiques, ayant des impacts sur les organismes. Cependant, les dimensions humaines et sociales sont aussi importantes lorsqu'on définit la nordicité et pourraient aussi influencer les organismes (moins d'exploitation, moins de pollution, etc.).

Certains autres critères sont importants dans le choix des sites de récoltes. L'accessibilité est primordiale, il faut pouvoir s'y rendre par un moyen de transport accessible et qui convient au type de projet à réaliser. Dans le cas des projets actuels, la disponibilité de bâtiments, d'une station de recherche, était importante pour pouvoir conserver et traiter la matière première récoltée. Il est aussi nécessaire de s'assurer que la récolte est autorisée à l'endroit choisi.

3.2 Identification des organismes

Pour l'identification des organismes, végétaux ou lichens, il est impératif de faire appel à des experts en botanique, l'identification étant parfois difficile avec des organismes qui peuvent se ressembler morphologiquement. Idéalement, un échantillon doit être prélevé et déposé dans un herbier pour que l'identification soit confirmée par les experts qui y sont rattachés et que des traces soient conservées.

3.3 Échantillonnage

La méthode d'échantillonnage doit aussi être réfléchi en fonction des objectifs du projet. Il existe trois grandes tendances dans les méthodes d'échantillonnage : l'échantillonnage aléatoire, l'échantillonnage stratifié et l'échantillonnage systématique.⁸³ La méthode d'échantillonnage aléatoire est jugée appropriée pour des investigations phytochimiques d'huiles essentielles, le nombre d'organismes qui composent un échantillon doit être évalué, au moins approximativement.⁸⁴ Cette méthode d'échantillonnage consiste à échantillonner les organismes de manière aléatoire sur une zone définie.⁸⁵ L'échantillonnage peut aussi se faire en collectant la matière d'un seul organisme ou de plusieurs organismes. Les méthodes d'échantillonnage énoncées ci-haut peuvent s'appliquer ici aussi pour la sélection du ou des organismes.⁸⁵ L'échantillonnage nécessite aussi de noter le géopositionnement, la date de récolte ainsi que des informations sur le site d'échantillonnage (type de végétation, particularités, etc.). Prendre des photographies du site est aussi une bonne pratique, qui permet de garder des traces de l'apparence de l'environnement, ce qui peut donner des indices sur les stress auxquels sont soumis les organismes qui y évoluent.

3.4 Conservation de la matière première

La conservation de la matière dépend du type de matière première naturelle, du type d'extraction visé et des objectifs du projet. Dans le cas des huiles essentielles, certaines plantes sont plus faciles à extraire lorsque la matière est séchée, totalement ou partiellement, alors que pour d'autres plantes ou certaines parties de plantes, la matière doit être fraîche afin d'éviter de perdre des métabolites volatils lors du séchage.⁸⁶ Dans certains cas, le rendement peut être supérieur si la matière est partiellement séchée, mais si le rendement n'est pas le premier objectif, l'extraction de la matière fraîche peut être appropriée pour éviter au maximum les pertes de certains métabolites très volatils, par exemple lorsque la composition en métabolites secondaires est inconnue. Pour les cas où le séchage est nécessaire ou préférable, pour les extraits autres que les huiles essentielles, par exemple, ou pour les huiles essentielles qui sont obtenues à partir de matière végétale séchée, il peut s'agir d'un séchage à l'air libre et à température ambiante ou encore dans une étuve. Le séchage à l'air libre est moins intense, mais plus long.

Lorsque la matière doit être conservée fraîche, il faut idéalement procéder à l'extraction le plus rapidement possible. Dans les cas où l'extraction ne peut être faite rapidement, l'entreposage des échantillons doit être fait dans un congélateur. Il est également nécessaire de veiller à bien conserver les matières premières d'origine et de nature différentes séparément, et à bien identifier les échantillons. La conservation au réfrigérateur ne doit pas être utilisée si les échantillons doivent être entreposés plus de quelques jours puisque de la moisissure ou de la dégradation de la matière peuvent survenir.

3.5 Traitement préalable de la matière première

Avant l'extraction, il est important de procéder à un tri des échantillons afin de retirer tout morceau qui n'appartient pas à l'espèce étudiée. Il faut veiller à bien retirer les morceaux provenant d'autres organismes, les parties de l'organisme qui ne sont pas investiguées (par exemple les branches ou les bourgeons lorsque l'investigation porte sur les feuilles), les excréments d'animaux, la terre, les insectes, etc.

Un traitement préalable supplémentaire de la matière première est souvent nécessaire ou préférable afin d'augmenter l'efficacité de l'extraction, en améliorant la disponibilité des métabolites à extraire, mais il peut toutefois entraîner un moins bon rendement ou des perturbations des métabolites. Le broyage et le hachage sont souvent de bonnes méthodes. Pour les huiles essentielles, il est souvent intéressant de diviser les morceaux de matière première avant la distillation.⁸⁶ Couper les feuilles à l'aide de ciseaux est une façon pratique de le faire.

3.6 Détermination de la masse sèche

Lorsque la matière est séchée avant l'extraction, la masse sèche correspond à la masse de matière organique qui est utilisée pour l'extraction. Cependant, dans les cas où l'extraction se fait à partir de la matière fraîche ou partiellement séchée, il faut déterminer la teneur en eau et la masse sèche. Le rendement doit être rapporté en fonction de la masse sèche pour avoir de la valeur, le pourcentage d'humidité étant très variable.⁸⁴ Selon l'organisme, il peut varier entre 5 et 80 %.⁷⁰

Pour déterminer la masse sèche, on peut retirer un échantillon de quelques grammes (environ 10 g) de matière végétale de l'échantillon avant la distillation et en noter la masse fraîche. Cet échantillon doit être représentatif de l'échantillon à extraire, il faut donc essayer d'homogénéiser l'ensemble de l'échantillon avant d'en retirer les quelques grammes. L'échantillon est ensuite séché pour en retirer l'eau. Le séchage peut être fait de différentes façons, à température pièce et à l'air libre, il prendra du temps, alors qu'à l'étuve, à une température adaptée, il sera plus court. La température de l'étuve doit être assez basse pour éviter d'évaporer les métabolites volatils, mais assez élevée pour retirer l'eau. L'échantillon est considéré sec lorsque la masse

ne baisse plus lors du séchage. La masse sèche peut ensuite être calculée selon l'équation 1, avec x qui correspond à l'échantillon mis de côté pour être séché.

Équation 1. Calcul de la masse sèche d'un échantillon de matière organique.

$$masse\ sèche_{éch.\ distillé} = \frac{masse\ sèche_x}{masse\ fraîche_x} \times masse\ fraîche_{éch.\ distillé}$$

4 Extraction

4.1 Préparation d'huiles essentielles et de fractions volatiles

L'organisation internationale de l'industrie des arômes alimentaires (IOFI, pour *International Organization of the Flavor Industry*) émet des balises pour encadrer la production, la vente et aussi la recherche dans le domaine des arômes et des fragrances qui touchent les huiles essentielles et les extraits volatils.⁸⁷ Ces balises sont utiles pour encadrer la préparation des extraits afin de respecter les définitions officielles et permettre la comparaison avec des résultats publiés ou provenant de l'industrie.

Selon la définition officielle d'une huile essentielle, les modes de préparation sont limités et encadrés.⁴⁷ Le reste des extraits composés de métabolites volatils sont appelés « fractions volatiles »⁷², à moins qu'il ne correspondent à d'autres termes définis dans la norme ISO 9235⁴⁷. Une huile essentielle peut être obtenue par hydrodistillation, entraînement à la vapeur, distillation à sec, pression à froid (dans le cas des *citrus*) ou par un moyen mécanique n'impliquant pas de chauffage.^{72, 84} Elles sont généralement préparées par distillation, en utilisant le flux de vapeur d'eau pour entraîner les métabolites volatils par distillation azéotropique, puis condensées dans un réfrigérant et séparées de l'eau grâce à leur immiscibilité et leur différence de densité.⁷⁰

En plus du choix de la méthode de distillation, plusieurs paramètres sont à prendre en compte dans la préparation d'huiles essentielles ou de fractions volatiles. La durée de la distillation n'est pas un paramètre standard, elle peut être très différente selon la matière végétale et les objectifs visés. Elle peut être d'une, deux, trois ou parfois 15 - 20 heures (dans le cas de bois, par exemple). Il est important de mentionner la durée de la distillation et d'en justifier le choix.⁷² La façon dont est récupérée l'huile essentielle n'est pas standard non plus, elle est cependant régie par la norme ISO 9235,⁴⁷ ce qui implique aussi de mentionner la façon dont l'huile essentielle a été prélevée. Dans le cas des fractions volatiles, plusieurs méthodes sont acceptées pour leur obtention, en expliquant la technique utilisée et en en justifiant le choix. L'extraction liquide-liquide des métabolites volatils récupérés dans le distillat ou l'hydrolat à l'aide d'un solvant volatil est une méthode

appropriée qui permet de n'extraire que des métabolites volatils (puisqu'ils ont été emportés par la vapeur d'eau). Les méthodes d'entreposage des huiles essentielles impliquent en général un entreposage au frais (4 °C) ou au congélateur. Les échantillons sont généralement conservés à l'abri de la lumière. Ces mesures permettent de limiter la dégradation qui peut se produire sous l'effet de la lumière ou de la chaleur.

Les méthodes classiques d'hydrodistillation et d'entraînement à la vapeur seront présentées ici.

4.1.1 Hydrodistillation

L'hydrodistillation est une méthode de préparation d'huile essentielle par distillation en submergeant la matière végétale dans l'eau portée à ébullition.⁸⁶ En laboratoire, elle se fait généralement à l'aide d'une pièce de verrerie appelé « Clevenger », du nom de son inventeur. L'appareil Clevenger permet de recueillir l'huile essentielle, de la séparer de l'eau condensée et de retourner l'eau dans le ballon ou la pièce qui contient l'eau avant évaporation.⁸⁸ La figure 12 montre un appareil d'hydrodistillation utilisant le principe de Clevenger. Le principe du retour d'eau après condensation vers l'alambic est appelé cohobation. La cohobation permet de distiller plusieurs fois, de recycler les eaux de distillation après la séparation de l'huile essentielle dans le séparateur. Elle est généralement appliquée lors des hydrodistillations, mais la cohobation peut aussi être utilisée avec tous les types de distillation ou presque.⁸⁶

Lors de la distillation avec un montage de type Clevenger tel qu'illustré à la figure 12, la matière végétale est mise dans le ballon à la base du montage avec de l'eau portée à ébullition. La vapeur d'eau emporte les métabolites secondaires à travers le montage, est condensée par un réfrigérant puis le distillat est récolté dans un séparateur. Le séparateur permet à l'huile essentielle de se séparer de l'hydrolat, la phase aqueuse, grâce à leur immiscibilité. Puisque l'huile essentielle est généralement moins dense que l'eau, elle se retrouve dans le haut du séparateur et la phase aqueuse continue de circuler, par cohobation pour être distillée à nouveau.

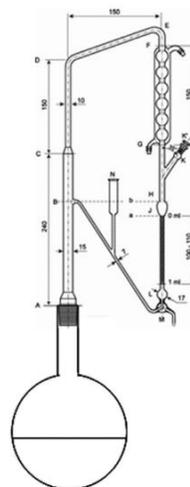


Figure 12. Appareil d'hydrodistillation circulaire de type Clevenger tel que rapporté dans l'European pharmacopoeia.⁷²

4.1.2 Entraînement à la vapeur

L'entraînement à la vapeur est une méthode de préparation d'huile essentielle par distillation qui implique que seule la vapeur d'eau traverse la matière végétale, cette dernière n'est pas plongée dans l'eau.⁷⁰ Il est possible d'utiliser cette technique en laboratoire pour éviter le contact direct entre la matière végétale et l'eau. À la figure 13 est présenté un exemple de montage d'entraînement à la vapeur tel qu'utilisable en laboratoire. L'eau est chauffée dans un premier récipient, puis la vapeur d'eau est acheminée dans un ballon contenant la matière végétale et la vapeur entraîne les métabolites secondaires volatils vers un réfrigérant qui permet de condenser le distillat. L'huile essentielle se sépare de l'hydrolat grâce à l'immiscibilité de ces deux phases et peut ainsi être récoltée. Les montages peuvent différer, mais le principe demeure le même.

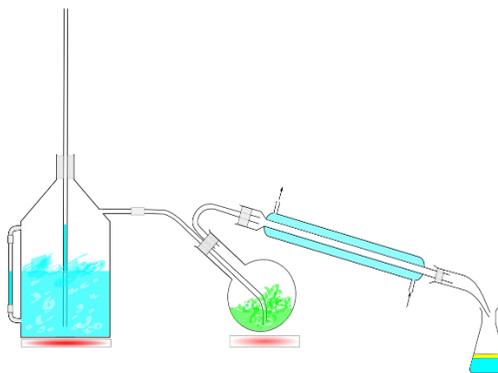


Figure 13. Montage d'entraînement à la vapeur de laboratoire.

4.1.3 Extraction de la fraction volatile

La fraction volatile peut être obtenue de différentes façons puisque plusieurs techniques permettent d'extraire des composés volatils à partir d'une matière première végétale.⁷² Une des façons est d'utiliser la distillation, comme dans le cas des huiles essentielles, pour entraîner les métabolites volatils grâce à leurs propriétés, mais d'ajouter une étape d'extraction à l'aide d'un solvant. Des solvants bien adaptés sont par exemple les hydrocarbures comme l'éther, le benzène et l'hexanes ou divers autres solvants comme l'éthanol et le dichlorométhane. Une extraction des métabolites secondaires volatils directement à l'aide d'un solvant volatil permet d'obtenir un extrait appelé concrète.^{47, 81} Ajouter une extraction liquide-liquide à la suite de la distillation, à l'aide d'un solvant avec un point d'ébullition bas qui permettra d'évaporer le solvant sans évaporer les métabolites secondaires extraits, permet aussi de récupérer les métabolites volatils. Il est possible d'ajouter un solvant immiscible avec l'eau directement dans le séparateur afin d'extraire les métabolites secondaires volatils directement lors de la condensation du distillat. Pour récupérer les métabolites volatils, il faut, après une extraction à l'aide d'un solvant, évaporer le solvant pour concentrer les métabolites extraits, en veillant à ne pas évaporer les métabolites avec le solvant. Une pression réduite permet d'évaporer les solvants volatils sans avoir à chauffer.⁸¹

5 Analyse des extraits

Selon la nature des extraits et les objectifs visés, l'analyse peut être faite selon une multitude de méthodes différentes, à l'aide d'une grande variété d'appareils. Ici seront présentées les méthodes d'analyse qui ont été employées pour les projets présentés aux chapitres 2 et 3.

5.1 Détermination du rendement

Le calcul du rendement d'extraction doit être fait à partir de la masse sèche de la matière organique pour être utilisé à des fins de comparaison et pour être significatif. Le rendement correspond au ratio entre la masse de l'extrait obtenu et la masse de la matière première sèche et est généralement présenté en pourcentage. Il peut être calculé à l'aide de l'équation 2. Cette valeur peut être très utile pour comparer les méthodes d'extraction, l'effet sur une méthode d'extraction d'une modification d'un paramètre ou pour comparer des échantillons de matière première entre eux.

Équation 2. Calcul du rendement d'extraction.

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{masse de l'extrait}}{\text{masse de matière première}_{\text{sèche}}} \times 100$$

5.2 Caractérisation des huiles essentielles et fractions volatiles

5.2.1 Analyses par GC-MS

La caractérisation par GC-MS, la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, est utilisée depuis les années 1960 comme méthode de prédilection pour l'identification des composés naturels volatils.^{89, 90} En chimie des huiles essentielles, elle est à la base de l'identification des métabolites secondaires.⁹¹ La préparation des échantillons pour ces analyses requiert de pouvoir les injecter et les volatiliser. Ils doivent aussi pouvoir être détectés, sans être trop intense. Ainsi, les échantillons peuvent être injectés purs ou dilués dans un solvant approprié (volatil) comme le dichlorométhane, l'hexanes, l'éther, le méthanol, etc.⁸⁶ L'injection d'échantillon « blanc », ne contenant pas d'analytes, mais uniquement le ou les solvants de dilution est une bonne pratique à adopter afin d'avoir une idée du profil du bruit de fond dans les conditions d'analyse ainsi que pour observer d'éventuelles impuretés ou produits qui traînent au fil des injections.

5.2.1.1 Séparation par chromatographie gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est sans contredit une technique incontournable en chimie des substances volatiles comme les huiles essentielles et les fractions volatiles. C'est une technique très

largement utilisée en raison de son coût modéré, son automatisation, sa robustesse ainsi que les différentes possibilités qui s'offrent au niveau des colonnes et des détecteurs.⁹¹ La polarité et la volatilité des composés contenus dans les huiles essentielles et les extraits volatils font de la chromatographie en phase gazeuse une méthode de choix.⁷²

Elle se base sur la séparation des composés, à l'état gazeux, selon leur différence d'affinité avec une phase stationnaire. Les composés doivent donc pouvoir être volatilisés dans les conditions d'analyse. Les analyses d'huiles essentielles ou de fractions volatiles en chromatographie gazeuse se font généralement avec un injecteur automatisé, qui permet de faire plusieurs injections subséquentes sans avoir à surveiller l'appareil pour injecter chaque échantillon et permet une plus grande reproductibilité. Le volume d'injection est généralement très bas (0,1 – 10 µl). Les injections peuvent se faire en mode *split* (en éluant seulement une fraction de l'échantillon et en rejetant l'autre fraction) ou *splitless* (en éluant l'ensemble du volume injecté). La division du volume injecté permet d'éviter de saturer la colonne (les colonnes capillaires ont de très petits diamètres internes) et seule la plus petite fraction du volume injecté est élue. L'appareil comporte un four, qui contient une colonne chromatographique.⁸⁶ Il existe plusieurs types de colonnes, avec des phases stationnaires variées, qui peuvent être adaptées pour la séparation de différents composés. Les colonnes capillaires sont fréquemment utilisées. On distingue les colonnes apolaires des colonnes polaires, qui permettent de faire des analyses selon différentes phases. Les colonnes les plus fréquemment utilisées en phase apolaire sont constituées d'une phase stationnaire à base de polysiloxane de méthyle ou de polysiloxane de méthyle-phényle alors qu'en phase polaire il s'agit plutôt de phases stationnaires constituées de polyéthylèneglycol.⁷² Le four est utilisé pour régler la température et permettre l'élution en fonction de la volatilité, en plus de l'affinité avec la phase stationnaire. L'utilisation de gradients de température est très courante. Un gaz vecteur, qui peut être de l'hélium, de l'azote ou de l'hydrogène, entraîne les échantillons à travers l'appareil avec un débit qui doit être bien contrôlé afin d'avoir des analyses répétables.⁸⁶

La détection, après séparation par chromatographie, peut faire intervenir différents détecteurs selon les besoins, le type d'analyte et les objectifs. Le détecteur le plus fréquent est le détecteur à ionisation de flamme (FID), dont il sera question plus loin. La spectrométrie de masse, en tandem avec la chromatographie en phase gazeuse, est un mode de détection qui est aussi très utilisé en analyse de composés volatils.⁸⁶

5.2.1.2 Identification

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse est une méthode efficace pour identifier un grand nombre de métabolites volatils. Il est exigé pour fournir une identification fiable et robuste que l'identification soit faite en utilisant deux méthodes d'identification orthogonales.^{72, 87} Généralement, ces méthodes utilisent la chromatographie en phase gazeuse, couplée à un détecteur FID, TCD ou MS, pour

déterminer les indices de rétention associés aux composés, et la spectrométrie de masse pour obtenir de l'information spectrale permettant l'identification. Ces informations sont ensuite comparées à des standards ou à des bases de données formées à l'aide d'injection de standards.⁷² Ainsi, avec à la fois une identification sur la base de données chromatographiques avec les indices de rétention et une identification sur la base du patron de fragmentation obtenu par spectrométrie de masse, l'obligation de l'identification à l'aide de deux critères orthogonaux est respectée. Deux indices de rétention obtenus sur des colonnes de polarités différentes ne suffisent pas pour respecter cette norme.⁸⁷

Les bases de données

Les bases de données de spectrométrie de masse, qui peuvent aussi inclure des indices de rétention pour les entrées de composés, sont le nerf de la guerre lorsqu'il s'agit de l'identification de métabolites secondaires volatils, particulièrement lors de l'analyse de mélanges complexes comme les huiles essentielles ou les fractions volatiles de certains organismes. Elles permettent d'obtenir, directement à partir des données de spectrométrie de masse, des suggestions de composés ou de comparer les indices de rétention calculés à l'aide des temps de rétention obtenus en chromatographie en phase gazeuse avec ceux qui sont compilés.

Il existe plusieurs bases de données disponibles, gratuites ou payantes, avec des banques de composés plus ou moins grandes. La base de données de Wiley créée spécifiquement pour les composés volatils retrouvés dans les domaines des arômes et des fragrances, la FFNSC3 (*Flavour and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds*, 3^e édition), est une base de données compilant des données de spectrométrie de masse pour 3 462 structures différentes ainsi que les indices de rétention de l'ensemble de ces structures sur colonne apolaire avec des standards d'alcane et les indices de rétention de 1 466 de ces structures sur colonne polaire. Les données pour chacune des structures ont été obtenues dans des conditions contrôlées, sur un même appareil, avec des conditions d'analyse contrôlées et en injectant des standards purs et de qualité. Des informations comme le nom du composé, la structure, des synonymes, les indices de rétention (parfois sur différentes colonnes) et la masse moléculaire sont présentes dans la base de données. Il s'agit d'une base de données payante, mais très complète, bâtie de manière rigoureuse et spécialisée dans les arômes et les fragrances, ce qui en fait une base de données tout à fait adaptée aux huiles essentielles et aux fractions volatiles.⁹²

La base de données de R. P. Adams, (*Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*), est une autre source intéressante qui compile des données de spectrométrie de masse ainsi que les indices de rétention sur colonne apolaire de 2205 composés volatils retrouvés dans des huiles essentielles. Les données sont toutes obtenues par injection de standards sur un même appareil, avec un même type de colonne. Les indices de rétention de chaque composé sont rapportés

selon deux méthodes de calcul communes, dont il sera question plus loin, selon les données de chromatographie en phase gazeuse obtenues sur colonne apolaire. La base de données présente les temps de rétention ainsi que les indices de rétention sur colonne apolaire (DB-5MS), le nom commun, le numéro CAS, la formule moléculaire, la masse moléculaire, un nom chimique ou scientifique rapporté par le CAS, des synonymes, la source du standard utilisé pour l'analyse et des sources naturelles, en plus de présenter la structure et le spectre de masse. La version livre électronique est disponible gratuitement en ligne et permet d'avoir accès à beaucoup d'information, mais ne permet pas les comparaisons directes à l'aide d'outils informatiques à partir des données obtenues par GC-MS. La version en format informatique est payante, mais permet d'être utilisée pour la comparaison directe avec les données expérimentales.⁹³

La base de données de l'Institut national des normes et de la technologie (NIST) est une base de données d'informations de spectrométrie de masse qui recense des données de la littérature. Sa version 14 contenait 276 248 spectres de masse obtenus par GC-MS pour un total de 242 466 composés distincts. On y retrouve 82 868 composés pour lesquels des indices de rétention sont aussi rapportés, avec souvent des indices de rétention sur colonne apolaire et polaire. Cette base de données est payante également, mais elle est souvent présente avec les logiciels d'analyse de GC-MS.⁹⁴ Il s'agit de la base de données d'information spectrale pour les composés volatils la plus complète, mais étant donné qu'elle n'a pas été préparée uniquement à partir de données recueillies par l'injection de standards dans des conditions contrôlées, il faut être plus prudent avec son utilisation.

Il existe d'autres bases de données plus modestes, parfois gratuites, qui peuvent être utiles lorsque l'accès aux bases de données payantes est restreint. En supplément, il est possible de bâtir sa propre base de données, en compilant des informations obtenues expérimentalement en analysant des composés purs ou des standards. Il n'est pas possible de bâtir une base de données fiable avec des spectres de masse obtenus en injectant un mélange comme une huile essentielle, car il est impossible de garantir la pureté du spectre permettant une identification sans ambiguïté.⁸⁷

Identification par comparaison des spectres de masse

L'identification des métabolites secondaires volatils peut donc se faire à l'aide de la spectrométrie de masse, en tandem avec la chromatographie gazeuse. Le spectromètre de masse n'est pas le détecteur le plus sensible, mais il permet d'obtenir des informations sur la nature des composés qui éluent en chromatographie gazeuse.⁹¹ Les spectres de masse sont comparés avec les spectres de standards en possession du laboratoire ou par comparaison avec des bases de données bâties en injectant des standards ou des produits purs.⁸⁷ Lorsque l'accès à des standards purs n'est pas possible, comme lors de travaux sur des mélanges complexes comme les huiles essentielles, qui contiennent un grand nombre de métabolites différents, les bases de données

mentionnées ci-haut permettent d'avoir des informations spectrales sur les métabolites qui y sont rapportés et permettent d'identifier une vaste gamme de composés sans avoir soit même à purifier tous les composés ou à posséder tous les standards. Les logiciels de gestion de bases de données et d'analyse de données spectrale ne fonctionnent pas tous de la même façon, mais ils permettent d'obtenir des suggestions de composés qui possèdent un spectre de masse semblable à celui qui est obtenu expérimentalement, avec un calcul de la probabilité ou un pointage qui indique s'il s'agit d'une identification plausible ou pas.

Des paramètres standards sont nécessaires pour l'utilisation de bases de données pour la comparaison de spectres de masse. L'énergie des électrons pour l'ionisation par ionisation électronique (EI) doit être de 70 eV et le détecteur, le spectromètre de masse, doit posséder un filtre quadripolaire.⁹¹ Les données compilées dans les bases de données spectrales sont toutes obtenues en respectant ces deux critères et en les respectant également, il devient possible de faire des comparaisons des spectres de masse expérimentaux avec les spectres de masse des bases de données, même si les autres paramètres sont différents.

Pour des échantillons complexes, il peut être difficile d'identifier certains types de composés, car leurs caractéristiques physicochimiques sont très semblables, ce qui les rend difficiles à séparer en chromatographie et leurs spectres de masse peuvent être très semblables. C'est le cas, entre autres, de sesquiterpènes.⁸⁹

Identification par les indices de rétention

Comme mentionné plus haut, pour faire une identification fiable par GC-MS, il faut se baser sur deux critères orthogonaux (ou plus). Le premier critère peut être la spectrométrie de masse et le second peut être un indice de rétention. Sachant que le temps de rétention n'est pas une donnée utile parce qu'il varie beaucoup lorsque des paramètres sont différents (colonne différente, appareil différent, gradient différent, etc.), il est possible d'utiliser un indice de rétention pour l'identification de composés volatils. En utilisant des séries de standards injectés dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser, il est possible de calculer un indice de rétention, qui est une valeur calculée par rapport à deux standards avec des temps de rétention proches, un qui élue plus rapidement et un qui élue plus lentement qu'un analyte donné. La petite plage de temps entre l'élution de ces deux standards est considérée linéaire.⁹⁵ Il existe une formule qui permet de calculer ces indices lorsque l'analyse est isotherme (on parle alors d'indice de Kovats (KI), du nom de son développeur) et une seconde formule, plus utilisée, lorsqu'un gradient de température est utilisé pour la chromatographie (alors on parle d'indice de rétention linéaire (LRI)).⁹⁶ Ces formules sont présentées ci-dessous.

Équation 3. Calcul de l'indice de rétention Kovats, pour chromatographie isothermale.⁹⁵

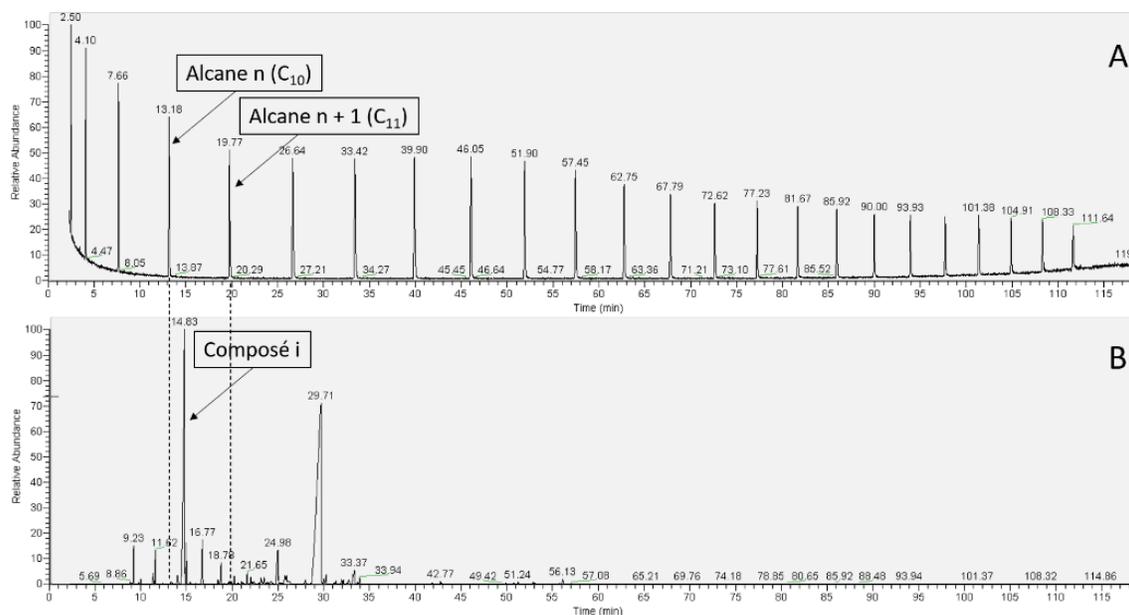
$$KI_i = 100(x) \left[n + \frac{\log(t_i - t_0) - \log(t_n - t_0)}{\log(t_{n+x} - t_0) - \log(t_n - t_0)} \right]$$

Équation 4. Calcul de l'indice de rétention linéaire pour chromatographie avec gradient de température programmé.⁹⁶

$$LRI_i = 100(x) \left[n + \frac{t_i - t_n}{t_{n+x} - t_n} \right]$$

Dans les équations ci-dessus, KI_i et LRI_i sont les indices de Kovats et de rétention linéaire, respectivement, pour le pic i , la variable n correspond au nombre d'atomes de carbone du standard qui précèdent l'analyte dans le chromatogramme, x correspond à la différence du nombre de carbones entre les standards n et $n+x$ et t représente les temps de rétention des différents pics utiles au calcul.⁹⁶

Des solutions de standards différentes sont parfois employées. La plus fréquente est sans contredit la séquence de n-alcanes (avec des étendues différentes des alcanes qui sont présents dans la solution de référence). Par exemple, la figure 14 montre un chromatogramme obtenu en injectant une solution de référence de standards n-alcanes contenant les alcanes C_7 à C_{30} . La plage entre deux pics de standards est donc réduite par rapport au chromatogramme complet et permet un calcul d'indice de rétention en considérant que cette petite plage permet une relation linéaire. En phase polaire, les séries de n-alcanes présentent davantage de fluctuations et il existe des séries de standards qui sont employées pour ces analyses comme les séries d'esters d'éthyle d'acides gras, FAEEs, et d'esters de méthyle d'acides gras, FAMEs.⁹⁷



A) Chromatogramme obtenu à la suite de l'analyse GC-MS d'une solution de standards n-alcanes $C_7 - C_{30}$; B) Chromatogramme d'un échantillon d'huile essentielle obtenu dans les mêmes conditions d'analyse que la solution de n-alcanes en A).

Figure 14. Détermination de l'indice de rétention d'un composé à partir d'une solution de standards n-alcanes $C_7 - C_{30}$.

Des critères de correspondance sont établis par les journaux qui publient des résultats d'identification par les indices de rétention. Par exemple, le *Flavours and Fragrances Journal* stipule qu'on doit avoir une différence de moins de 5 points de LRI sur colonne apolaire entre le résultat expérimental et un standard pour pouvoir considérer qu'il s'agit du même composé, et une différence de moins de 10 points de LRI sur colonne en phase polaire.⁸⁷ Pour la comparaison avec des bases de données ou avec d'autres laboratoires d'analyse, la différence acceptable est généralement de quelques points de LRI en phase apolaire et entre 10 et 50 points de LRI en phase polaire.⁹⁷

5.2.1.3 *Semi-quantification par GC-FID*

Le détecteur FID est considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques. L'intensité du signal est, à peu de choses près, sensible au débit massique de l'échantillon, c'est-à-dire à la concentration en masse.⁹¹ Les besoins en quantification étaient modestes jusqu'aux années 2000. Il était suffisant d'utiliser des méthodes classiques de quantification par GC-FID par exemple, l'importance étant plutôt la précision que l'exactitude. L'importance grandissante de la quantification pour vérifier la qualité, la sécurité et l'activité biologique d'un extrait, en lien avec l'intérêt croissant envers les huiles essentielles et leur importance économique qui augmente beaucoup a amené un développement des méthodes.⁷² Aujourd'hui, les besoins sont plus grands et il devient souvent nécessaire d'utiliser des méthodes plus rigoureuses de quantification, avec des courbes d'étalonnage et des étalons internes.⁸⁹ Les méthodes de quantification utilisées pour les huiles essentielles et les extraits volatils sont la détermination d'un pourcentage d'abondance relative, la détermination d'un pourcentage d'abondance relative normalisé par un étalon interne, la quantification absolue d'un ou plusieurs composés à l'aide d'étalons et courbe de calibration ou la quantification à l'aide d'une méthode validée.⁷²

Pour les analyses d'huiles essentielles ou de fractions volatiles qui ne concernent pas des échantillons destinés à la commercialisation ou à l'utilisation en industrie pour des propriétés particulières, il est toutefois accepté qu'une semi-quantification (détermination d'un pourcentage d'abondance relative, avec la somme des aires qui est égale à 1 et les pourcentages qui sont rapportés par rapport au total des aires) en GC-FID permet d'obtenir un portrait de la proportion relative des composés qui sont retrouvés dans l'échantillon. La semi-quantification est inexacte, mais elle est répétable. Elle est adéquate pour la comparaison d'échantillons provenant d'un même type de matrice, préparés et analysés dans les mêmes conditions expérimentales, mais peu fiable pour les comparaisons avec la littérature. La pratique est tout de même répandue, bien qu'à considérer avec précautions.⁹⁸ En GC-MS, les résultats de semi-quantification ne sont pas répétables et la détection par spectrométrie de masse n'est pas acceptée généralement pour la semi-quantification et la détermination des pourcentages d'aire.⁹⁸ La quantification par MS est appropriée avec l'utilisation de standards pour la quantification absolue, mais pas pour la détermination de pourcentage d'abondance relative, car sa

réponse est en abondance d'ions qui dépend de la structure et est liée à la masse des composés. Le détecteur FID est le plus largement utilisé puisqu'il est universel, très sensible et robuste, mais son facteur de réponse n'est pas toujours égal à 1, ce qui entraîne des biais.⁷²

Ainsi, la méthode de semi-quantification par détermination des pourcentages d'abondance relative consiste à intégrer chaque pic observé dans le chromatogramme d'un échantillon analysé par GC-FID et à calculer la proportion que chaque pic représente par rapport au total. Les indices de rétention permettent de rattacher les pics observés en GC-FID à ceux observés en GC-MS lors de l'identification des composés.

5.2.1.4 Caractérisation par RMN

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire est une technique de caractérisation très utilisée en analyse d'échantillons volatils, ou non volatils, puisqu'elle permet d'obtenir des informations menant à l'élucidation de la structure. Pour confirmer une identification faite par GC-MS, il peut être intéressant, lorsque c'est possible, de purifier les composés (par diverses méthodes chromatographiques comme la chromatographie sur colonne de gel de silice ou en chromatographie liquide haute performance (HPLC)) pour en faire une identification plus rigoureuse. La spectroscopie RMN permet d'obtenir des informations spectrales qui peuvent être comparées aux spectres RMN déjà rapportés pour le composé qui a été identifié par GC-MS afin de confirmer l'identification. La spectroscopie RMN permet d'obtenir des informations sur la structure comme le nombre de protons, de carbones, leur environnement chimique et leurs voisins. Il existe différentes techniques de spectroscopie RMN, à une dimension (1D) ou à deux dimensions (2D) qui permettent d'obtenir des informations complémentaires.

Chapitre 2. Investigation phytochimique d'huiles essentielles de *R. groenlandicum*, *R. subarcticum* et *M. gale* provenant d'écosystèmes nordiques

1 Objectifs spécifiques

- Récolter des végétaux dans des écosystèmes de la nordicité, au Nunavik;
- Préparer des huiles essentielles à partir de ces végétaux;
- Identifier les métabolites secondaires retrouvés dans ces huiles essentielles;
- Comparer la composition en métabolites secondaires de ces huiles essentielles avec les compositions déjà rapportées dans la littérature, pour les mêmes espèces en provenance d'autres régions, afin de déterminer si des métabolites peu communs sont présents ou si des chimiotypes différents sont observés;
- Évaluer des activités biologiques des huiles essentielles et de métabolites isolés;
- Mettre de l'avant la richesse des écosystèmes du nord;
- Valoriser les ressources végétales du Nunavik.

2 Présentation générale des plantes

Les végétaux qui ont été sélectionnés pour ce projet seront présentés dans cette section ainsi que les raisons qui ont orienté ces choix. Trois espèces sont concernées par les travaux d'investigation phytochimique qui ont été menés dans le cadre de ma maîtrise et ces trois végétaux sont des arbustes. Les arbustes sont des plantes ligneuses de différentes formes. Il existe de grands arbustes à plusieurs tiges, des arbustes nains érigés et des arbustes prostrés.¹²

2.1 *Rhododendron groenlandicum*

2.1.1 Classification et description botanique

Nom scientifique : *Rhododendron groenlandicum*
(Oeder) Kron & Judd

Autres noms scientifiques : *Ledum groenlandicum*
Oeder; *Ledum palustre* Linnaeus subsp.
Groenlandicum (Oeder) Hultén

Noms vernaculaires : Thé du Labrador, lédon du
Groenland⁹⁹



Figure 15. Plants de *Rhododendron groenlandicum* en fleurs.

Le *Rhododendron groenlandicum* (Oeder) Kron & Judd est aussi appelé par l'un ou l'autre des autres noms mentionnés plus haut, mais le genre *Ledum* a été inclus dans les *Rhododendron* au début des années 1990. Ces noms demeurent présents

dans la littérature, particulièrement dans les articles datant du XXe siècle. Il s'agit d'un arbuste à feuillage sempervirent de la famille des éricacées (*Ericaceae*) dont la taille peut aller jusqu'à 1 m. Il forme des branches peu ramifiées, à la verticale, avec des feuilles et des fleurs qui sont retrouvées en masse à l'extrémité des rameaux.⁹⁹ Cette espèce de thé du Labrador est retrouvée un peu partout en Amérique du Nord (à travers le Canada, l'Alaska et à certains endroits dans le nord des États-Unis) et au Groenland.¹⁰⁰

2.1.2 Utilisations traditionnelles

Le thé du Labrador, *R. groenlandicum*, est une des plantes médicinales de la forêt boréale les plus utilisées par les autochtones à travers le Canada. Les études en ethnobotanique ont donc mis en lumière plusieurs usages et traitements à partir de cet arbuste, sous différentes formes (infusion, poudre, décoction) à partir de différentes parties de la plante (plante complète, feuilles, branches et racines).⁴⁸ Au tableau 2 sont rassemblées les utilisations traditionnelles de cette plante médicinale par les différentes communautés autochtones de la forêt boréale canadienne.

Le *R. groenlandicum* est une des espèces qui peut être utilisée pour préparer du thé du Labrador, un breuvage, tout comme le *R. tomentosum* et le *R. neoglandulosum*. Il est également utilisé comme épice pour la viande, la soupe, les sauces, les salades, la bière, les gâteaux, etc. En tant qu'infusion, il est consommé depuis longtemps par plusieurs communautés autochtones nord-américaines comme les Inuits, les Cris et les

Tableau 2. Utilisations médicinales traditionnelles du *R. groenlandicum* par les communautés autochtones de la forêt boréale canadienne. (Adapté de Uprety et al., 2012)⁴⁸

Partie utilisée	Type d'utilisation	Mode de préparation			
		Infusion	Décoction	Poudre	Autre
Partie indéterminée	Usages variés:	Thé médicinal, diurétique, faciliter et accélérer les accouchements, renforcer l'estomac, favoriser la transpiration, breuvage énergétique,	Prévenir la perte de cheveux		
	Traitements:	Rhumes, saignements de nez, problèmes de reins, rhumatismes, soulager les maux de tête, abcès,	Pneumonies, toux, infections oculaires,	Gangrènes, contusions, excoriations, arthrite, douleurs musculaires	Douleurs buccales (bouillon),
Plante complète	Usages variés:		Désinfection des blessures et douleurs de la peau,		
	Traitements:	Rhumes, douleurs thoraciques, problèmes de voie urinaire			
Feuilles	Usages variés:	Diurétique, thé tonique, purifier le système, calmer la tension, médicament général, boisson tonique,	Diurétique		
	Traitements:	Douleurs d'estomac, diarrhée, frissons, mauvaise haleine, rhume, douleurs de dents (enfants), problèmes de rein, diabète, arthrite, douleur thoracique, maux de dos, maux de tête	Migraine, sensation de brûlures lors de l'urination, blessures, fièvre, arthrite	Éruptions cutanées (bébés), brûlures (mélangé)	Brûlures (bouillon, cataplasme, mélangé), eczéma (bouillon), blessures (maché), douleurs d'estomac (maché), diarrhée (maché), frissons (maché), mauvaise haleine (maché), maux de tête (râpé), démangeaisons (mélangé), peau gercé (mélangé), gale ombilicale (mélangé), rhume

(maché, jus), maux de gorge (marché, jus),
problème de cœur et de rein (eau florale)

Feuilles et petites branches	Usages variés:	Purification du sang, boisson tonique,		
	Traitements:	Frisson, rhume, maux de tête, douleur d'estomac, diarrhée, toux	Problèmes de voie urinaire, arthrite,	Problèmes de voie urinaire infantiles (séché et appliqué dans une serviette)
Racines	Usages variés:	Nettoyer l'estomac		
	Traitements:	Douleur thoracique	Rhume	

Athabaskans, non seulement pour ses vertus médicinales, mais aussi parce qu'il est agréable au goût. Il a d'ailleurs été adopté par les colons européens à leur arrivée en Amérique et est encore consommé aujourd'hui.¹⁰¹

2.1.3 Justification du choix

Le *R. groenlandicum* a été sélectionné parce que son huile essentielle est déjà connue et commercialisée, provenant de différents sites, entre autres au Québec.¹⁰² Il n'est pas toujours possible de connaître la provenance exacte de la matière première pour les sources commerciales, mais pour les analyses qui sont présentées dans la littérature, les populations de *R. groenlandicum* étudiées se situent à des latitudes plus basses que ce qui est considéré dans la zone de nordicité.¹⁰²⁻¹⁰⁵ L'étude d'huiles essentielles de *R. groenlandicum* nous permettait d'avoir de bons comparatifs et de mettre à l'essai nos méthodologies puisqu'il est connu que c'est une plante qui produit une quantité importante d'huile essentielle¹⁰³ et des compositions moléculaires ont déjà été rapportées dans quelques articles publiés¹⁰²⁻¹⁰⁵.

De plus, il s'agit d'un arbuste présent et abondant au Nunavik, entre autres dans la région de la station de recherche du Centre d'étude nordique de Whapmagoostui-Kuujuarapik,¹⁰ nous permettant d'avoir accès à une grande quantité de plants sur différents sites lors de nos travaux de terrain sans mettre en péril la ressource.

2.2 *Rhododendron subarcticum*

2.2.1 Classification et description botanique

Nom scientifique : *Rhododendron subarcticum*
Harmaja

Autres noms scientifiques : *Ledum decumbens* (Aiton)
Loddiges ex Steudel, *Ledum palustre* Linnaeus subsp.
decumbens (Aiton) Hultén, *Ledum palustre* var.
decumbens Aiton, *Rhododendron tomentosum* subsp.
subarcticum (Harmaja) G.G. Wallace

Noms vernaculaires: Petit thé du Labrador, lédon
subarctique.

La taxonomie de cette espèce appartenant au genre *Rhododendron* est complexe et les sources ne s'entendent pas toutes sur sa classification. De



Figure 16. Plants de *Rhododendron subarcticum*.⁹⁹

nombreux noms sont utilisés, parfois pour désigner une même espèce. Le *Rhododendron tomentosum* Harmaja est synonyme de *Rhododendron tomentosum* subsp. *subarcticum* (Harmaja) G.D. Wallace, de *Ledum palustre* L., de *Ledum decumbens* (Aiton) Loddiges ex Steudel, de *Ledum palustre* spp. *decumbens* (Aiton) Hultén et de *Ledum palustre* var. *decumbens* selon l'ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*).^{106, 107} Dans d'autres cas, le *Rhododendron subarcticum* (*Ledum decumbens*) est une espèce distincte de *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*).¹⁰⁸ Qu'il s'agisse de la même espèce, de sous-espèces ou d'espèces distinctes ne sera pas éclairci ici, le débat taxonomique n'est pas l'objet de ce mémoire. Puisque dans la littérature, les travaux portant sur la phytochimie de cet arbuste (ou de ces arbustes) utilisent des noms différents, le nom utilisé dans les articles cités sera précisé, mais les différents noms dont il a été question dans cette section seront pris en compte. À noter que le terme *Rhododendron subarcticum* n'est jamais retrouvé dans des articles traitant de sa phytochimie, à ma connaissance.

Le *R. subarcticum* Harmaja est un arbuste nain de 10 à 20 cm (parfois 30 cm) avec un feuillage sempervirent. Ses branches sont peu ramifiées, dressées ou prostrées, avec des amas de feuilles et de fleurs aux extrémités.⁹⁹ Le *R. tomentosum* Harmaja, considéré comme un synonyme de *R. subarcticum* Harmaja par la *Flora of North America*, est retrouvé au Canada, en Alaska, en Europe (incluant le Groenland) et en Asie.¹⁰⁷ Il peut être distingué du *Rhododendron groenlandicum* (Oeder) Kron & Judd, plante avec laquelle il partage parfois l'habitat, dans le nord de la forêt boréale, par sa taille plus petite et ses feuilles plus étroites et courbées de manière plus serrées.¹⁰⁹

2.2.2 Utilisations traditionnelles

Le petit thé du Labrador, *R. tomentosum* Harmaja, a été utilisé autour de planète par différentes cultures, depuis des siècles, voire des millénaires. Le tableau 3 montre un recensement des utilisations de l'arbuste par les communautés autochtones de la forêt boréale canadienne.⁴⁸ Son utilisation en Amérique du Nord, surtout par les communautés cris et inuits, était très répandue. Ces communautés autochtones l'ont consommé et le consomment toujours pour soigner les symptômes du rhume et de la grippe, la toux, les maux de gorge, la respiration superficielle, la tuberculose, les maux de tête, les maux de dents, les maux d'estomac, la cécité des neiges, les aphtes, la peau sèche, les problèmes d'yeux, la congestion nasale, la diarrhée, les abcès, les douleurs cardiaques, les douleurs thoraciques, les pertes de connaissances, les faiblesses, les enflures et les engourdissements.¹¹⁰ Son utilisation pour traiter le diabète est aussi rapportée.¹¹¹

En médecine traditionnelle, il a été utilisé ailleurs dans le monde par les peuples du Nord (en Europe et en Asie) pour traiter différents maux et maladies comme l'arthrose, les rhumatismes, la bronchite, les maladies de poumons, les piqûres d'insectes, des douleurs variées, des blessures, des démangeaisons, le rhume, la fièvre, la toux, les maux de gorge, la dyspepsie, la dysenterie, la diphtérie, les douleurs thoraciques, l'asthme,

l'eczéma, la gale, les hématomes, la teigne, la varicelle, la blépharite, les conjonctivites, la rhinite, la goutte, la lèpre, les engelures, la pression artérielle et le panaris.^{101, 112-114} Les feuilles ont été utilisées en médecine traditionnelle pour traiter les infections et les inflammations. Elles sont réputées avoir des effets diurétiques, diaphorétiques, abortifs, émétique, expectorant et narcotique.¹¹³

Le *Rhododendron tomentosum* Harmaja a aussi été utilisé comme chasse-moustiques, entre autres contre les punaises de lit.¹¹⁵⁻¹¹⁷ En Allemagne, il a aussi été employé dans la confection de bières pour la rendre plus intoxicante, avant d'être interdit en 1723.^{113, 118} Tout comme le *Rhododendron groenlandicum*, son utilisation comme thé, en infusion et comme tonique est très répandue.^{101, 110}

Tableau 3. Utilisations médicinales traditionnelles du *R. tomentosum* Harmaja* par les communautés autochtones de la forêt boréale canadienne. (Adapté de Uprety et al., 2012)⁴⁸

Partie utilisée	Type d'utilisation	Mode de préparation	
		Infusion	Décoction
Partie indéterminée	Usages variés:		
	Traitements:	Rhume	
Feuilles	Usages variés:		
	Traitements:		Problèmes d'estomac, maux de tête, diabète
Feuilles, branches et fleurs	Usages variés:	Bonne santé	
	Traitements:	Congestion nasale (avec la vapeur)	
Racines	Usages variés:		
	Traitements:	Douleurs thoraciques	

*Le nom scientifique utilisé dans l'article de référence est *Rhododendron tomentosum* Harmaja, avec comme synonyme *Ledum palustre* L. spp. *decumbens*, avec comme noms vernaculaires : petit thé du Labrador ou *northern Labrador tea* (anglais). Aucune entrée dans l'article ne fait mention de *Rhododendron subarcticum* Harmaja.

2.2.3 Justification du choix

Le petit thé du Labrador, *Rhododendron subarcticum* Harmaja, ne faisait initialement pas partie des plantes qu'il était prévu d'étudier dans le cadre de cette première phase de travaux sur les huiles essentielles de végétaux provenant du Nord du Québec. C'est en discutant avec des aînés cris du village de Whapmagoostui-Kuujuarapik que nous avons reçu cette suggestion, ces derniers affirmant que le petit thé du Labrador (*Rhododendron subarcticum* Harmaja) était davantage consommé et utilisé en médecine traditionnelle chez eux que le thé du Labrador (*Rhododendron groenlandicum*).

Après avoir fouillé la littérature, cette plante et son huile essentielle avaient déjà été investiguées, à plusieurs reprises, et provenant de différents endroits dans le monde (sous les différents noms susmentionnés), mais aucune étude de l'huile essentielle de spécimens d'Amérique du Nord (et aucune étude sous le nom de *R. subarcticum*) n'avait été rapportée.^{74, 112, 119-134} Cela en faisait donc un bon choix pour pouvoir étudier la chimie des huiles essentielles des plantes du nord du Québec.

2.3 *Myrica gale*

2.3.1 Classification et description botanique

Nom scientifique : *Myrica gale* Linnaeus

Autres noms scientifiques : *Myrica gale* var. *gale*, *Myrica gale* var. *subarctica* J. Rousseau, *Myrica gale* var. *subglabra* (A. Chevalier) Fernald, *Myrica gale* var. *tomentosa* C. de Candolle.

Noms vernaculaires: Myrique baumier, Bois-sent-bon.¹³⁵



Figure 17. Plants de *Myrica gale*.

Le *Myrica gale* est un arbuste du genre *Myrica* et de la famille des myricacées (*Myricaceae*). Il s'agit d'un arbuste qui peut atteindre jusqu'à 2 m, mais qui fait généralement 0,3 à 1,5 m. Ses branches sont très ramifiées et possèdent de nombreuses feuilles.¹³⁵ On le retrouve dans le nord de l'Amérique du Nord, au Canada (sans dépasser la limite des arbres) et dans le nord des États-Unis.¹³⁶ Ailleurs dans le monde, il est abondant en Europe, mais presque absent en Asie.¹³⁵ On le retrouve tout de même à quelques endroits en Sibérie.¹³⁷ Il pousse principalement dans les milieux humides, les tourbières et les zones marécageuses.¹³⁶

2.3.2 Utilisations traditionnelles

Le myrique baumier est un arbuste qui a été utilisé pour différentes raisons depuis des siècles, à travers l'hémisphère Nord.¹³⁸ Son odeur très forte en a évidemment fait une plante attirante pour les communautés qui la côtoyaient. Il a été utilisé comme épice, pour différents plats comme les soupes, les viandes et les ragoûts¹³⁹⁻¹⁴¹ et comme agent pour aromatiser la bière, en lieu du houblon, depuis au moins 2000 ans^{138, 139, 141}. Les feuilles ont aussi servi à parfumer les vêtements et ont été consommées en infusion^{141, 142}. Il a aussi la réputation d'être un bon chasse-moustique et insecticide. Ses feuilles et ses fruits ont servi à cet effet en Scandinavie et au

Royaume-Uni, entre autres sous la forme d'infusions.^{138, 142} Ses racines et son écorce sont aussi une source de colorant jaune qui a été utilisé pour la laine et les peaux.¹²²

Le *Myrica gale* a été employé pour traiter différents maux et maladies. Au tableau 4 sont présentées les utilisations qui ont été recensés selon des études en ethnobotanique dans les communautés de la forêt boréale canadienne.⁴⁸ À travers le monde, cet arbuste a aussi été utilisé pour améliorer l'activité gastrique et du cœur,^{141, 143} pour traiter des maladies de la peau et la dysenterie ou encore comme emménagogue et abortif.¹⁴¹

Tableau 4. Utilisations médicinales traditionnelles du *Myrica gale* L. par les communautés autochtones de la forêt boréale canadienne. (Adapté de Uprety et al., 2012)⁴⁸

Partie utilisée	Type d'utilisation	Mode de préparation		
		Infusion	Décoction	Autre
Partie indéterminée	Usages variés:			
	Traitements:	Démangeaisons, plaies, infections de la bouche, maux de gorge		Douleurs oculaires
Tiges, feuilles et fruits	Usages variés:			
	Traitements:		Tuberculose	

2.3.3 Justification du choix

Tout comme pour le *Rhododendron groenlandicum*, le *Myrica gale* a été sélectionné pour sa présence assez abondante dans certaines zones du Nunavik, dont à quelques endroits autour de Whapmagoostui-Kuujuarapik.¹³⁵ L'arbuste a aussi été largement utilisé traditionnellement par les communautés des régions où il pousse.¹³⁸ De plus, il a reçu l'attention de plusieurs études phytochimiques dont des études de son huile essentielle,^{125, 140, 142-151} ce qui permet d'avoir des comparatifs provenant de différents endroits dans le monde.

3 Revue de littérature sur les huiles essentielles et la phytochimie des arbustes à l'étude

3.1 Rôles biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont produites par les végétaux pour se défendre face à des facteurs externes, des stress. À titre de mélanges de métabolites secondaires, les huiles essentielles remplissent des rôles de défense et d'attraction. Elles peuvent contribuer à la défense vis-à-vis des herbivores, des insectes, des micro-organismes, des pathogènes ou des autres plantes, à attirer les pollinisateurs, à communiquer avec les plantes

environnantes pour signaler un danger ou à inhiber la germination de graines.^{45, 71} Elles permettent donc aux organismes de contrôler ou de réguler leur environnement. Elles ont souvent des rôles comme antifongique, insecticide ou dissuasif.⁷¹

3.2 Applications actuelles et potentielles d'huiles essentielles

Les métabolites volatils sont utilisés depuis longtemps, sous forme d'huile essentielle ou d'extraits, comme agent thérapeutique ou comme fragrance, dans les domaines de la parfumerie et des cosmétiques. Ils figurent parmi les molécules produites par les plantes qui ont le plus de valeurs, avec les alcaloïdes et les composés phénoliques.⁴⁵ Leur utilisation en cosmétique, en parfumerie ou en aromathérapie (usage thérapeutique comme des massages ou bains utilisant des huiles essentielles) est très répandue.⁷¹

Les huiles essentielles ne sont cependant pas utilisées uniquement pour leur odeur. Leur composition en métabolites secondaires peut leur conférer des activités biologiques et des propriétés intéressantes à différents égards. Parmi ces propriétés, on compte leur naturalité, le fait qu'elles soient biodégradables, qu'elles présentent généralement une toxicité faible pour les mammifères et leur capacité à remplir plusieurs rôles à la fois, grâce à leur composition moléculaire complexe. Elles sont utilisées, pour ces raisons, comme antioxydants et antimicrobiens dans l'industrie alimentaire.^{45, 79} Elles sont aussi parfois utilisées en chimiotaxonomie, pour identifier une espèce ou une sous-espèce par exemple, à partir de la composition moléculaire de son huile essentielle.^{152, 153, 154, 155} Des huiles essentielles peuvent être utilisées comme alternative efficace ou en complément de produits synthétiques dans plusieurs domaines comme dans l'industrie alimentaire, la cosmétique, la pharmaceutique.⁷¹ En chimie verte, elles peuvent représenter, comme d'autres substances naturelles végétales, des produits de départ intéressants en synthèse organique, comme alternative aux produits issus de l'industrie pétrolière, et même comme solvant naturel pour l'industrie alimentaire.⁷⁹ Les huiles essentielles peuvent présenter une foule d'activités biologiques en fonction de leur composition moléculaire et de la synergie entre les composés.¹⁵⁶

3.3 *Rhododendron groenlandicum* et son huile essentielle

3.3.1 Métabolites secondaires

Le *Rhododendron groenlandicum* n'a pas reçu une attention particulièrement importante de la part des phytochimistes, malgré son utilisation par le public et l'industrie sous la forme d'infusion, d'épice ou d'huile essentielle. Sa répartition géographique limitée est peut-être à l'origine de ce phénomène. Malgré tout, quelques projets de recherche ont porté sur la phytochimie de ce thé du Labrador et sur son huile essentielle.

Une investigation de la composition moléculaire de l'huile essentielle de *L. groenlandicum* a été faite avec des échantillons prélevés à différents moments dans la région de Chicoutimi, Québec, Canada. L'huile essentielle a été préparée par hydrodistillation ou par hydrodiffusion (mode d'entraînement à la vapeur impliquant une vapeur qui entre dans l'alambic par le haut)⁷⁰ et une grande variabilité en fonction du moment de la récolte a été notée. Le germacrone était largement majoritaire en début de saison, au printemps, en lien avec les bourgeons, mais son importance diminuait drastiquement dans les autres échantillons, à partir du mois de juillet. Les monoterpènes comme l' α -pinène et le sabinène devenaient plus importants en début d'été, en lien avec la floraison, le limonène était particulièrement important en période de floraison et était retrouvé en quantité importante dans l'huile essentielle des fleurs et des bourgeons, mais absent des feuilles et des tiges. Des monoterpénoïdes comme le terpinèn-4-ol et le myrtenal comptaient parmi les composés importants, de même que des sesquiterpènes comme l' α - et le β -sélinène. La variation observée parmi les échantillons de différents plants pourrait être en partie expliquée par la présence de chimiotypes différents, selon Belleau.¹⁰³

Un échantillon commercial d'huile essentielle préparé à partir de brindilles de *Ledum groenlandicum* en provenance de l'ouest de l'Abitibi, Québec, Canada, contenait principalement du sabinène, avec également des proportions importantes de terpinèn-4-ol et de β -sélinène. Très peu de germacrone a été observé. L'huile essentielle contenait majoritairement des monoterpènes (> 35 %), mais aussi beaucoup de monoterpénoïdes (> 26 %) et de sesquiterpènes et sesquiterpénoïdes (> 24 %). Poaty a aussi noté des similarités parmi les huiles essentielles de différents végétaux de la forêt boréale (sapin baumier (*Abies balsamea* (L.) Mill.), épinette noire (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.), épinette blanc (*Picea glauca* (Moench) Voss), mélèze laricin (*Larix laricina* (Du Roi) K. Koch), pin gris (*Pinus banksiana* Lamb.), thuya du Canada (*Thuja occidentalis* L.) et thé du Labrador (*Ledum groenlandicum* L.)). Ces espèces contenaient toutes beaucoup d' α -pinène, de β -pinène, de limonène et d'acétate de bornyle.¹⁰⁴

Des huiles essentielles préparées à partir de branches de *L. groenlandicum*, par distillation à la vapeur, contenaient majoritairement du limonène, avec des proportions importantes de germacrène D, de terpinèn-4-ol, de nérol et de *p*-cymène.¹⁰⁵

Dans une étude comparative entre différents échantillons commerciaux d'huile essentielle de *Ledum groenlandicum*, il a été observé une grande variabilité de la composition en métabolites secondaires. Les échantillons ont été préparés par hydrodiffusion des parties aériennes de plants de thé du Labrador provenant de différents endroits au Québec, Canada. Les composés majoritaires étaient, selon l'échantillon, le sabinène (0,1 – 35,0 %), le β -pinène (0,1 – 8,4 %), le limonène (0,3 – 67,2 %), le trans-*p*-mentha-1(7), 8-dièn-2-ol (0 – 7,0 %), le cis-*p*-mentha-1(7),8-dièn-2-ol (0 – 6,9 %), l'acétate de bornyle (0,3 – 8,4 %), le β -sélinène (2,3 – 34,5 %) et le (*E,E*)-germacrone (0 – 29,3 %). L'auteur souligne que les variations peuvent être dues à plusieurs facteurs,

de la partie de la plante distillée, à la préparation de l'huile essentielle, en passant par des facteurs géographiques et la saison de récolte.¹⁰²

3.3.2 Activités biologiques

Les utilisations variées rapportées en ethnobotanique et la consommation actuelle de produits provenant de *R. groenlandicum* suggèrent que la plante et ses métabolites secondaires doivent avoir des activités biologiques intéressantes. De plus, d'autres indices laissent présager que des métabolites bioactifs sont retrouvés dans cet arbuste comme le fait qu'il n'est pas consommé de façon significative par aucun herbivore d'après des analyses dans la région de Schefferville¹⁵⁷, ni par les insectes herbivores¹⁵⁸ ou par le lièvre d'Amérique en Ontario¹⁵⁹. Ces études suggèrent que la plante contient des métabolites de défense intéressants.

En étudiant les huiles essentielles de quelques espèces de la forêt boréale et leurs activités biologiques, Poaty et al (2015) ont observé une activité antibactérienne faible, une activité antifongique faible, mais une activité antioxydante significative (captage de radicaux libres de DPPH) ($IC_{50} = 24.5$ mg/ml), bien que plus faible que d'autres échantillons testés, une activité qui a été confirmée par une autre méthode (pouvoir de réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+}).¹⁰⁴

En étudiant les activités génotoxiques et antigénotoxiques de certaines huiles essentielles, dont celle de *L. groenlandicum*, il a été montré que l'huile essentielle de *L. groenlandicum* n'a pas d'effet mutagène, mais une activité antigénotoxique dans un test *wing spot* sur des drosophiles. Les auteurs suggèrent que cette activité implique l'activité de certains métabolites contre les CYP450.¹⁰⁵

À ces études s'ajoute un nombre très grand d'études portant sur des activités biologiques de métabolites secondaires purs qui peuvent être trouvés dans les extraits de *R. groenlandicum*. Ces études ne seront pas présentées ici, certaines seront mentionnées en discussion.

3.4 *Rhododendron subarcticum* et son huile essentielle

3.4.1 Métabolites et chimiotypes

Les études de la composition moléculaire de *Rhododendron subarcticum* (sous les différents noms énumérés dans la section de sa description et classification) sont relativement nombreuses. L'attention que cette plante a reçue de la part des phytochimistes et autres scientifiques à travers le monde surpasse celle qu'a reçue l'autre thé du Labrador en question dans ce mémoire. Son huile essentielle a été caractérisée pour des échantillons provenant de différents endroits dans le monde, comme en font foi les exemples ci-dessous.

De nombreux articles ont été publiés sur cet arbuste réputé pour son huile essentielle à travers le monde. Le lédol et le palustrol sont des métabolites considérés comme des composés importants de l'huile essentielle. Ils ont été nommés ainsi à la suite de leur isolement à partir de l'huile essentielle de *Ledum palustre* L. Ils ne sont cependant pas présents dans tous les échantillons d'huile essentielle de *L. palustre*.¹¹⁵ Ce chimiotype demeure malgré tout assez fréquent et ces deux sesquiterpénoïdes sont souvent les composés majoritaires d'huiles essentielles en Lituanie^{112, 126, 121, 160}, en Sibérie¹²⁷ et aux Pays-Bas¹³³. Les métabolites importants après les deux majoritaires varient cependant selon les échantillons, avec parfois du myrcène, de l'ascaridole, du cyclocolorenone ou du lépalol, entre autres.^{121, 160}

Un chimiotype contenant principalement du *p*-cymène et de l'ascaridole a été observé en Pologne, à la suite d'une hydrodistillation des feuilles et des tiges de *L. palustre*. La proportion d'ascaridole est rapportée, comme le font plusieurs auteurs, en additionnant les proportions de l'ascaridole et de l'isoascaridole (considéré comme un produit de désintégration thermique du premier, lors de l'analyse), pour un total de 35,3 %, alors que la proportion de *p*-cymène était de 25,5 %.¹²⁸ Sur l'île de Sakhalin, les principaux métabolites étaient aussi le *p*-cymène et l'ascaridole, avec une proportion importante de leurs précurseurs biosynthétiques, l' α - et le γ -terpinène. Il s'agit d'un chimiotype qui avait auparavant été rapporté au Japon¹²⁷ et en Chine (à partir de *Ledum palustre* var. *angustum* N. Bush)¹³⁴.

Dans une étude sur la possibilité d'utiliser la propagation *in vitro* pour faire pousser des plants de *R. tomentosum* et produire de l'huile essentielle, les plants obtenus en laboratoire produisaient aussi de l'huile essentielle, mais la composition était différente de celle des plantes mères d'origine sauvage puisque les conditions de croissance étaient différentes. Les auteurs proposent de mieux contrôler les paramètres de croissance pour de futures études. Les plantes mères, récoltées en Pologne pour cette étude, ont été soumises à une hydrodistillation. Les composés majoritaires étaient le γ -terpinéol, le palustrol et le lédol.¹²⁴

Un chimiotype avec comme métabolite secondaire principal le limonène a aussi été rapporté pour les huiles essentielles de *L. palustre* L., avec comme autres métabolites secondaires plusieurs dérivés biosynthétiques du limonène dont les isomères de *p*-mentha-1-(7)-8-diène-2-ol ou ceux du *p*-mentha-2,8-diène-1-ol.^{127, 131} Ce chimiotype a été observé en URSS (dans l'ouest de l'actuelle Russie)¹³¹ et en Sibérie¹²⁷.

Le myrcène est aussi parfois le métabolite majoritaire, avec des différences au niveau des autres métabolites importants de ces échantillons. Parfois, il est retrouvé avec du palustrol et du lédol, comme en URSS, dans l'actuelle Russie.¹³² Le sabinène a aussi été rapporté comme un métabolite secondaire qui peut être majoritaire dans certains échantillons. Cette observation a été faite en Russie dans des échantillons transbaïkaliens, alors que ce monoterpène était peu présent dans les autres échantillons provenant d'autres

sites en Sibérie, dans l'est de la Russie¹²⁷ et en Corée du Nord¹³⁰. Le cyclocolorenone était majoritaire dans l'huile essentielle de *L. palustre* provenant des environs du lac Baïkal.¹²⁷

Une grande variabilité est observée par plusieurs chercheurs en ce qui concerne la composition en métabolites secondaires de l'huile essentielle de *R. tomentosum*. À l'intérieur d'une zone assez limitée, 1,5 km de distance, avec les mêmes conditions climatiques, près du lac Šulnys dans l'est de la Lituanie, la quantité de palustrol au sein des trois échantillons était de 1,2 à 31,8 %, pour le lédol elle se situait entre 5,2 et 23,4 %, pour le *p*-cymène entre 6,2 et 20,3 % et pour l'ascaridole (somme de l'ascaridole et de l'isoascaridole) entre 16,7 et 24,1 %. Différents chimiotypes semblent être présents même au sein de cette zone très restreinte.⁷⁴ Une grande variabilité selon l'habitat¹²⁷, l'âge¹¹², le moment de la récolte¹²¹ et la partie utilisée¹²¹ est aussi soulignée.

Dans un effort de synthèse des informations sur les compositions moléculaires observées à travers le monde (nord de l'Europe, Russie Corée du Nord et nord de la Chine), Jesionek et al. ont compilé les résultats de 51 compositions moléculaires rapportées dans la littérature en plus de trois nouvelles compositions de leurs travaux pour définir des chimiotypes à l'aide d'analyses statistiques de type *agglomerative hierarchical clustering*. Les résultats concernant *Rhododendron tomentosum* ssp. *decumbens* ont cependant été ignorés en alléguant qu'il s'agit d'un autre taxon. Les chimiotypes ainsi définis, sur la base des métabolites majoritaires (≥ 20 %) sont présentés au tableau 5.¹²³

À noter qu'aucune étude sur les extraits ou l'huile essentielle de *R. tomentosum* (ou autres noms qui peuvent être des synonymes tels que mentionnés plus haut) ne porte sur des populations du Canada ou même de l'Amérique du Nord.

Tableau 5. Description des chimiotypes recensés pour l'huile essentielle de *R. tomentosum* (*Ledum palustre*).¹²³

Chimiotype	Composés majoritaires		
I	γ -Terpinéol		
II	Lédol	Palustrol	
III	β -Myrcène	Palustrol	
IV	β -Myrcène	<i>p</i> -Cymène	Palustrol
V	Sabinène		
VI	<i>p</i> -Cymène		
VII	<i>p</i> -Cymène	Ascaridole	
VIII	<i>p</i> -Cymène	Acétate de bornyle	
IX	Limonène		
X	α -Thujenal		

3.4.2 Activités biologiques

Les informations historiques et ethnobotaniques, impliquant des utilisations traditionnelles variées, laissent croire que l'arbuste *R. tomentosum* Harmaja pourrait contenir des métabolites secondaires bioactifs intéressants. Quelques études ont porté sur différentes activités de ses extraits, dont son huile essentielle. Il est important de noter que, comme vu précédemment, la composition moléculaire est très variable, ce qui peut forcément avoir un effet important sur l'activité et la toxicité.¹²³

L'activité anti-inflammatoire (effet sur des œdèmes) a été évaluée. L'huile essentielle préparée par hydrodistillation et l'huile volatile obtenue par extraction par fluide supercritique ont eu une activité anti-inflammatoire intéressante, ce dernier extrait surpassait même l'effet des médicaments non-stéroïdiens utilisés comme références. L'effet peut être dû à la présence du palustrol ou du lédol, les composés majoritaires de ces extraits.¹²⁶

L'activité antioxydante, par captage des radicaux libres (DPPH et ABTS+), était aussi intéressante, mais celle-ci varie selon le moment de la récolte et la composition moléculaire de l'huile essentielle.¹²¹ Une huile essentielle riche en sabinène a démontré une forte activité antioxydante dans plusieurs tests différents de captage de radicaux (DPPH, superoxyde, hydroxyle, peroxydation de lipides), une activité qui semble liée à une forte synergie entre différents métabolites contenus dans l'huile essentielle.¹³⁰

Une activité antifongique contre *Candida parapsilosis* a été rapportée pour des extraits d'huile essentielle de *R. tomentosum* provenant de Lituanie,¹²¹ et un effet antimicrobien modéré a été observé sur *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium perfringens* et *Candida albicans*.¹³⁰

Un effet d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T humains et un effet proapoptotique sur ces mêmes lymphocytes a été observé en Pologne, avec des échantillons d'huile essentielle. *R. tomentosum* pourrait être une source intéressante de médicaments contre l'arthrite.¹²³

La cytotoxicité est évidemment un élément important à bien comprendre avant d'utiliser des extraits comme ceux de *R. tomentosum*. La toxicité de l'huile essentielle riche en palustrol et en lédol sur des artémies (petits crustacés) a été évaluée et les LC₅₀ (11,23 – 20,50 µg/ml) montrent qu'elle est considérable. La toxicité a été variable et ne dépendait pas seulement des composés majoritaires, mais vraisemblablement aussi de métabolites secondaires moins importants en concentration.¹²¹ D'autre part, une cytotoxicité faible vis-à-vis des kératinocytes et fibroblastes humains a été observée pour l'huile essentielle du chimiotype ascaridole/p-cymène.¹²⁸

Plusieurs études ont porté sur les effets répulsifs pour les insectes et insecticides des extraits de *R. tomentosum* et son huile essentielle puisqu'il est connu, par l'ethnobotanique, que la plante a la réputation d'être efficace pour ces usages. Les extraits méthanol, acétate d'éthyle et hexanes ainsi que l'huile essentielle ont un effet pour réduire le nombre de piqûres d'insectes et le nombre de moustiques qui se posent sur les sujets sur le terrain, en Suède. Les métabolites volatils majoritaires étaient le *p*-cymène, le sabinène et l'acétate de terpinyle.¹²⁵ Toujours en Suède, mais cette fois avec le palustrol et le myrcène comme métabolites principaux, l'extrait volatil obtenu par entraînement à la vapeur des feuilles de *R. tomentosum* a eu un effet répulsif vis-à-vis des nymphes d'*Ixodes ricinus* (une tique) de 95% avec un mélange à 10 % d'extrait volatil dans l'acétone, un résultat comparable à un produit commercial à 19 % de DEET.¹⁶¹ L'huile essentielle de *R. tomentosum*, riche en ascaridole et en *p*-cymène, s'est avérée efficace comme insecticide contre *Culex quinquefasciatus*, *Spodoptera littoralis* et *Musca domestica*, modérément efficace contre *Daphnia magna* et inefficace contre *Eisenia fetida*.¹²⁸

3.5 *Myrica gale* et son huile essentielle

3.5.1 Métabolites et chimiotypes

Déjà en 1911, une étude de la composition moléculaire a permis d'obtenir des informations sur les métabolites qui sont présents dans l'huile essentielle de *M. gale*. Le cinéole a été identifié et des indices sur la nature d'autres composés isolés ont été obtenus.¹⁴⁷

Depuis, de nombreuses études en phytochimie ou d'autres domaines des sciences des métabolites secondaires ont eu le myrique baumier comme sujet. La variabilité de la composition moléculaire de l'huile essentielle a rapidement été mise en évidence. Des comparaisons des compositions en métabolites secondaires publiées par différents auteurs ont été faites à quelques reprises pour compiler les informations déjà connues.^{142, 144, 162} Ces comparaisons permettent de remarquer que la nature et la proportion des métabolites qui sont retrouvés dans les extraits volatils et les huiles essentielles varient selon plusieurs paramètres comme la géographie¹⁶², la période de récolte^{142, 144}, la partie de la plante qui est utilisée^{140, 151} et même entre des échantillons récoltés dans les mêmes conditions^{144, 145}.

Quelques études ont été effectuées sur des plants provenant de l'Amérique du Nord. L'huile essentielle de feuilles de *M. gale* de la région de Grondines, Québec, Canada, contenait comme métabolites majoritaires le germacrone (seule observation comme majoritaire en Amérique du Nord), le myrcène et le germacrène B. Le myrcène semble souvent être le métabolite secondaire majoritaire en Amérique du Nord, ou le deuxième en importance, alors qu'en Europe, il s'agit plutôt, en général, de l' α -pinène.¹⁶² Une analyse de différentes huiles essentielles de membres de la famille des myricacées provenant des États-Unis a été faite pour apporter des

informations supplémentaires et contribuer à la chimiotaxonomie. Les myricacées sont caractérisées par leur feuillage aromatique, comme le représentant *M. gale*. Le myrcène et le limonène sont les métabolites secondaires observés pour *M. gale*. Des différences importantes ont été observées entre les espèces de myricacées.¹⁵² La variabilité au niveau de la composition moléculaire de l'huile essentielle de *Myrica gale* a été observée au sein d'une population de l'Ontario, Canada. Avec trois échantillons, des différences importantes entre les composés majoritaires ont été notées. L' α -pinène (3,0 – 17,8 %), le myrcène (6,4 – 29,1 %), le limonène (10,0 – 14,6 %) et les δ - et γ -cadinène ensemble (0,3 – 12,9 %) étaient les métabolites majoritaires, avec le selin-11- ϵ -4-ol (0,0 – 14,6 %), observé dans un seul échantillon.¹⁴⁵ Au Québec, l'huile essentielle de feuilles de *M. gale* provenant de la région du Saguenay a été analysée. Il a été démontré que les métabolites récoltés dans les 30 premières minutes d'une hydrodistillation diffèrent de ceux récoltés dans les 30 minutes suivantes. Des métabolites plus volumineux comme les sesquiterpènes et sesquiterpénoïdes sont davantage représentés dans la fraction de 30-60 min. Les métabolites majoritaires de cette huile essentielle provenant du Québec étaient le myrcène, le β -caryophyllène, l'oxyde de caryophyllène et le limonène.¹⁴⁹ Dans une autre étude, les composés majoritaires étaient cette fois le myrcène, le β -carophyllène et un épimère de l'eudesm-11- ϵ -4-ol.¹⁵⁰

En Europe, des échantillons d'huile essentielle de feuilles de *M. gale* ont été analysés en provenance de différents endroits comme l'Écosse (métabolites majoritaires : germacrone, β -élémenone, p-cymène et 1,8-cinéole)^{144, 163}, la Suède (métabolites majoritaires : α -pinène, α -phellandrène, myrcène et limonène)¹⁶¹, la France (métabolites majoritaires : germacrone, α -pinène, limonène et α -phellandrène)¹⁴⁰, la Finlande (métabolites majoritaires : α -pinène, limonène et β -cadinène)¹⁴² et la Pologne (métabolites majoritaires : α -pinène, le p-cymène, le limonène et le selina-4(15),7(11)-diène)¹⁵¹.

Au Japon, une comparaison entre les huiles essentielles de feuilles de *Myrica gale* var. *tomentosa* cultivé et des échantillons sauvages a montré des différences principalement au niveau des proportions des métabolites. Les métabolites principaux étaient le cinéole (7,73 – 15,95 %), le limonène (9,81 – 10,96 %), le cymène (10,6 – 13,12 %), le selina-3,7(11)-diène (11,0 – 3,73 %) et le β -élémenone (13,27 – 16,12 %) avec les pourcentages indiqués pour les échantillons sauvages et cultivés respectivement.¹⁴⁶

3.5.2 Activités biologiques

Le myrique baumier, *Myrica gale* L., est un autre arbuste qui a été utilisé traditionnellement par différentes cultures à travers le monde, à différentes fins. Plusieurs chercheurs se sont penchés sur des activités biologiques de ses extraits et de son huile essentielle.

Son utilisation comme répulsif pour les insectes et comme insecticide a déjà été notée en ethnobotanique. Selon des études faites en Suède, des extraits et une huile essentielle contenant

majoritairement du 1,8-cinéole, de l' α -terpinéol, du 4-terpinéol et du thujenol ont montré une activité modérée comme répulsif contre *Ixodes ricinus* Linnaeus, une tique.¹²⁵ Toujours en Suède, l'activité chasse-moustique sur le terrain a été mise à l'épreuve et les extraits méthanol et hexanes, ainsi que l'huile essentielle contenant majoritairement de l' α -pinène, de l' α -phellandrène, du myrcène et du limonène, à 1 % dans l'acétone se sont avérés efficace pour repousser les insectes.¹⁶¹

L'activité antifongique et antimicrobienne importante contre plusieurs espèces de fungi de l'huile essentielle de feuilles de *M. gale* provenant d'Écosse (métabolites majoritaires : α -pinène, 1,8-cinéole et germacrone) a été rapportée.¹⁶³ L'huile essentielle des fruits, riches en α -pinène, 1,8-cinéole et germacrone a aussi eu un effet antifongique intéressant contre *Paecilomyces variotii*, *Byssochlamys fulva*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium corylophilum* et *Aspergillus flavus*, particulièrement à partir de 500 ppm et surtout contre *Cladosporium cladosporioides*.¹⁴⁰ L'activité antimicrobienne contre *Bacillus subtilis* pour des huiles essentielles contenant du cinéole (7,73 – 15,95 %), du limonène (9,81 – 10,96 %), du cymène (10,6 – 13,12 %), du sélina-3,7(11)-diène (11,0 – 3,73 %) et du β -élémenone (13,27 – 16,12 %) a aussi été rapporté au Japon.¹⁴⁶ Des huiles essentielles de feuilles et de fleurs de *M. gale* (riches en α -pinène, *p*-cymène, limonène et selina-4(15),7(11)-diène) ont eu une activité antimicrobienne modérée contre les fungi *Candida albicans* et *Candida glabrata*, les bactéries Gram-positive *Staphylococcus aureus* et *Escherichia faecalis* ainsi que contre la bactérie Gram-négative *Escherichia coli*, mais pas contre *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁵¹

L'activité antioxydante de l'huile essentielle pour capter les radicaux libres hydroxyle et superoxyde et pour inhiber la peroxydation des lipides a été faible pour des huiles essentielles contenant surtout du cinéole, du limonène, du cymène, du sélina-3,7(11)-diène et du β -élémenone.¹⁴⁶

L'huile essentielle de *M. gale* provenant de la région du Saguenay-Lac-Saint-Jean, Québec, Canada, a démontré une activité anticancer intéressante contre les lignées de cellules cancéreuses DLD-1 et A-549, observée en particulier pour la fraction obtenue par hydrodistillation de feuilles de *M. gale* entre 30 et 60 minutes, une fraction riche en sesquiterpènes et sesquiterpénoïdes.¹⁴⁹

4 Partie expérimentale

La méthodologie générale de caractérisation d'une huile essentielle a été présentée au chapitre 1. Le schéma 1 illustre le processus général qui est impliqué, de la récolte à l'identification.

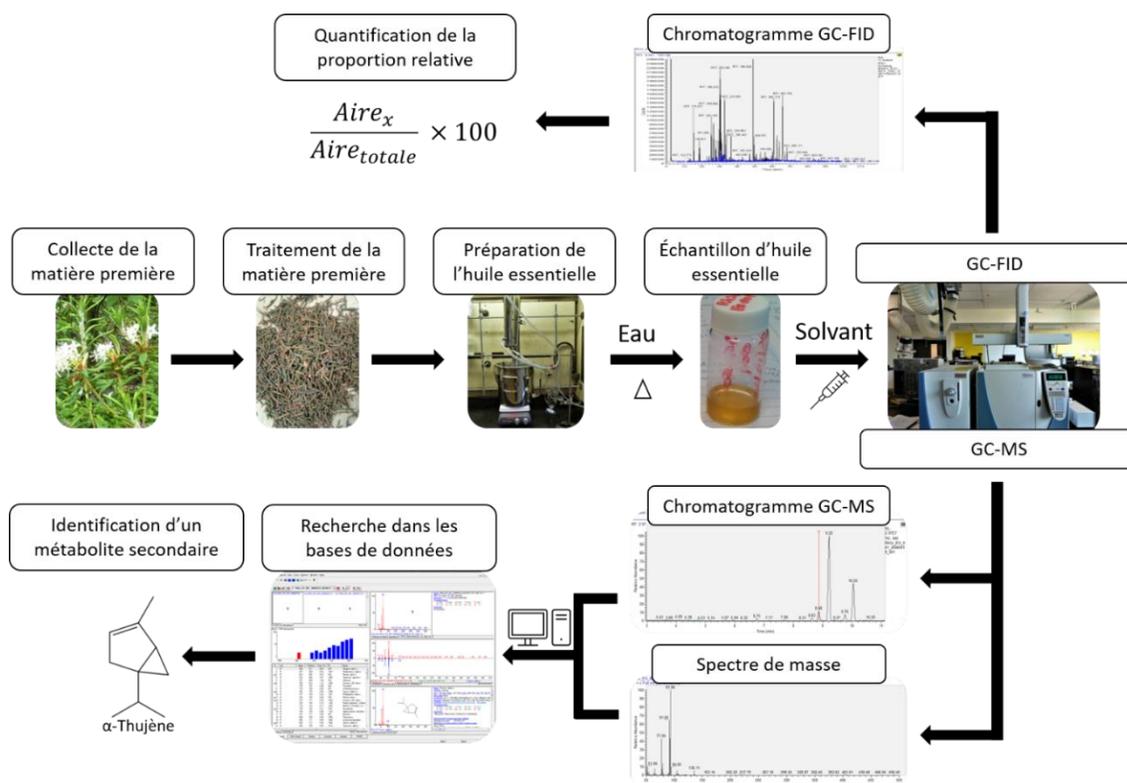


Schéma 1. Méthodologie générale de caractérisation d'une huile essentielle.

4.1 Solvants, réactifs et standards

Pour la préparation des extraits, l'eau utilisée pour la distillation est de l'eau courante, prise du robinet du laboratoire à Whapmagoostui-Kuujuarapik ou de l'Université Laval. Les solvants purifiés pour la préparation d'échantillons, les extractions et la chromatographie sur colonne (éther diéthylique et dichlorométhane) ont été traités à l'aide d'un appareillage de purification de solvants organiques communs anhydres et inertes de la compagnie *Vacuum Atmospheres Compagny* (VAC) de modèle *Solvent Purification System*. L'hexanes et l'acétate d'éthyle utilisés pour la chromatographie sur colonne proviennent de Fisher Chemical et sont de qualité ACS. La silice utilisée pour la chromatographie sur colonne est de la SiliaFlash P60 (Silicycle). Les standards utilisés pour la détermination des indices de rétention ont été achetés chez Millipore Sigma (C7 – C30 *Saturated alkanes* (49451-U), C4 – C24 *Even Carbon Saturated FAMES* (49453-U), C4 – C24 *Even Carbon Saturated*

FAEEs (49454-U)). Les gaz utilisés pour les analyses GC-MS et GC-FID étaient de l'air comprimé grade médical (Praxair), de l'hydrogène PP 4,5 (Praxair), de l'hélium Ultra High Purity 5,0 (Praxair) et de l'azote HP 4,8 (Praxair). Tous les réactifs utilisés pour les tests d'activité biologique proviennent de Millipore Sigma, sauf pour ceux dont la provenance est mentionnée dans la section sur ces tests, plus bas. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) utilisé pour la préparation des échantillons provient de Fisher Chemical et est de grade HPLC.

4.2 Matière végétale

Les feuilles de *Rhododendron groenlandicum* et de *Myrica gale* ont été récoltées sur des sites aux alentours des villages de Whapmagoostui-Kuujuarapik. L'identification des plantes a été faite avec la collaboration du professeur Stéphane Boudreau du département de biologie de l'Université Laval. Trois échantillons de feuilles ont été amassés pour *R. groenlandicum* et *M. gale* au mois de juillet 2019. Un échantillon de *Rhododendron subarcticum* a été récolté par l'équipe du professeur Stéphane Boudreau au mois d'août 2019, près de la rivière Boniface, au Nunavik. La récolte de chaque échantillon s'est faite sur plusieurs plants différents, de manière aléatoire, sur une superficie limitée présentant des caractéristiques (géographie, type de végétation, densité du couvert végétatif, etc.) assez uniformes. Les détails sur la récolte sont présentés au tableau 6 et les numéros de site correspondent à ce qui est indiqué sur la figure 18. Seules les feuilles, dans le cas de *R. groenlandicum* et *M. gale*, ou la partie aérienne, dans le cas de *R. subarcticum*, ont été récoltées en respectant les bonnes pratiques de récolte pour éviter d'endommager les plants et de récolter trop de feuilles sur un plant. Seules quelques feuilles par plant ont donc été prélevées, en limitant le nombre de feuilles par branche et seulement sur des sites de récolte où l'espèce était abondante et la récolte était acceptée.

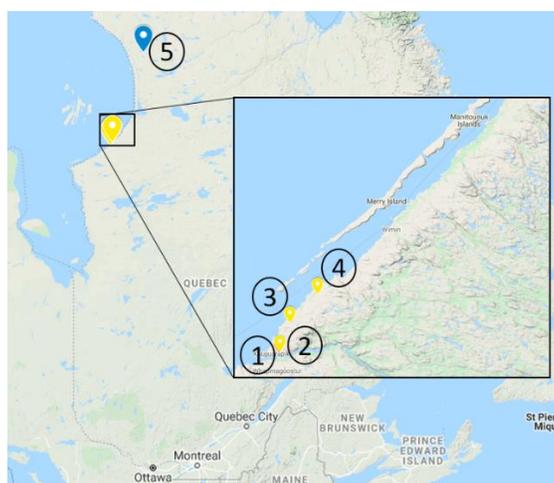
Les échantillons ainsi récoltés ont été conservés frais, dans des sacs en plastique refermables. Les échantillons de feuilles de *R. groenlandicum* et de *M. gale* ont été triés afin de retirer la matière qui ne correspondait pas à des feuilles de l'espèce végétale étudiée ainsi que toutes sortes de contaminants (branches, terre, insectes, etc). L'échantillon RhGr 001 a également été rincé à l'eau afin de retirer la poussière et autres particules qui étaient présentes sur les feuilles, une pratique qui a par la suite été abandonnée afin d'éviter d'endommager la matière végétale avec des manipulations supplémentaires. Les feuilles ont ensuite été mises au réfrigérateur, à environ 4 °C, jusqu'à leur distillation, faite à l'intérieur de 48 h dans tous les cas.

Dans le cas de l'échantillon de *R. subarcticum*, il a été conservé au frais pendant son transport du site d'échantillonnage jusqu'au laboratoire à l'Université Laval puis a été congelé. Avant son utilisation, l'échantillon a été dégelé pour procéder au tri de la matière afin d'en retirer les contaminants, c'est-à-dire la matière qui ne correspondait pas à des feuilles de *R. subarcticum*.

La région de la Grande rivière de la Baleine, où se trouvent les sites # 1, 2, 3 et 4 (figure 18), se situe autour des communautés de Whapmagoostui (cri) et de Kuujjuarapik (inuit), au Nunavik. Elle se trouve dans la zone de végétation de toundra forestière, dans la sous-zone forestière. Elle est située sur le littoral est de la Baie d'Hudson. Sa flore est de type subarctique et on y recense 400 espèces végétales.¹⁰ Les quatre sites présentent un couvert végétal et des caractéristiques différentes comme il est possible de le voir sur la figure 19.

Tableau 6. Description de la provenance et de la matière végétale récoltée pour les échantillons de *R. groenlandicum*, *R. subarcticum* et *M. gale*.

ID échantillon	Espèce	Partie	Coordonnées du site	# du site	Masse fraîche (g)
RhGr 001	<i>R. groenlandicum</i>	Feuilles	N 55°19'01,9" O 77°43'00,3" (alt. 29 m)	3	1289,16
RhGr 002	<i>R. groenlandicum</i>	Feuilles	N 55°16'37,4" O 77°44'33,1" (alt. ND)	2	732,31
RhGr 003	<i>R. groenlandicum</i>	Feuilles	N 55°21'28,9" O 77°38'55,9" (alt. 14 m)	4	864,17
RhSu 001	<i>R. subarcticum</i>	Feuilles	N 57°45'03" O 76°10'24" (alt. ND)	5	467,78
MyGa 001	<i>M. gale</i>	Feuilles	N 55°16'28,7" O 77°44'36,2" (alt. 26 m)	1	1503,05
MyGa 002	<i>M. gale</i>	Feuilles	N 55°16'28,7" O 77°44'36,2" (alt. 26 m)	1	1309,82
MyGa 003	<i>M. gale</i>	Feuilles	N 55°16'28,7" O 77°44'36,2" (alt. 26 m)	1	1378,93



(Google map. 2020, maps.google.com.)¹⁶⁴

Figure 18. Sites de récolte des échantillons végétaux de *R. groenlandicum*, *R. subarcticum*, *M. gale* et *B. glandulosa*.

La région de la rivière Boniface, où est situé le site #5 (figure 18), au Nunavik, se situe à la limite nord de l'écotone forêt-toundra, dans le Québec subarctique, à 35 km à l'est de la baie d'Hudson et à environ 10 km au sud de la limite des arbres du Québec subarctique. L'épinette noire est l'espèce d'arbre la plus abondante alors que le bouleau glanduleux est l'arbuste le plus abondant. Le couvert végétal de la région est dominé par une toundra d'arbustes et de lichens, mais on y retrouve aussi différents types de peuplements comme des peuplements forestiers.⁵



Les numéros de sites correspondent à la numérotation sur la figure 18.

Figure 19. Photos montrant le couvert de végétation des sites de récoltes dans la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.

4.3 Préparation des huiles essentielles

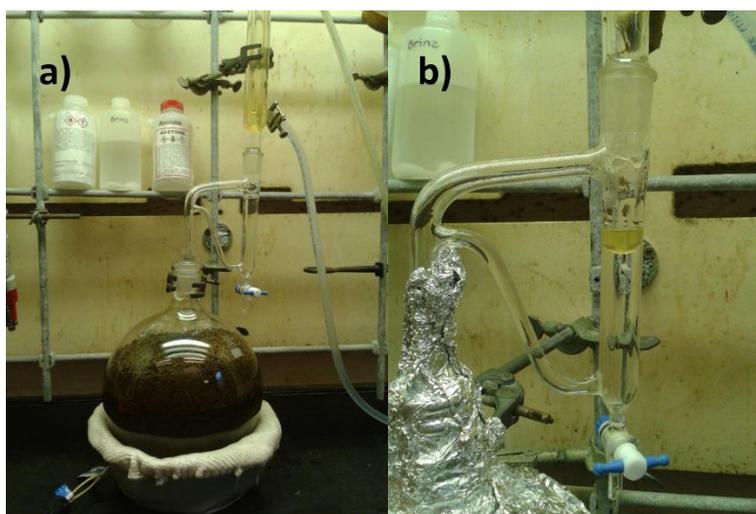
Un échantillon d'huile essentielle a été préparé pour chaque échantillon végétal. Les masses de matière végétale utilisées sont présentées au tableau 6. Les feuilles fraîches ont été utilisées pour la distillation, mais la masse sèche a été déterminée selon la méthode décrite au chapitre 1. Les masses sèches sont présentées au tableau 7. Les huiles essentielles de *R. groenlandicum* et *M. gale* ont été préparées par entraînement à la vapeur durant 3 h, à l'aide de l'extracteur présenté à la figure 20 alors que l'huile essentielle de *R. subarcticum* a été préparée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger tel que présenté à la figure 21.

L'extracteur présenté à la figure 20 a été conçu au laboratoire pour répondre à nos besoins spécifiques. Il a été fabriqué avec l'aide de M. Sébastien Blanchet et de M. Christian Côté du département de chimie de l'Université Laval et a été conçu pour être portatif, sans risques de bris, pour permettre à la fois l'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur, pour pouvoir pratiquer des distillations à moyenne échelle (jusqu'à 10 litres de matière végétale), pour permettre la cohobation et pour que l'huile essentielle soit facile à récupérer par des procédés physiques dans un séparateur. Il s'agit d'un extracteur en acier inoxydable de grade alimentaire avec un séparateur en verre.

Les huiles essentielles ont été récupérées à l'aide de pipettes Pasteur après la distillation. Dans le cas des échantillons d'huile essentielle de *Myrica gale*, ils ont ensuite été extraits par extraction liquide-liquide à l'éther afin de retirer les gouttes d'eau qui avaient été pipetées avec l'huile essentielle.



Figure 20. Alambic portatif conçu dans le cadre de ce projet d'investigation d'huiles essentielles.



a) Montage complet d'hydrodistillation utilisé pour la préparation de l'huile essentielle de *R. subarcticum*; b) Appareil de type Clevenger pour la séparation de l'huile essentielle, la cohobation et la récupération de l'huile essentielle.

Figure 21. Montage d'hydrodistillation avec appareil de type Clevenger.

Après l'extraction, les échantillons d'huile essentielle ont été mis dans des flacons à scintillation, les bouchons ont été scellés à l'aide de parafilm, les flacons ont été conservés au réfrigérateur, à 4 °C, et sortis seulement pour les analyses. Les flacons ne sont pas ambrés, mais les échantillons étant entreposés dans un réfrigérateur, dans une boîte de carton sans couvercle, ils ont été conservés dans le noir à l'exception de quelques ouvertures de la porte.

4.4 Caractérisation des huiles essentielles

Les échantillons d'huile essentielle ont été dilués à 10 % en masse dans du dichlorométhane purifié pour les analyses GC. L'analyse qualitative a été faite à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Trace GC Ultra (Thermo Scientifique) couplé à un spectromètre de masse DSQ II (Thermo Scientifique). Les injections ont été faites à l'aide d'un échantillonneur automatique Triplus (Thermo Scientifique). Pour les analyses en phase apolaire, la colonne était une DB-5MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 μm) (Agilent Technologies). Le volume d'injection était de 1,0 μl . La température du port d'injection était de 200 °C, le four a été réglé initialement à 50 °C pour 5 min, suivi d'une augmentation jusqu'à 270 °C à 2 °C/min, puis à 270 °C pour 5 min. Le débit de gaz porteur était de 1,0 ml/min, en mode débit constant. L'injection s'est faite en mode *split*, avec un *split* de 10. La température de la source était de 200 °C, avec une gamme de masses de 50 – 500 Da. La détection s'est faite en mode positif, en ionisation électronique (EI) avec une énergie d'ionisation de 70 eV. Pour les analyses en phase polaire, l'appareil était le même, avec une colonne HP-INNOWAX (30 m X 0,25 mm X 0,25 μm) (Agilent Technologies). Les paramètres étaient les mêmes qu'en phase apolaire sauf pour le *split* utilisé pour les échantillons RhGr et MyGa (*split* = 100) et le gradient : 50 °C pour 5 min, jusqu'à 250 °C à 2 °C/min et 250 °C pendant 5 min. L'identification des métabolites s'est faite, d'une part, à l'aide des indices de rétention calculés à l'aide d'une série de standards n-alcanes (C₇-C₃₀) pour les analyses en phase apolaire et à l'aide des séries de standards n-alcanes (C₇-C₃₀), FAMEs (C₄-C₂₄) et FAEEs (C₄-C₂₄) pour les analyses en phase polaire ainsi qu'à l'aide des spectres de masse en comparant les indices de rétention et les spectres de masse avec les bases de données FFNSC3 (*Flavours and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds 3rd edition*, Wiley)⁹², NIST14 (NIST/EPA/NIH *Mass Spectral Library*)⁹⁴ et la base de données en format livre électronique de Robert P. Adams (*Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*)⁹³ ainsi que par comparaison avec des données tirées de la littérature. Les analyses par spectrométrie RMN ont été faites sur un spectromètre RMN 500 MHz DD2 (Agilent Technologies), dans le CDCl₃. Les déplacements chimiques (δ) sont rapportés en ppm en fonction du signal résiduel du CDCl₃ ($\delta_{\text{H}} = 7,26$ ppm). Les constantes de couplage (*J*) sont rapportées en Hz.

L'analyse quantitative s'est faite à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Trace GC Ultra (Thermo Scientific) avec un détecteur FID et un échantillonneur automatique Triplus (Thermo Scientific). La colonne était une colonne en phase apolaire DB-5MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 μm). Le port d'injection a été réglé à 220 °C, à l'exception de l'échantillon de *Rhododendron subarcticum* pour lequel le port d'injection a été réglé à 170 °C. L'injection s'est faite en mode *split*, avec un *split* de 50. Le gradient était le même que pour les analyses en GC-MS sur colonne apolaire. Le débit de gaz porteur était de 1,0 ml/min, en mode débit constant. Le détecteur FID a été réglé à 300 °C, avec un *signal range* de 10. Les débits des autres gaz étaient réglés à 350 ml/min pour l'air comprimé, à 35 ml/min pour l'hydrogène et à 30 ml/min pour l'azote (*makeup*).

Le fractionnement de l'huile essentielle de *R. subarcticum* s'est fait par chromatographie sur colonne de gel de silice (Silicycle) avec un gradient de solvant de polarité croissante (90/10 hexanes/dichlorométhane; 70/30 hexanes/dichlorométhane; 50/50 hexanes/dichlorométhane; 20/80 hexanes/dichlorométhane; 0/100 hexanes/dichlorométhane) en utilisant 50 mL de chaque mélange d'éluants, pour une colonne de 30 g de silice (pour 500 mg d'huile essentielle).

4.5 Tests d'activités biologiques

Les tests d'activités biologiques à application en cosméceutique ont été effectués en collaboration avec l'équipe du professeur Xavier Fernandez de l'Université Côte d'Azur en suivant des protocoles développés par leur équipe, à Nice. Leurs protocoles ont déjà été rapportés.¹⁶⁵ Les tests ont été effectués en plaque 96 puits non-traitées, à l'exception de l'évaluation de l'activité antilipoxygénase qui a été évaluée dans des plaques 96-puits transparentes à l'UV. Les échantillons ont été préparés à une concentration de 3,433 mg/ml dans le DMSO. Les activités ont toutes été évaluées en triplicata. L'appareil utilisé pour l'analyse est un lecteur de plaque Spectramax Plus 384 (Molecular Devices). Les données ont été obtenues par le logiciel SoftMaxPro (Molecular Devices) et le calcul de l'inhibition a été effectué à l'aide du logiciel Prism (GraphPad Software, La Jolla). Les valeurs ont été corrigées avec l'absorbance du blanc (échantillon avec le tampon avant l'ajout du substrat). Pour chaque test, un contrôle positif a été utilisé et correspond à un ingrédient actif commercial dans l'industrie cosmétique ou à un composé connu pour donner des résultats positifs au test. Le solvant seul, le DMSO, a été utilisé comme contrôle négatif.

Activité antioxydante

Le test est basé sur l'activité de capture des radicaux stables de DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl). La solution tampon consiste en une solution d'éthanol/acétate de sodium 0,1 M à 50/50, de laquelle 150 µl sont ajoutés à chaque puits avec 7,5 µl de l'échantillon. La première lecture d'absorbance, à 570 nm, pour la correction de l'absorbance, est faite à ce moment. Une solution de DPPH à 386,5 µM dans l'éthanol est ensuite ajoutée (100 µl) dans chaque puits et la plaque est incubée, scellée, à température pièce dans le noir pour 30 min, avant d'être analysée. La seconde lecture de l'absorbance est ensuite faite. Le contrôle positif utilisé est le resvératrol à 3,433 mg/ml dans le DMSO. Le calcul du pourcentage d'inhibition se fait selon l'équation 5.¹⁶⁵

Activité antityrosinase

Ce test évalue l'activité d'inhibition de l'enzyme tyrosinase qui est impliquée dans l'hydroxylation de la L-tyrosine en L-DOPA ainsi que dans les oxydations qui mènent à la dopaquinone. La tyrosinase est impliquée dans la mélanogénèse. Pour évaluer l'inhibition des échantillons, 150 µl d'une solution de tyrosinase de

champignon à 171,66 U/ml dans un tampon de phosphate sont ajoutés dans chaque puits, avec un volume de 7,5 µl d'échantillon. La plaque est ensuite incubée à température pièce, scellée, pendant 20 min avant d'effectuer une première lecture de l'absorbance à 480 nm. Une solution à 1 mM de L-tyrosine ou de L-DOPA dans un tampon phosphate est ensuite ajoutée à chaque puits, puis la plaque est à nouveau incubée, scellée, pendant 20 min avant de prendre une seconde lecture. Le calcul de l'activité d'inhibition est fait en utilisant l'équation 5. Le contrôle positif, pour ce test, est un extrait de réglisse (extrait préparé au laboratoire) à 3,433 mg/ml dans le DMSO.¹⁶⁵

Activité antiélastase

Ce test évalue l'activité d'inhibition de l'élastase, une enzyme endopeptidase qui digère l'élastine, une protéine qui joue un rôle dans la fermeté de la peau, avec le collagène. Dans chaque puits, 150 µl d'une solution d'élastase porcine à 0,171 U/ml dans un tampon Tris ainsi que 7,5 µl d'échantillon sont ajoutés. La plaque est incubée, scellée, pour 20 min avant d'effectuer une première lecture pour la correction du signal, à 410 nm. Le substrat, une solution de 100 µl de N-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide à 2,06 mM dans un tampon Tris, est ajouté à chaque puits, puis la plaque est incubée durant 40 min avant de prendre la lecture de l'absorbance, toujours à 410 nm. L'inhibition est calculée avec l'équation 5 et le contrôle positif est un extrait commercial de framboise (INCI beauty), à base de fruits de *Rubus idaeus* L., à 3,433 mg/ml dans le DMSO.¹⁶⁵

Activité antilipoxygénase

La lipoxygénase est une enzyme impliquée dans l'inflammation. Le test d'activité antilipoxygénase vise à évaluer l'inhibition de l'activité enzymatique en utilisant une solution de lipoxygénase de fèves de soya (150 µl d'une solution à 686,66 U/ml dans un tampon phosphate) à laquelle sont ajoutés 150 µl d'échantillon, dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée, à l'abri de la lumière, scellée, pendant 10 min avant d'ajouter 100 µl d'une solution d'acide linoléique dans un tampon phosphate puis d'incuber à nouveau durant 2 min à l'abri de la lumière. La première lecture d'absorbance est ensuite faite, à 235 nm, puis la seconde lecture se fait après une nouvelle incubation de 50 min. Le calcul du pourcentage d'inhibition est fait selon l'équation 5. Le contrôle positif est du resvératrol à 3,433 mg/ml dans le DMSO.¹⁶⁵

Activité antihyaluronidase

Ce test vise l'évaluation de l'activité inhibitrice vis-à-vis d'hyaluronidases, des enzymes qui sont impliquées dans le vieillissement de la peau en dégradant l'acide hyaluronique. La procédure implique l'utilisation de 150 µl d'une solution de hyaluronidase à 13,3 U/ml dans un tampon d'hyaluronidase et 7,5 µl d'échantillon, qui sont ajoutés à chaque puits. La plaque est ensuite scellée et incubée à 37 °C pendant 20 min

avant de prendre une première lecture pour la correction du signal, à 405 nm. Une solution d'acide hyaluronique est ensuite ajoutée (150 µl de solution à 150 µg/ml dans un tampon à pH 5,35) à chaque puits et la plaque est à nouveau incubée à 37 °C, cette fois pour 30 min. La seconde lecture est ensuite prise à la suite de l'ajout de 50 µl de CTAB, du bromure de cétyleméthylammonium, à 40 mM dans un tampon NaOH 2 %. Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant l'équation 6. Le contrôle positif est un extrait commercial de framboise (INCI beauty), à base de fruits de *Rubus idaeus* L., à 3,433 mg/ml dans le DMSO.¹⁶⁵

Équation 5. Calcul du pourcentage d'inhibition pour les activités antioxydante, antilipoxgénase, antiélastase et antityrosinase.¹⁶⁵

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \left[\frac{\text{Densité optique}_{\text{contrôle}} - \text{Densité optique}_{\text{éch.}}}{\text{Densité optique}_{\text{contrôle}}} \right] \times 100$$

Équation 6. Calcul du pourcentage d'inhibition pour l'activité antihyaluronidase.¹⁶⁵

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \left[\frac{\text{Densité optique}_{\text{éch.}}}{\text{Densité optique}_{\text{blanc}} - \text{Densité optique}_{\text{contrôle}}} \right] \times 100$$

5 Résultats

5.1 Préparation des huiles essentielles

Les échantillons d'huile essentielle correspondant aux échantillons végétaux sont présentés au tableau 7, avec la masse d'huile essentielle produite ainsi que le rendement de production en fonction de la masse sèche calculée.

Tableau 7. Rendement de production des huiles essentielles obtenues pour les échantillons de feuilles de *R. groenlandicum*, *R. subarcticum* et *M. gale* provenant de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.

Id. échantillon végétal	Id. échantillon HE	Masse feuilles sèches (g)	Masse huile essentielle (g)	Rendement (%)
RhGr 001	RhGr EO 001	302,02	3,564	1,18
RhGr 002	RhGr EO 002	368,36	4,307	1,17
RhGr 003	RhGr EO 003	412,38	5,346	1,30
RhSu 001	RhSu EO 001	307,00	3,622	1,18
MyGa 001	MyGa EO 001	378,92	0,034	0,13
MyGa 002	MyGa EO 002	285,02	0,022	0,06
MyGa 003	MyGa EO 003	306,09	0,073	0,22



Figure 22. Échantillons d'huile essentielle de feuilles de *R. groenlandicum* provenant de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.

Comme il est possible de l'observer sur la figure 22, les trois échantillons d'huile essentielle de *R. groenlandicum* ne sont pas de la même couleur, ce qui peut laisser présager des divergences au niveau de la composition en certains métabolites secondaires. Malgré les différences de teintes, les huiles essentielles obtenues ont toutes une coloration jaunâtre, avec les échantillons RhGr EO 001 et RhGr EO 002 qui sont plus foncés, alors que l'échantillon RhGr EO 003 affichait une teinte tendant légèrement vers le vert. Sur la figure 23, l'échantillon d'huile essentielle RhSu EO 001 peut être observé. Cette huile essentielle est de couleur jaunâtre-orangé. Les faibles quantités d'huile essentielle de *Myrica gale* qui ont été obtenues à la suite de la distillation des feuilles fraîches n'ont pas permis de bien les observer sur photo. Elles affichaient une teinte jaunâtre pâle, avec des variations de teintes légères.



Figure 23. Échantillon d'huile essentielle obtenu par hydrodistillation des feuilles de *R. subarcticum*.

5.2 Caractérisation

5.2.1 *Rhododendron groenlandicum*

La caractérisation s'est faite selon la méthodologie décrite au chapitre 1. Le tableau 8 présente quelques statistiques sur les résultats des analyses : le nombre de métabolites observés (GC-MS et GC-FID en phase apolaire semi-standard), le nombre de métabolites identifiés ainsi que la proportion relative que représentent les métabolites identifiés (GC-FID). Autour de 90 % de la composition totale, en proportion relative, a été identifiée pour chaque échantillon. Les analyses quantitatives ont été faites en triplicata et les résultats sont présentés avec leur écart type. Entre 68 et 79 métabolites ont été identifiés, selon l'échantillon, alors qu'entre 142 et 199 pics ont été observés sur les chromatogrammes GC-MS.

Tableau 8. Métabolites observés et identifiés et proportion relative identifiée pour les échantillons d'huile essentielle de feuilles de *R. groenlandicum*.

Id. échantillon	Nb métabolites observés	Nb métabolites identifiés	Proportion relative identifiée (%)
RhGr EO 001	172	79	90 ± 3
RhGr EO 002	142	68	91 ± 11
RhGr EO 003	199	78	86 ± 5

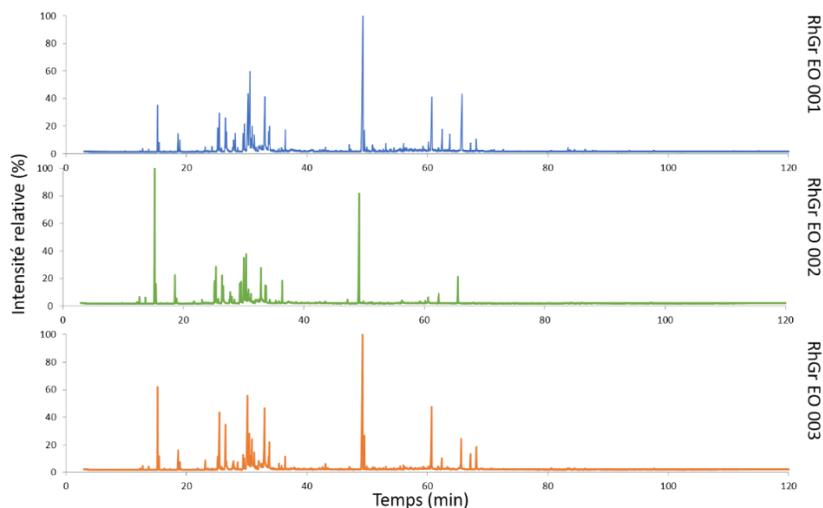
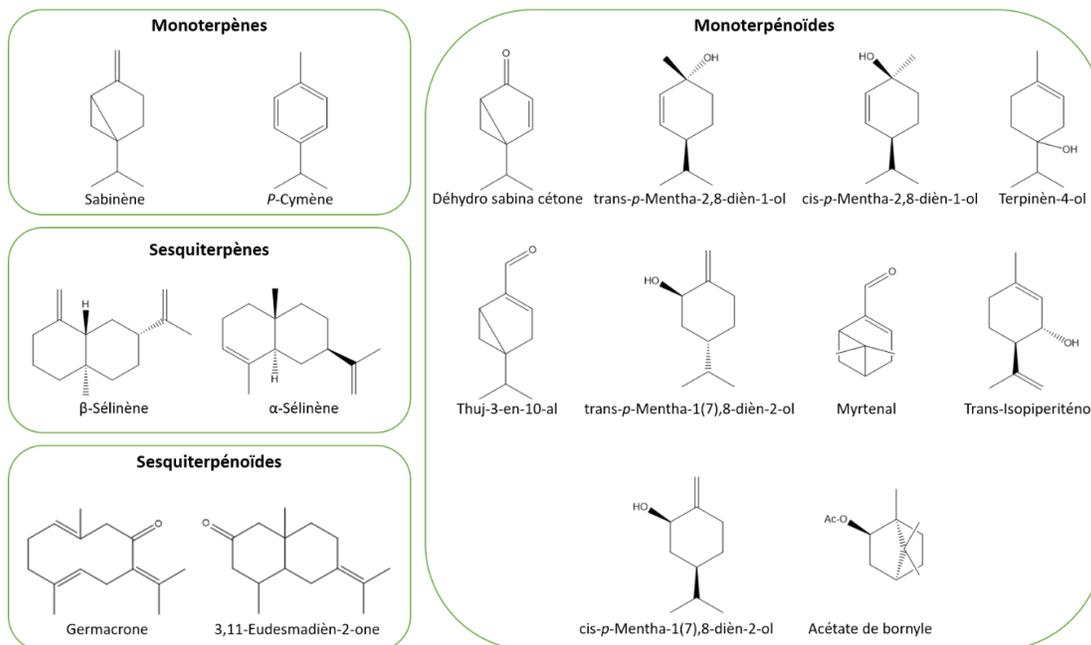


Figure 24. Chromatogrammes obtenus par analyse en GC-MS pour les trois échantillons d'huile essentielle de *R. groenlandicum*.

La figure 24 présente le profil chromatographique obtenu en GC-MS pour les trois échantillons. On peut y remarquer des divergences dans la proportion des métabolites entre les trois échantillons, même si les trois chromatogrammes sont assez similaires. Au tableau 9, les métabolites secondaires identifiés dans les échantillons d'huile essentielle de *R. groenlandicum* sont présentés, avec les détails sur leur identification et leur proportion relative. Les métabolites les plus importants (> 2 % de la composition totale, en proportion relative) sont présentés à la figure 25 avec leur structure respective. Ceux-ci ont été regroupés selon leur classe biosynthétique. Les proportions relatives des classes des métabolites identifiés sont aussi présentées dans le tableau 9. Quelques métabolites non identifiés ont été inclus dans le tableau de présentation des métabolites identifiés parce qu'ils ont été retrouvés en proportion non négligeable, alors que les autres pics observés sur les chromatogrammes, pour des métabolites qui n'ont pu être identifiés jusqu'à maintenant, correspondaient à des proportions relatives très faibles (< 0,25 %).



Les métabolites représentant plus de 2 % de la proportion totale d'au moins un des échantillons sont présentés.

Figure 25. Structures des métabolites principaux des huiles essentielles de *R. groenlandicum* en provenance de Whapmagoostui-Kuujuarapik.

Les principaux métabolites secondaires volatils présents dans les échantillons d'huile essentielle de *R. groenlandicum* préparés à partir de feuilles récoltées à Whapmagoostui-Kuujuarapik diffèrent selon l'échantillon. Le sabinène ($2,7 \pm 0,3 - 13 \pm 3 \%$), un monoterpène, et le β -sélinène ($14 \pm 1 - 15,24 \pm 0,05 \%$) sont les deux composés majoritaires, le premier étant présent en proportion variable alors que le second est présent en proportion assez constante d'un échantillon à l'autre. Tous les métabolites principaux sont des terpénoïdes de structure et de taille différentes.

Tableau 9. Métabolites secondaires identifiés dans les échantillons d'huile essentielle de feuilles de *Rhododendron groenlandicum* provenant de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.

Composés	LRI _{exp.}	LRI _{lit.}	LRI _{exp.} †	LRI _{lit.} †	Proportion relative (DB-5MS)			Méthode d'identification
	(DB-5MS)	(Apolaire semi- standard)	(HP-Innowax)	(Polaire)	[% ± écart type]			
					RhGr EO 001	RhGr EO 002	RhGr EO 003	
Tricyclène*	918	921 ^[B]	1013/386/411	1014/384/417	tr	tr	tr	MS, LRI ^[E,F]
α-Thuyène*	922	924 ^[B]	1028/395/422	1028/-/-	tr	0,16 ± 0,03	tr	MS, LRI ^[E,F]
α-Pinène*	928	932 ^[B]	1025/393/420	1028/393/427	0,17 ± 0,02	0,6 ± 0,2	0,22 ± 0,04	MS, LRI ^[E,F]
Camphène*	943	945 ^[B]	1068/419/452	1071/-/-	tr	0,6 ± 0,2	0,18 ± 0,03	MS, LRI ^[E,F]
Sabinène*	969	969^[B]	1124/463/508	1124/-/-	2,7 ± 0,3	13 ± 3	4,7 ± 0,7	MS, LRI^[E,F]
β-Pinène*	972	974 ^[B]	1111/449/490	1112/460/505	0,49 ± 0,05	1,6 ± 0,4	0,7 ± 0,1	MS, LRI ^[E,F]
Myrcène*	987	988 ^[B]		1161/513/567	tr	-	tr	MS, LRI ^[E]
<i>p</i> -Mentha-1(7),8-diène	1000	1003 ^[B]	1168/511/568		-	tr	tr	MS, LRI ^[E]
α-Terpinène*	1013	1014 ^[B]	1180/524/584	1180/529/586	tr	tr	tr	MS, LRI ^[E,F]
<i>p</i>-Cymène*	1020	1020^[B]	1270/630/669	1272/635/678	1,5 ± 0,1	2,9 ± 0,4	1,6 ± 0,1	MS, LRI^[E,F]
Limonène*	1025	1024 ^[B]	1202/547/607	1200/553/608	0,71 ± 0,06	0,55 ± 0,09	0,48 ± 0,05	MS, LRI ^[E,F]
1,8-Cinéole	1026	1026 ^[B]	1207/559/613	1213/559/614	-	-	tr	MS, LRI ^[E,F]
(<i>E</i>)-β-Ocimène*	1050	1046 ^[A]	1244/607/646	1246/612/654	tr	tr	tr	MS, LRI ^[E,F]
γ-Terpinène*	1053	1054 ^[B]		1246/612/654	tr	tr	tr	MS, LRI ^[E]
cis-Sabinène hydrate*	1064	1065 ^[B]	1465/828/871	1463/-/-	tr	0,28 ± 0,06	tr	MS, LRI ^[E,F]
Terpinolène*	1080	1086 ^[A]	1282/639/680	1283/638/681	tr	tr	tr	MS, LRI ^[E,F]
Fenchone	1081	1083 ^[B]	1389/748/797	1401/759/803	tr	-	-	MS, LRI ^[E,F]
<i>p</i> -Cymène*	1084	1089 ^[B]	1435/799/842	1444/-/-	0,29 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,64 ± 0,02	MS, LRI ^[E,F]
trans-Sabinène hydrate*	1095	1098 ^[B]			tr	0,25 ± 0,01	tr	MS, LRI ^[E]
α-Thuyone	1100	1100 ^[B]	1414/775/821	1430/-/-	0,32 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,10 ± 0,01	MS, LRI ^[E,F]
n-Nonanal*	1102	1101 ^[B]	1395/754/802	1391/751/800	tr	tr	tr	MS, LRI ^[E,F]
1,3,8- <i>p</i> -Menthatriène	1107	1108 ^[B]			tr	tr	tr	MS, LRI ^[E]

Déhydro-Sabina cétone*	1113	1117 ^[B]	1613/974/1016	1643/-/-	1,81 ± 0,04	2,36 ± 0,07	1,03 ± 0,05	MS, LRI ^[E]
trans- <i>p</i> -Mentha-2,8-dièn-1-ol*	1119	1119 ^[B]	1629/989/1032	1639/-/-	3,2 ± 0,1	4,02 ± 0,07	5,4 ± 0,2	MS, LRI ^[E,F]
cis- <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol*	1120	1118 ^[B]	1547/909/951		0,20 ± 0,01	0,28 ± 0,03	-	MS, LRI ^[E]
cis- <i>p</i> -Mentha-2,8-dièn-1-ol*	1133	1133 ^[B]	1671/1032/1074	1660/-/-	2,37 ± 0,05	2,81 ± 0,09	3,63 ± 0,06	MS, LRI ^[E,F]
trans-Pinocarvéol*	1134	1135 ^[B]	1650/1010/1053	1664/-/-	1,59 ± 0,05	1,96 ± 0,04	0,82 ± 0,09	MS, LRI ^[E,F]
trans- <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol	1137	1136 ^[B]	1561/923/965	1571/-/-	0,23 ± 0,02	0,49 ± 0,09	0,25 ± 0,06	MS, LRI ^[E,F]
Camphre	1139	1141 ^[B]	1502/864/906	1518/-/-	tr	-	-	MS, LRI ^[E,F]
cis-Verbénol*	1143	1141 ^[A]	1634/995/1038	1663/-/-	tr	tr	tr	MS, LRI ^[E,F]
2-(1Z)-propényl-phénol	1146	1146 ^[B]			tr	tr	tr	MS, LRI ^[E]
Sabina cétone*	1151	1154 ^[B]	1619/980/1023	1651/-/-	0,75 ± 0,04	1,07 ± 0,03	0,67 ± 0,1	MS, LRI ^[E]
Oxyde de β -pinène *	1153	1154 ^[B]	1451/814/857		0,20 ± 0,04	0,39 ± 0,02	0,17 ± 0,03	MS, LRI ^[E]
Pinocarvone*	1155	1160 ^[B]	1555/917/959	1586/-/-	1,08 ± 0,03	0,66 ± 0,03	tr	MS, LRI ^[E]
Pentyl cyclohexa-1,3-diène	1160	1160 ^[A]			0,24 ± 0,01	0,38 ± 0,06	0,58 ± 0,04	MS, LRI ^[E]
Terpinèn-4-ol*	1175	1174 ^[B]	1600/961/1004	1602/959/1002	1,34 ± 0,04	2,05 ± 0,03	1,09 ± 0,05	MS, LRI ^[E,F]
Thuj-3-en-10-al*	1178	1181 ^[B]	1618/979/1022	1642/-/-	2,07 ± 0,06	2,2 ± 0,1	0,80 ± 0,01	MS, LRI ^[E]
Cryptone	1179	1183 ^[B]	1653/1014/1056	1687/-/-	-	tr	0,26 ± 0,02	MS, LRI ^[E]
trans- <i>p</i> -Mentha-1(7),8-dien-2-ol*	1189	1189 ^[A]	1797/1156/1195		6,0 ± 0,2	6,4 ± 0,4	9,0 ± 0,2	MS, LRI ^[E]
Myrtenal*	1191	1195 ^[B]	1617/978/1021	1647/-/-	8,7 ± 0,3	6,0 ± 0,2	3,1 ± 0,3	MS, LRI ^[E]
Myrtenol*	1193	1194 ^[B]	1802/1160/1200	1797/-/-	0,26 ± 0,02	0,35 ± 0,04	0,39 ± 0,03	MS, LRI ^[E,F]
trans-4-Caranone*	1194	1196 ^[B]	1593/955/997		0,70 ± 0,02	0,3 ± 0,5	0,87 ± 0,08	MS, LRI ^[E]
trans-Isopipéritenol*	1197	1195 ^[D]	1750/1110/1150	1745/-/-	2,02 ± 0,08	2,1 ± 0,5	2,7 ± 0,2	MS, LRI ^[E,F]
cis-Dihydrocarvone	1198	1198 ^[A]	1593/955/997	-/970/1012	0,36 ± 0,04	0,38 ± 0,05	0,35 ± 0,08	MS, LRI ^[E,F]
cis-4-Caranone*	1201	1200 ^[B]	1604/965/1004	-/-/-	1,09 ± 0,04	1,0 ± 0,1	1,32 ± 0,05	MS, LRI ^[E]
Verbénone	1207	1208 ^[A]	1713/1074/1115	1723/1059/1101	0,36 ± 0,02	0,34 ± 0,05	0,28 ± 0,05	MS, LRI ^[E,F]
cis-Isopiperitenol*	1212	1215 ^[D]	1744/1104/1145	1742/-/-	0,42 ± 0,03	0,52 ± 0,05	0,9 ± 0,1	MS, LRI ^[E,F]
trans-Carvéol*	1215	1215 ^[B]	1835/1192/1233	1845/1185/1226	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,17 ± 0,02	MS, LRI ^[E,F]
cis- <i>p</i> -Mentha-1(7),8-dièn-2-ol*	1228	1227 ^[B]	1889/1246/1286		6,8 ± 0,1	5,6 ± 0,3	7,7 ± 0,2	MS, LRI ^[E]

cis-Carvéol*	1229	1232 ^[A]	1865/1222/1263	1861/1214/12556	tr	0,42 ± 0,06	0,27 ± 0,02	MS, LRI ^[E,F]
Cuminaldéhyde*	1236	1238 ^[B]	1769/1128/1168	1789/11330/1171	1,39 ± 0,04	1,7 ± 0,2	1,00 ± 0,05	MS, LRI ^[E,F]
Carvone*	1238	1239 ^[B]	1721/1081/1122	1741/-/-	1,57 ± 0,07	1,6 ± 0,2	1,94 ± 0,08	MS, LRI ^[E,F]
Périllaldéhyde*	1266	1269 ^[B]	1767/1127/1167	1775/1133/1174	0,22 ± 0,02	0,30 ± 0,04	0,28 ± 0,03	MS, LRI ^[E,F]
Phellandral	1268	1273 ^[B]		1744/-/-	0,12 ± 0,01	0,20 ± 0,04	0,11 ± 0,02	MS, LRI ^[E]
Acétate de bornyle*	1278	1283^[B]	1572/934/976	1581/942/984	1,39 ± 0,01	2,12 ± 0,09	0,86 ± 0,03	MS, LRI^[E,F]
p-Cymen-7-ol*	1285	1289 ^[B]	2098/1451/1489	2113/-/-	0,29 ± 0,04	0,3 ± 0,2	tr	MS, LRI ^[E,F]
Alcool périllique	1292	1294 ^[B]	2000/1355/1392	2016/-/-	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,3	0,20 ± 0,05	MS, LRI ^[E,F]
p-Mentha-1,4-diène-7-ol*	1322	1325 ^[B]	2052/1404/1443	2073/-/-	tr	-	0,10 ± 0,02	MS, LRI ^[E]
α-Cubebène*	1339	1345 ^[B]	1450/813/856	1463/838/882	0,2 ± 0,1	-	tr	MS, LRI ^[E,F]
α-Copaène*	1365	1374 ^[B]	1480/842/885	1492/-/-	tr	-	tr	MS, LRI ^[E,F]
β-Cubebène*	1378	1387 ^[B]	1528/890/933	1545/-/-	tr	-	-	MS, LRI ^[E,F]
β-Elementène*	1380	1389 ^[B]	1581/943/985	1591/-/-	0,27 ± 0,01	-	0,46 ± 0,04	MS, LRI ^[E,F]
(Z)-Caryophyllène*	1406	1408 ^[B]	1581/943/985	1589/-/-	tr	-	tr	MS, LRI ^[E,F]
α-Humulène*	1442	1452 ^[B]	1652/1012/1055	1667/-/-	0,42 ± 0,00	-	0,20 ± 0,01	MS, LRI ^[E,F]
Germacrène D*	1469	1480 ^[A]	1692/1052/1094	1710/-/-	tr	-	tr	MS, LRI ^[E,F]
β-Sélinène*	1480	1489^[B]	1704/1064/1106	1717/-/-	15,24 ± 0,05	14 ± 1	14,1 ± 0,3	MS, LRI^[E,F]
α-Sélinène*	1485	1498^[B]	1707/1068/1109	1725/-/-	1,46 ± 0,00	0,12 ± 0,02	2,44 ± 0,09	MS, LRI^[E,F]
Germacrène A?*	1494	1508 ^[B]			0,12 ± 0,01	-	0,16 ± 0,02	MS, LRI ^[E]
Épi-cubebol*	1503	1493 ^[B]	1877/1234/1275	1900/-/-	tr	tr	0,18 ± 0,01	MS, LRI ^[E,F]
δ-cadinène*	1508	1518 ^[B]	1746/1105/1146	1758/-/-	0,50 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,16 ± 0,01	MS, LRI ^[E,F]
Germacrène B*	1544	1557 ^[A]	1808/1166/1206	1819/-/-	0,49 ± 0,02	-	0,21 ± 0,01	MS, LRI ^[E,F]
Viridiflorol*	1589	1592 ^[B]			0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,01	tr	MS, LRI ^[E]
Oxyde de caryophyllène*	1594	1587 ^[A]	1983/138/1377	1989/1325/1364	0,53 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,32 ± 0,02	MS, LRI ^[E,F]
Rosifolol*	1597	1600 ^[B]	2106/1458/1497	2144/-/-	0,30 ± 0,02	0,48 ± 0,07	0,33 ± 0,05	MS, LRI ^[E]
1,10-di-épi-cubebol	1614	1614 ^[A]	2039/1391/1430	2054/-/-	0,16 ± 0,01	tr	0,10 ± 0,00	MS, LRI ^[E,F]
Épicubebol*	1629	1627 ^[B]	2047/1398/1438	2067/-/-	0,21 ± 0,03	tr	0,1 ± 0,1	MS, LRI ^[E,F]
14-hydroxy-(Z)-caryophyllène	1669	1666 ^[B]	1955/1311/1349		0,66 ± 0,04	0,38 ± 0,03	0,4 ± 0,1	MS, LRI ^[E]

Non identifié A	1677				-	1,0 ± 0,1	-	
Germacrone*	1679	1693^[B]	2202/1552/1588	2217/-/-	6,0 ± 0,2	0,18 ± 0,06	6,5 ± 0,2	MS, LRI^[E,F]
Cedroxyde?	1709	1713 ^[B]	2195/1545/1581	-/1535/1571	1,53 ± 0,04	1,0 ± 0,1	0,88 ± 0,05	MS, LRI ^[E,F]
Cyclocolorenone?*	1734	1751 ^[D]	2329/1676/1712	2325 ^[D] /-/-	1,11 ± 0,04	-	0,24 ± 0,01	MS, LRI ^[E,F]
β -Costol*	1753	1763 ^[A]			tr	tr	0,28 ± 0,02	MS, LRI ^[E]
3,11-Eudesmadièn-2-one*	1772	1779^[D]	2467/1810/1846	2469^[D]/-/-	6,2 ± 0,3	3,2 ± 0,4	2,85 ± 0,05	MS, LRI^[E,F]
Non identifié B	1798				-	-	1,05 ± 0,06	
Non identifié C	1817				0,80 ± 0,02	-	tr	
Non identifié D	1820				tr	tr	1,8 ± 0,1	
Terpénoïdes					90 ± 3	90 ± 11	86 ± 5	
Monoterpènes					5,9 ± 0,5	20 ± 5	9 ± 1	
Monoterpénoïdes					48 ± 2	50 ± 4	47 ± 2	
Sesquiterpènes					18,9 ± 0,3	14 ± 1	17,9 ± 0,5	
Sesquiterpénoïdes					17 ± 1	5,6 ± 0,8	12,3 ± 0,7	
Autres					0,27 ± 0,02	0,42 ± 0,09	0,61 ± 0,07	
Proportion totale de composés identifiés					90 ± 3	91 ± 11	86 ± 5	

Les indices de rétention linéaires (LRI) provenant de la littérature qui sont présentés dans le tableau 9 sont les valeurs les plus proches des valeurs expérimentales selon les sources : [A] FFNSC 3⁹²; [B] Robert P. Adams⁹³; [C] NIST 14⁹⁴; [D] Collin, 2015¹⁰²

[E] : Identification à partir de l'indice de rétention sur colonne non polaire semi-standard.

[F] : Identification à partir de l'indice de rétention sur colonne polaire.

† : Indices de rétention sur colonne polaire obtenus en fonction des séries de standards présentées selon l'ordre suivant : n-alcanes^[C] /FAEEs^[A] /FAMEs^[A].

* : Composés observés dans des échantillons d'huile essentielle de *R. groenlandicum* rapportés dans la littérature.¹⁰²⁻¹⁰⁵

Gras : Métabolites principaux (> 2 % de la composition totale).

tr : La proportion relative est indiquée comme trace pour les valeurs < 0.1 %.

Spectres de masse des composés non identifiés : A : m/z = 55 (100), 67 (65), 81 (57), 53 (52), 79 (50), 95 (49), 93 (47), 109 (45), 107 (43), 97 (35); B : m/z = 107 (100), 67 (71), 91 (61), 53 (59), 55 (54), 79 (51), 77 (46), 93 (42), 121 (36), 68 (36); C : m/z = 68 (100), 67 (74), 53 (50), 55 (35), 79 (33), 91 (32), 167 (30), 107 (30), 77 (28), 69 (25); D : m/z = 67 (100), 68 (89), 53 (76), 91 (67), 55 (64), 79 (64), 77 (59), 149 (57), 107 (50), 105 (50).

? Composés incertains, identification qui serait à confirmer à la suite de la purification.

5.2.2 *Rhododendron subarcticum*

La caractérisation s'est faite, ici aussi, en suivant la méthodologie présentée au chapitre 1. Un résumé des résultats de l'identification des métabolites secondaires volatils de l'huile essentielle de *R. subarcticum* récolté à Whapmagoostui-Kuujuarapik est présenté au tableau 10. La quasi-totalité (99 ± 3 %) de l'échantillon a pu être identifiée, en proportion relative, mais en nombre de composés, 53 métabolites ont été identifiés sur un total de 82 pics observés sur le chromatogramme GC-MS. Ce chromatogramme est présenté à la figure 26, sur lequel on peut remarquer que deux pics sont fortement majoritaires. Un agrandissement y est aussi présenté, pour la zone entre 10 et 40 minutes, sur lequel on peut voir qu'il y a tout de même plusieurs plus petits pics qui sont bien présents sur le chromatogramme.

Tableau 10. Métabolites observés et identifiés et proportion relative identifiée pour l'échantillon d'huile essentielle de feuilles de *R. subarcticum*.

Id. échantillon	Nb métabolites observés	Nb métabolites identifiés	Proportion relative identifiée (%)
RhSu EO 001	82	53	99 ± 3

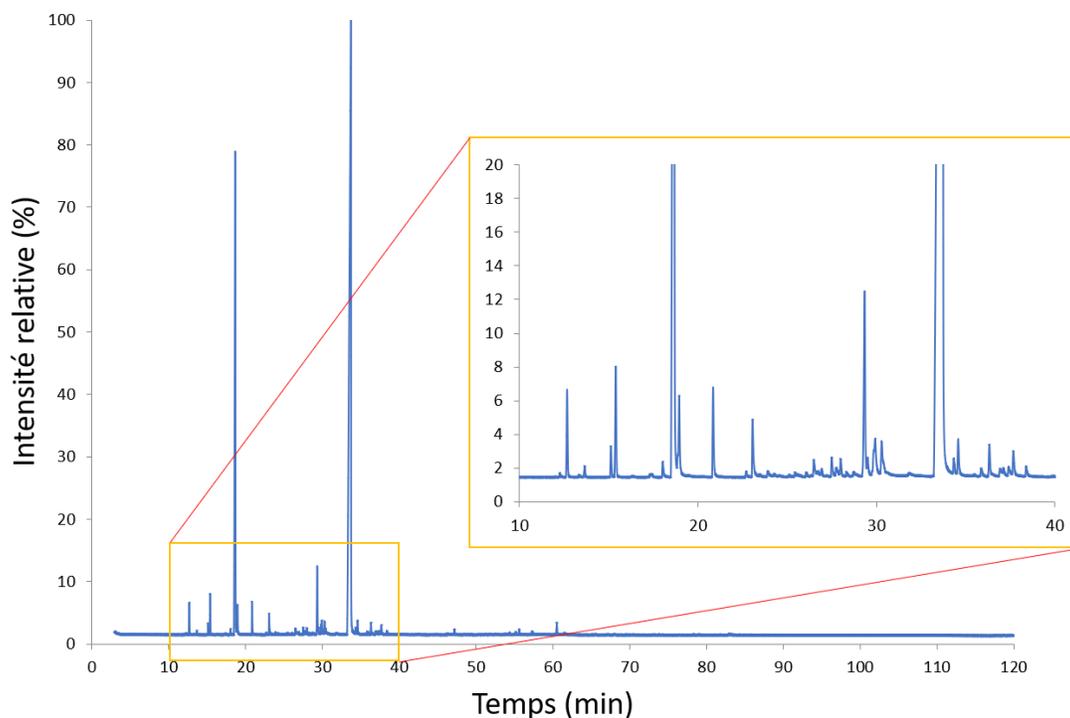
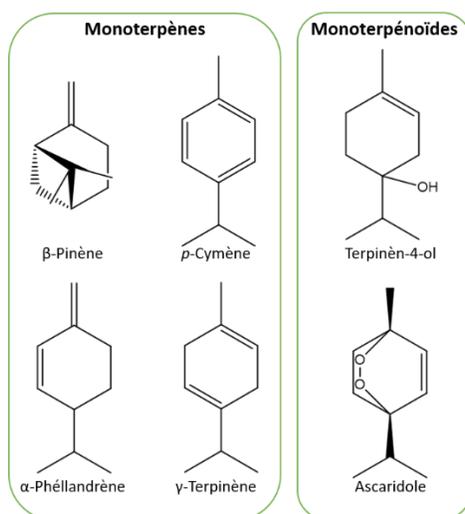


Figure 26. Chromatogramme de l'échantillon d'huile essentielle de feuilles de *R. subarcticum* provenant du Nunavik.

Les résultats complets d'identification sont présentés au tableau 11, avec les noms des composés identifiés, en plus des détails sur leur identification et de leur proportion relative. Dans le bas du tableau sont compilées les proportions relatives des différentes classes de produits naturels retrouvés dans cet échantillon d'huile essentielle et à la figure 27 sont présentés les métabolites secondaires important (> 1 % en proportion relative) ainsi que leur structure. Les deux métabolites principaux sont l'ascaridole, un monoterpénoïde bicyclique présentant une fonction peroxyde endocyclique, ainsi que le *p*-cymène, un monoterpène.

Cette huile essentielle a été fractionnée par chromatographie sur colonne de gel de silice afin de permettre l'identification du plus grand nombre possible de composés, en les retrouvant plus concentrés dans les fractions obtenues. Au total, 52 fractions de 5 ml ont été récupérées. Le fractionnement a permis d'obtenir des fractions contenant l'ascaridole à 85 – 90 % selon la semi-quantification des fractions par GC-FID.



Les métabolites représentant plus de 1 % de la proportion totale de l'échantillon d'huile essentielle de *R. subarcticum* sont présentés ici.

Figure 27. Structures des métabolites principaux de l'huile essentielle de *R. subarcticum* en provenance du Nunavik.

Tableau 11. Métabolites secondaires identifiés dans l'échantillon d'huile essentielle de feuilles de *Rhododendron subarcticum* provenant de la région de la rivière Boniface, Nunavik.

Composés	LRI _{exp.}	LRI _{lit.}	LRI _{exp.} [†]	LRI _{lit.} [†]	Proportion relative (DB-5MS) [% ± écart type]	Méthode d'identification
	(DB-5MS)	(Apolaire semi-standard)	(HP-Innowax)	(Polaire)	A	
<i>α</i> -Thujène*	922	924 ^[B]	1028/396/423	1028/-/-	tr	MS, LRI ^[D,E]
<i>α</i> -Pinène*	928	932 ^[B]	1025/393/420	1028/393/427	0,88 ± 0,08	MS, LRI ^[D,E]
Camphène*	943	946 ^[B]	1068/419/452	1071/-/-	0,12 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
Sabinène*	968	969 ^[B]	1123/462/506	1124/-/-	0,33 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
<i>β</i>-Pinène*	972	974^[B]	1112/450/491	1112/460/505	1,15 ± 0,06	MS, LRI^[D,E]
Vinyl amyl carbinol	978	978 ^[A]	1458/821/864	1450/814/858	tr	MS, LRI ^[D,E]
Myrcène*	987	988 ^[B]	1170/512/569	1161/513/567	tr	MS, LRI ^[D,E]
<i>α</i> -Phellandrène*	1003	1002 ^[B]	1165/507/564	1167/522/574	tr	MS, LRI ^[D,E]
<i>δ</i> -3-Carène*	1004	1009 ^[A]	1148/489/541	1147/-/-	tr	MS, LRI ^[D,E]
<i>α</i> -Terpinène*	1013	1014 ^[B]	1181/524/585	1180/529/586	0,20 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
<i>p</i>-Cymène*	1025	1025^[A]	1273/635/678	1272/635/678	21 ± 1	MS, LRI^[D,E]
Limonène*	1026	1030 ^[A]	1202/547/607	1200/553/608	0,18 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
<i>β</i>-Phellandrène*	1027	1025^[A]	1210/560/614	1211/-/-	1,0 ± 0,1	MS, LRI^[D,E]
(<i>Z</i>)- <i>β</i> -Ocimène*	1034	1035 ^[A]	1238/603/639	1235/-/-	tr	MS, LRI ^[D,E]
(<i>E</i>)- <i>β</i> -Ocimène*	1044	1044 ^[B]	1254/615/653	1250/-/-	tr	MS, LRI ^[D,E]
<i>γ</i>-Terpinène*	1054	1054^[B]	1245/608/646	1246/612/654	1,02 ± 0,03	MS, LRI^[D,E]
Terpinolène*	1080	1086 ^[A]	1283/640/681	1283/638/681	tr	MS, LRI ^[D,E]
<i>p</i> -Cymenène*	1085	1089 ^[B]	1437/800/843	1444/753/802	0,72 ± 0,02	MS, LRI ^[D,E]
Linalool*	1099	1101 ^[A]	1557/919/961	1547/913/956	0,10 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
n-Nonanal*	1103	1100 ^[B]	1396/755/804	1391/751/800	tr	MS, LRI ^[D,E]

1,3,8- <i>p</i> -Menthatriène*	1107	1108 ^[B]	1422/784/829	-/-	tr	MS, LR ^[D]
déhydro-Sabina cétone*	1112	1117 ^[B]	1638/998/1041	1643/-/-	tr	MS, LR ^[D,E]
cis- <i>p</i> -Menth-2-en-1-ol*	1118	1118 ^[B]	1626/989/1032	1638/-/-	tr	MS, LR ^[D,E]
trans-Pinocarvéol*	1133	1135 ^[B]	1651/1011/1054	1664/-/-	tr	MS, LR ^[D,E]
trans- <i>p</i> -Menth-2-en-1ol*	1137	1138 ^[B]	1562/924/966	1571/-/-	0,23 ± 0,01	MS, LR ^[D,E]
Camphre	1138	1141 ^[B]	1504/866/908	1520/-/-	tr	MS, LR ^[D,E]
Pinocarvone*	1154	1160 ^[B]	1557/919/961	1586/-/-	0,14 ± 0,00	MS, LR ^[D]
Bornéol*	1164	1165 ^[B]	1698/1059/1101	1702/-/-	tr	MS, LR ^[D,E]
Terpinèn-4-ol*	1176	1174^[B]	1600/962/1004	1602/959/1002	2,45 ± 0,04	MS, LR^[D,E]
Thuj-3-en-10-al	1177	1181 ^[B]	1619/980/1023	1642/-/-	0,25 ± 0,01	MS, LR ^[D]
Cryptone	1179	1183 ^[B]	1655/1019/1061	1687/-/-	tr	MS, LR ^[D]
Myrtenal*	1187	1184 ^[A]	1616/977/1020	1647/-/-	0,4 ± 0,4	MS, LR ^[D]
α -terpinéol*	1188	1186 ^[B]	1698/1059/1101	1697/1043/1087	0,4 ± 0,4	MS, LR ^[D,E]
<i>p</i> -Cymen-8-ol*	1190	1189 ^[A]	1853/1209/1250	1852/1188/1231	0,41 ± 0,04	MS, LR ^[D,E]
Estragol*	1192	1195 ^[B]	1668/1029/1071	1670/1018/1062	0,15 ± 0,03	MS, LR ^[D,E]
Myrtenol*	1194	1194 ^[B]	1790/1149/1189	1797/-/-	tr	MS, LR ^[D,E]
Ascaridole*	1245	1240^[A]	1712/1072/1114	1889/-/-	64,7 ± 0,7	MS, LR^[D]
Époxyde cis-pipéritone (époxyde vs IPP)*	1250	1250 ^[B]	1720/1080/1121	1707/-/-	0,26 ± 0,07	MS, LR ^[D,E]
3-Méthyl-6-(1-méthyléthyl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-one	1254	1261 ^[C]	1707/1067/1109		0,47 ± 0,06	MS, LR ^[D]
Phellandral*	1270	1273 ^[B]	1707/1067/1109	1744/-/-	0,13 ± 0,02	MS, LR ^[D]
Acétate de bornyle*	1278	1284 ^[B]	1573/935/977	1581/942/984	0,39 ± 0,04	MS, LR ^[D,E]
<i>p</i> -Cymen-7-ol*	1287	1289 ^[B]	2100/1453/1491	2113/-/-	tr	MS, LR ^[D]
Thymol*	1290	1289 ^[B]	2182/1532/1569	2189/-/-	0,13 ± 0,02	MS, LR ^[D,E]
Carvacrol*	1297	1298 ^[B]	2222/1571/1607	2236/1565/1601	0,15 ± 0,03	MS, LR ^[D,E]
Isoascaridole*	1299	1306 ^[A]	1851/1207/1248	1853/1178/1222	0,34 ± 0,02	MS, LR ^[D]
<i>p</i> -Mentha-1,4-dièn-7-ol*	1322	1325 ^[B]			tr	MS, LR ^[D]
Acétate de citronellyl*	1347	1350 ^[A]			tr	MS, LR ^[D]
Acétate de trans-géranyl*	1375	1379 ^[B]			tr	MS, LR ^[D]

Aromadendrène*	1447	1440 ^[C]	1629/989/1032	1618/953/1000	tr	MS, LRI ^[D,E]
(E)-β-Farnesène*	1448	1452 ^[A]			tr	MS, LRI ^[D]
Oxyde de caryophyllène*	1566	1582 ^[B]	1957/1312/1351	1989/1325/1364	tr	MS, LRI ^[D]
14-hydroxy-(Z)-Caryophyllène*	1670	1664 ^[A]			tr	MS, LRI ^[D]
Germacrone*	1676	1693 ^[B]	2202/1553/1588	2217/-/-	0,41 ± 0,03	MS, LRI ^[D,E]
Terpénoïdes					99 ± 3	
Monoterpènes					27 ± 1	
Monoterpénoïdes					71 ± 2	
Sesquiterpènes					0,02 ± 0,01	
Sesquiterpénoïdes					0,46 ± 0,03	
Autres					0,19 ± 0,04	
Proportion totale des composés identifiés					99 ± 3	

Les indices de rétention linéaires (LRI) provenant de la littérature qui sont présentés dans le tableau 11 sont les valeurs les plus proches des valeurs expérimentales selon les sources : [A] FFNSC 3⁹²; [B] Robert P. Adams⁹³; [C] NIST 14⁹⁴.

[D] : Identification à partir de l'indice de rétention sur colonne non polaire semi-standard.

[E] : Identification à partir de l'indice de rétention sur colonne polaire.

† : Indices de rétention sur colonne polaire obtenus en fonction des séries de standards suivantes n-alcane^[C] /FAEEs^[A] /FAMEs^[A].

* : Composés observés dans des échantillons d'huile essentielle de *R. tomentosum* ou *Ledum palustre* (avec les dérivés de ces noms) rapportés dans la littérature.^{74, 112, 120, 121, 123, 124, 126-134, 160, 161, 166}

Gras : Métabolites principaux (> 1 % de la composition totale).

tr: La proportion relative est indiquée comme trace pour les valeurs < 0.1 %.

5.2.2.1 Identification, quantification et stabilité de l'ascaridole

Le métabolite majoritaire retrouvé dans l'échantillon d'huile essentielle de *R. subarcticum* a été identifié par GC-MS comme étant l'ascaridole. Il s'agit d'un monoterpénoïde bicyclique présentant un peroxyde entre les positions 1 et 4. Il a été séparé par chromatographie éclair sur colonne de gel de silice, à partir de l'échantillon d'huile essentielle de *R. subarcticum*. Les fractions 40 - 44 contenait de l'ascaridole à 85 - 90 % selon les résultats de semi-quantifications par GC-FID. La fraction 41 (90 % d'ascaridole) a été analysée par RMN ¹H et COSY pour comparer les spectres avec ceux rapportés dans la littérature pour l'ascaridole et confirmer son identification. Les données de RMN sont présentées ci-dessous et le spectre RMN ¹H est présenté, assigné, à l'annexe 1.

Ascaridole : ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ 1.00 (d, J= 6,92 Hz, 6H, H_A), 1.38 (s, 3H, H_G), 1.47-1.57 (m, 2H, H_C, D, E ou F), 1.93 (sept., J=6,92 Hz, 1H, H_B), 1.99-2.07 (m, 2H, H_C, D, E ou F), 6.42 (d, J=8,49 Hz, H_H ou I), 6.5 (d, J= 8,53 Hz, H_H ou I).

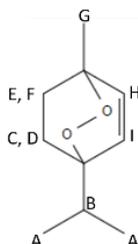


Figure 28. Structure de l'ascaridole avec annotations correspondant à la caractérisation par RMN ¹H.

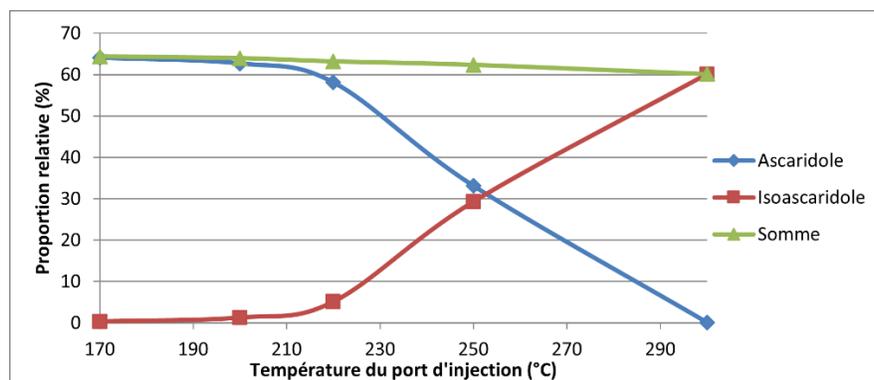
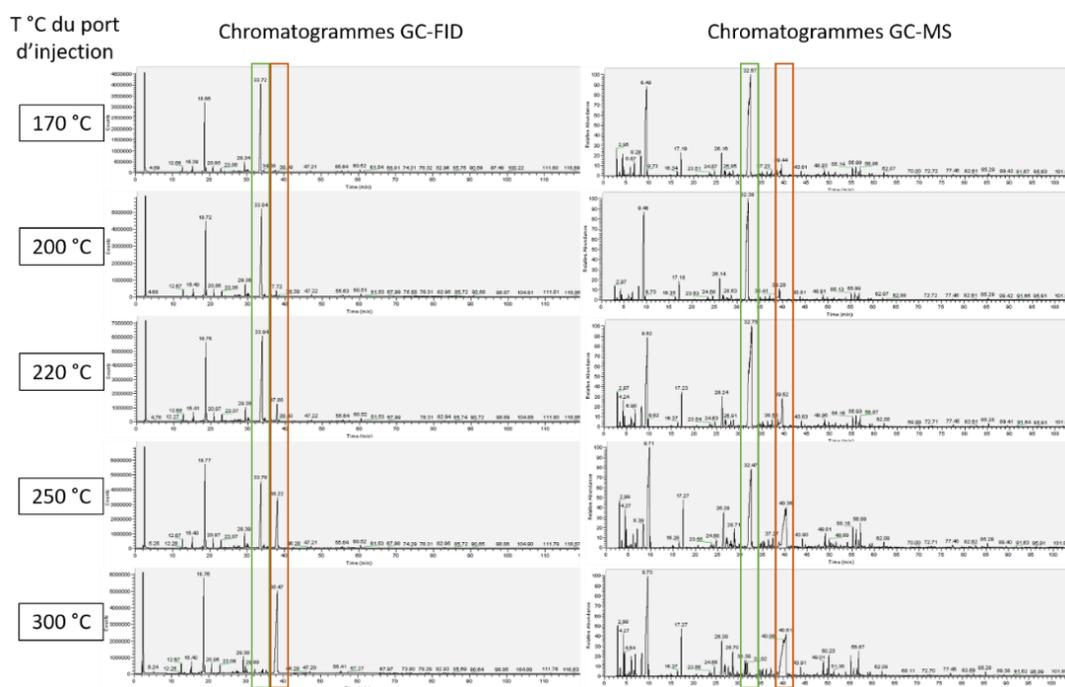


Figure 29. Graphique des proportions relatives de l'ascaridole et de son produit de dégradation, l'isoascaridole, en fonction de la température du port d'injection.

Puisqu'il est connu que l'ascaridole est instable lorsque chauffé et que les analyses en chromatographie gazeuse entraînent de la dégradation du monoterpénoïde en isoascaridole en raison du chauffage lors de l'injection¹⁶⁷, différentes températures de port d'injection ont été testées afin de sélectionner une température qui permette la quantification de l'ascaridole en limitant au maximum la dégradation en isoascaridole. Des

injections ont été faites à 170, 200, 220, 250 et 300 °C. La figure 30 montre les chromatogrammes obtenus en GC-FID et en GC-MS aux différentes températures de port d'injection. On y remarque que le pic majoritaire rétrécit avec l'augmentation de la température et qu'un second pic, identifié comme étant l'isoascaridole, apparaît et devient de plus en plus important. La figure 29 illustre la relation entre les aires des pics associés à ces deux monoterpénoïdes en fonction de la température.



Dans les cadres verts, on retrouve le pic correspondant à l'ascaridole, dans les encadrés orangés, on retrouve le pic correspondant à l'isoascaridole.

Figure 30. Dégradation de l'ascaridole en isoascaridole en fonction de la température du port d'injection.

5.2.3 *Myrica gale*

La caractérisation des échantillons d'huile essentielle de *Myrica gale* a été faite en suivant la méthodologie présentée au chapitre 1. Au tableau 12 sont présentées quelques informations résumant les résultats d'identification, avec le nombre de pics observés en GC-MS (154 – 185), le nombre de métabolites identifiés par échantillon (71 – 88) ainsi que la proportion relative qui a été identifiée ($48 \pm 2 - 80 \pm 4$ %).

Ces données indiquent déjà que les trois échantillons présentent des compositions en métabolites secondaires différentes. Les chromatogrammes GC-MS des trois échantillons qui sont présentés à la figure 31 montrent le profil chromatographique et illustrent bien ces différences au niveau de la proportion que représentent les pics.

Tableau 12. Métabolites observés et identifiés et proportion relative identifiée pour les échantillons d'huile essentielle de feuilles de *M. gale*.

Id. échantillon	Nb métabolites observés	Nb métabolites identifiés	Proportion relative identifiée (%)
MyGa EO 001	160	88	80 ± 4
MyGa EO 002	185	71	48 ± 2
MyGa EO 003	154	74	68 ± 3

Les métabolites secondaires qui ont été identifiés sont présentés au tableau 13, avec les informations sur leur identification et leur proportion relative. Quelques métabolites non identifiés y sont aussi rapportés puisqu'ils représentaient une proportion non négligeable (> 1 % du total) d'au moins un des échantillons. Les autres métabolites non identifiés ont été omis puisqu'ils étaient trop nombreux et présents en plus faible proportion.

Les structures des métabolites principaux qui ont été identifiés dans les trois échantillons d'huile essentielle de *M. gale* sont présentées à la figure 32 et rapportées par classes de métabolites. Les proportions relatives correspondant à chacune de ses classes de métabolites secondaires sont présentées également dans le tableau 13, pour les métabolites identifiés.

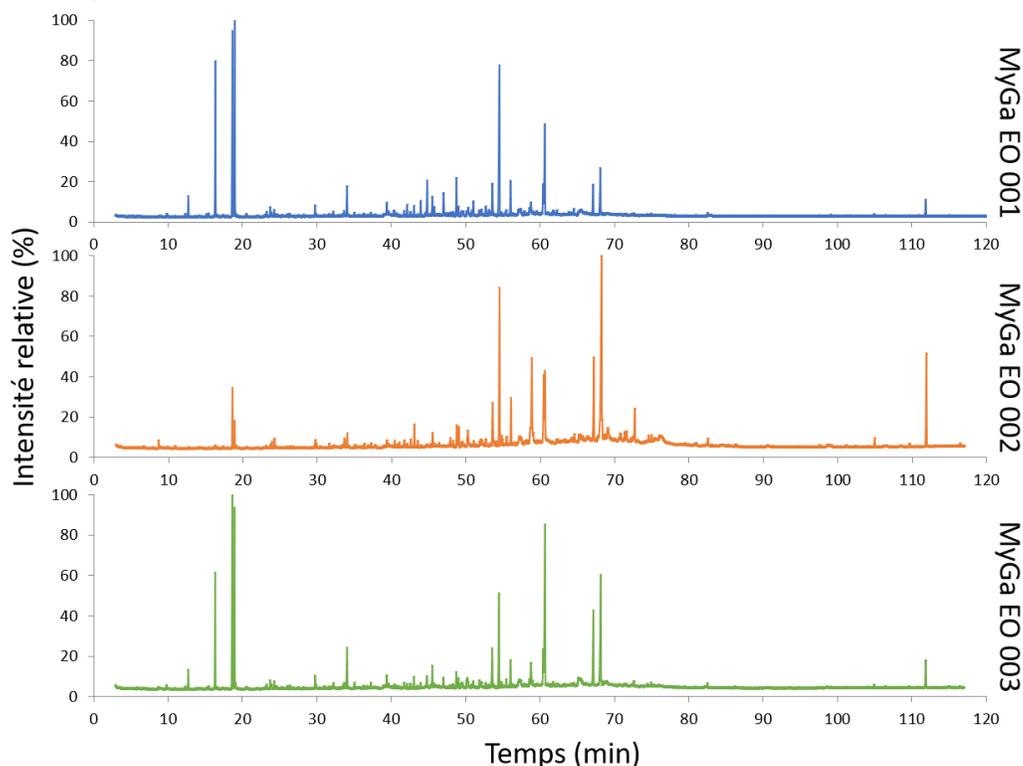


Figure 31. Chromatogrammes obtenus par analyse en GC-MS pour les trois échantillons d'huile essentielle de *M. gale* provenant de Whapmagoostui-Kuujjuarapik.

Tableau 13. Métabolites secondaires identifiés dans l'échantillon d'huile essentielle de feuilles de *Myrica gale* provenant de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.

Composés	LRI _{exp.}	LRI _{lit.}	LRI _{exp.} †	LRI _{lit.} †	Proportion relative (DB-5MS)			Méthode d'identification
	(DB-5MS)	(Apolaire semi- standard)	(HP-Innowax)	(Polaire)	[% ± écart type]			
					MyGa EO 001	MyGa EO 002	MyGa EO 003	
3-Méthyle-crotonaldéhyde	777	780 ^[A]	1206/554/610	1215/559/612	tr	tr	tr	MS, LRI ^[D] , [E]
α-Thujène*	922	924 ^[B]	1028/935/422	1028/-/-	0,14 ± 0,01	-	0,12 ± 0,01	MS, LRI ^[D] , [E]
α-Pinène*	928	932 ^[B]	1023/393/419	1028/393/427	1,01 ± 0,02	tr	0,87 ± 0,03	MS, LRI ^[D] , [E]
Camphène*	943	946 ^[B]	1073/422/456	1071/422/456	tr	-	-	MS, LRI ^[D] , [E]
Benzaldéhyde*	954	952 ^[B]	1518/882/925	1520/-/-	tr	tr	-	MS, LRI ^[D] , [E]
Sabinène*	967	969 ^[B]	1122/461/505	1124/-/-	0,12 ± 0,00	tr	tr	MS, LRI ^[D] , [E]
β-Pinène*	971	974 ^[B]	1111/449/490	1112/460/505	0,17 ± 0,01	tr	0,15 ± 0,01	MS, LRI ^[D] , [E]
6-Méthyle-hept-5-en-2-one*	982	981 ^[B]	1339/696/741	1338/701/746	tr	tr	-	MS, LRI ^[D] , [E]
Myrcène*	989	988^[B]	1164/506/562	1161/513/567	7,6 ± 0,2	tr	5,0 ± 0,2	MS, LRI^[D], [E]
p-Mentha-1(7),8-diène	1000	1003 ^[B]	1170/514/572	1183/-/-	tr	-	tr	MS, LRI ^[D] , [E]
n-Octanal	1002	1006 ^[A]	1290/648/690	1289/655/698	-	tr	tr	MS, LRI ^[D] , [E]
Acétate de (3Z)-Hexenyle	1004	1004 ^[B]	1321/677/720	1315/677/723	tr	tr	tr	MS, LRI ^[D] , [E]
p-Cymène*	1022	1020^[B]	1270/630/669	1272/635/678	10,3 ± 0,2	2,18 ± 0,09	9,3 ± 0,3	MS, LRI^[D], [E]
Limonène*	1027	1030^[A]	1201/547/606	1200/553/608	10,3 ± 0,2	0,99 ± 0,05	8,2 ± 0,3	MS, LRI^[D], [E]
1,8-cinéol*	1026	1026 ^[B]	1205/556/611	1213/559/614	-	0,10 ± 0,01	0,27 ± 0,05	MS, LRI ^[D] , [E]
(Z)-β-Ocimène*	1034	1035 ^[A]			tr	-	-	MS, LRI ^[D]
Oxyde de trans-linalool	1081	1084 ^[B]	1467/832/875	1452/-/-	-	tr	-	MS, LRI ^[D] , [E]
m-Cymenène	1084	1082 ^[B]			tr	0,11 ± 0,01	tr	MS, LRI ^[D]
6,7-Epoxymyrcène	1087	1090 ^[B]	1411/771/818	1407/-/-	0,11 ± 0,01	tr	0,24 ± 0,00	MS, LRI ^[D] , [E]
Perillène	1095	1098 ^[A]	1422/784/829	1429/-/-	0,29 ± 0,01	0,14 ± 0,00	0,39 ± 0,01	MS, LRI ^[D] , [E]
Linalool*	1097	1095 ^[B]	1554/916/959	1547/913/956	0,43 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,26 ± 0,02	MS, LRI ^[D] , [E]

α -Thujone	1100	1100 ^[A]	1414/774/821	1430/-/-	0,24 ± 0,02	tr	-	MS, LRI ^[D] , [E]
n-Nonanal*	1102	1100 ^[B]	1394/753/802	1391/751/800	0,34 ± 0,03	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,02	MS, LRI ^[D] , [E]
Solustero ^l *	1105	1102 ^[B]	1299/654/696	1290/656/699	0,11 ± 0,01	tr	0,12 ± 0,02	MS, LRI ^[D] , [E]
Oxyde de α -pinène	1109	1101 ^[A]			tr	-	0,13 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
1-Undecyne	1112	1122 ^[B]			0,11 ± 0,01	-	tr	MS, LRI ^[D]
trans- <i>p</i> -Mentha-2,8-dièn-1-ol	1116	1119 ^[B]			tr	tr	0,10 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
Oxyde de cis-limonène	1126	1132 ^[B]	1451/814/857	1452/-/-	tr	-	0,14 ± 0,02	MS, LRI ^[D] , [E]
cis- <i>p</i> -Mentha-2,8-dien-1-ol	1131	1133 ^[B]			0,13 ± 0,01	tr	0,19 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
(<i>E</i>)-Myroside	1136	1140 ^[B]	1485/850/893	1474/855/898	0,18 ± 0,00	tr	tr	MS, LRI ^[D] , [E]
Sabina cétone	1148	1154 ^[B]			tr	-	-	MS, LRI ^[D]
Karahanaenone	1166	1155 ^[A]			tr	-	-	MS, LRI ^[D]
Terpinèn-4-ol *	1173	1174 ^[B]	1597/961/1003	1593/959/1002	-	tr	-	MS, LRI ^[D] , [E]
Cryptone	1178	1183 ^[B]	1653/1013/1056	1687/-/-	0,63 ± 0,03	0,40 ± 0,01	0,67 ± 0,03	MS, LRI ^[D]
cis-Pinocarvéol	1195	1186 ^[A]			tr	-	0,14 ± 0,02	MS, LRI ^[D]
Octyl-acétate*	1210	1211 ^[B]	1478/840/883	1474/839/885	0,11 ± 0,00	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,00	MS, LRI ^[D] , [E]
trans-Carvéol	1213	1215 ^[B]	1835/1191/1232	1845/1185/1226	0,12 ± 0,01	tr	0,32 ± 0,01	MS, LRI ^[D] , [E]
cis- <i>p</i> -Mentha-1(7),8-dièn-2-ol	1225	1227 ^[B]			-	tr	-	MS, LRI ^[D]
cis-Carvéol*	1226	1226 ^[B]	1865/1221/1262	1861/1209/1251	tr	-	-	MS, LRI ^[D] , [E]
Isomère de butanoate de 3-hexenyle-2-méthyle	1228	E : 1234 ^[A] Z : 1229 ^[B]			tr	tr	-	MS, LRI ^[D]
Cuminaldéhyde	1233	1238 ^[B]	1767/1129/1169	1789/1130/1171	tr	0,15 ± 0,00	0,19 ± 0,02	MS, LRI ^[D] , [E]
Carvone*	1235	1239 ^[B]	1720/1080/1121	1740/1081/1127	0,37 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,41 ± 0,02	MS, LRI ^[D] , [E]
Butanoate d'hexyle-3-méthyle	1240	1243 ^[A]	1444/809/852	1442/810/854	1,91 ± 0,04	0,51 ± 0,01	2,29 ± 0,04	MS, LRI ^[D] , [E]
Non identifié A	1244					0,59 ± 0,02		
Acétate de linalyl	1247	1250 ^[A]			tr	0,12 ± 0,01	0,35 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
Acétate de bornyl*	1277	1284 ^[B]	1571/933/975	1581/942/984	0,18 ± 0,05	0,27 ± 0,01	0,10 ± 0,01	MS, LRI ^[D] , [E]
<i>p</i> -Cymen-7-ol	1285	1289 ^[B]	2097/1450/1488	2113/-/-	0,12 ± 0,04	-	0,34 ± 0,03	MS, LRI ^[D] , [E]
cis-2,3-Pinenediol	1314	1318 ^[B]	2193/1544/1580		0,24 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,43 ± 0,03	MS, LRI ^[D]

Non identifié B	1323				0,96 ± 0,04	0,43 ± 0,05	0,85 ± 0,05	
δ-Elemene*	1327	1335 ^[A]	1463/826/869	1470/-/-	0,32 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,26 ± 0,01	MS, LRI ^[D] , [E]
α-Cubebene*	1339	1345 ^[B]	1449/812/855	1463/838/882	0,46 ± 0,06	0,30 ± 0,02	0,27 ± 0,03	MS, LRI ^[D] , [E]
Acétate d'α-terpinyl*	1366	1346 ^[B]	1686/1049/1092	1709/925/1086	0,59 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,23 ± 0,00	MS, LRI ^[D] , [E]
α-Copaène*	1372	1374 ^[B]	1479/842/884	1492/-/-	0,31 ± 0,02	tr	0,27 ± 0,00	MS, LRI ^[D]
β-Bourbonène*	1375	1379 ^[B]	1756/1119/1159	1752/1037/1081	tr	0,40 ± 0,00	0,07 ± 0,00	MS, LRI ^[D] , [E]
β-Elemene*	1381	1389 ^[B]			0,53 ± 0,03	0,93 ± 0,01	0,60 ± 0,02	MS, LRI ^[D]
Isovalérate de benzyl*	1388	1399 ^[A]	1884/1244/1285	1899/1232/1274	0,11 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,18 ± 0,03	MS, LRI ^[D] , [E]
Sesquithujène	1396	1405 ^[B]	1552/914/957	1560/-/-	0,93 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,36 ± 0,05	MS, LRI ^[D] , [E]
(Z)-Caryophyllène*	1408	1408^[B]	1580/942/984	1589/-/-	2,09 ± 0,09	0,18 ± 0,01	0,69 ± 0,03	MS, LRI^[D], [E]
(E)-Caryophyllène*	1418	1417 ^[B]			tr	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,02	MS, LRI ^[D]
γ-Elemene*	1420	1432 ^[A]	1627/990/1033	1642/-/-	1,09 ± 0,02	0,70 ± 0,02	1,24 ± 0,03	MS, LRI ^[D] , [E]
trans-α-bergamotène*	1425	1432 ^[A]	1577/938/981	1580/-/-	0,46 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,26 ± 0,01	MS, LRI ^[D] , [E]
Guaia-6,9-diène*	1431	1442 ^[B]			tr	-	-	MS, LRI ^[D]
α-Humulène*	1443	1452 ^[B]	1649/1011/1054	1667/-/-	1,47 ± 0,07	0,11 ± 0,02	0,58 ± 0,03	MS, LRI ^[D] , [E]
Sesquisabinène	1446	1455 ^[A]			0,10 ± 0,01	-	tr	MS, LRI ^[D]
trans-β-Bergamotène	1448	1452 ^[A]	1672/1033/1075		0,12 ± 0,01	-	-	MS, LRI ^[D]
α-Acoradiène	1451	1462 ^[A]	1655/1015/1058	1690/-/-	tr	-	-	MS, LRI ^[D]
4,5-di-épi-aristolochène	1465	1469 ^[C]	1662/1023/1065	1665/-/-	0,22 ± 0,01	0,30 ± 0,06	0,18 ± 0,02	MS, LRI ^[D] , [E]
α-Curcumène*	1474	1479^[B]	1766/1126/1166	1777/-/-	2,4 ± 0,1	1,27 ± 0,01	1,11 ± 0,02	MS, LRI^[D], [E]
β-Chamigrène	1475	1476 ^[B]	1704/1065/1106	1725/-/-	0,58 ± 0,05	0,92 ± 0,02	0,60 ± 0,03	MS, LRI ^[D]
Germacrene D*	1478	1480 ^[A]			tr	-	-	MS, LRI ^[D] , [E]
β-Selinène*	1483	1489 ^[B]	1698/1059/1100	1717/-/-	0,63 ± 0,03	0,55 ± 0,02	0,47 ± 0,03	MS, LRI ^[D] , [E]
α-Murolène*	1488	1497 ^[A]	1711/1072/1113	1726/-/-	0,24 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,02	MS, LRI ^[D] , [E]
β-Bisabolène*	1500	1505 ^[B]			0,49 ± 0,05	0,13 ± 0,02	0,24 ± 0,05	MS, LRI ^[D]
Cubebol	1504	1514 ^[B]			0,14 ± 0,01	-	-	MS, LRI ^[D]
Eremophilène*	1505	1499 ^[B]			-	-	0,27 ± 0,03	MS, LRI ^[D]
Epizonarène*	1508	1506 ^[A]			0,43 ± 0,05	-	-	MS, LRI ^[D]

trans-Calamenène*	1510	1521 ^[B]	1817/1174/1214	1826/-/-	0,84 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,38 ± 0,03	MS, LRI ^[D] , [E]
Hedycaryol	1539	1544 ^[A]	2073/1425/1464	2081/-/-	0,82 ± 0,05	-	tr	MS, LRI ^[D] , [E]
Germacrène B*	1544	1557 ^[A]			0,63 ± 0,01	-	0,37 ± 0,03	MS, LRI ^[D]
Hydrate de cis-sesquisabinène	1547	1544 ^[A]			tr	-	-	MS, LRI ^[D]
(E)-Nérolidol *	1557	1561^[A]	2045/1397/1437	2034/1391/1431	2,44 ± 0,08	2,61 ± 0,09	2,76 ± 0,01	MS, LRI^[D], [E]
Oxyde de caryophyllène*	1569	1582^[B]	1956/1311/1350	1989/1325/1364	11,8 ± 0,5	7,5 ± 0,2	5,49 ± 0,03	MS, LRI^[D], [E]
cis-β-Elemenone*	1586	1589 ^[B]	2068/1422/1462	2070/-/-	0,54 ± 0,05	0,45 ± 0,03	0,54 ± 0,03	MS, LRI ^[D] , [E]
Époxyde d'humulène II*	1594	1608^[B]	2011/1365/1402	2045/-/-	2,05 ± 0,1	2,20 ± 0,06	1,64 ± 0,01	MS, LRI^[D]
Eremoligenol*	1619	1627 ^[A]	2161/1513/1549	2191/-/-	0,69 ± 0,04	0,64 ± 0,03	0,64 ± 0,02	MS, LRI ^[D]
Épicubanol*	1629	1627 ^[B]	2039/1391/1430	2067/-/-	0,25 ± 0,03	0,33 ± 0,06	0,28 ± 0,07	MS, LRI ^[D]
α-Acorenol	1635	1634 ^[A]	2115/1468/1506	2127/-/-	tr	-	-	MS, LRI ^[D] , [E]
Non identifié C	1640				0,54 ± 0,02	1,1 ± 0,1	0,60 ± 0,05	
Pogostol	1644	1650^[A]	2233/1581/1618	2216/-/-	1,1 ± 0,1	5,8 ± 0,1	1,82 ± 0,08	MS, LRI^[D], [E]
14-hydroxy-(Z)-Caryophyllène	1658	1664 ^[A]	2360/1707/1742		0,15 ± 0,05	0,34 ± 0,06	-	MS, LRI ^[D]
Épi-β-bisabolol	1661	1670 ^[B]			0,30 ± 0,02	0,35 ± 0,05	0,26 ± 0,06	MS, LRI ^[D]
Épi-α-Bisabolol	1677	1679^[A]	2209/1559/1595	2210/-/-	2,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1	2,37 ± 0,05	MS, LRI^[D], [E]
Germacrone*	1680	1693^[B]	2199/1551/1588	2217/-/-	6,4 ± 0,3	4,0 ± 0,2	10,9 ± 0,1	MS, LRI^[D], [E]
Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol	1694	1685 ^[B]			0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
β-Acoradienol	1755	1760 ^[A]			1,27 ± 0,09	0,58 ± 0,09	1,2 ± 0,3	MS, LRI ^[D]
Non identifié D	1799		2506/1849/1884		2,0 ± 0,2	4,4 ± 0,1	4,64 ± 0,09	
Non identifié E + Non-identifié F	1819		2567/1909/1943†		3,5 ± 0,3	14,5 ± 0,7	8,1 ± 0,1	
Non identifié G	1836				-	1,7 ± 0,2	-	
Non identifié H	1910				-	1,73 ± 0,04	-	
Non identifié I	1965				0,14 ± 0,01	2,4 ± 0,3	0,18 ± 0,05	
n-Heptacosane	2699	2700 ^[A]			0,13 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,17 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
n-Nonacosane	2901	2900^[A]	2895/2228/2261	2900/2268/2305	1,2 ± 0,3	4,5 ± 0,1	1,61 ± 0,04	MS, LRI^[D], [E]
Terpénoïdes					79 ± 4	42 ± 2	65 ± 2	

Monoterpènes	30 ± 1	3,4 ± 0,2	24 ± 0,8
Monoterpénoïdes	3,7 ± 0,4	2,9 ± 0,2	4,9 ± 0,3
Sesquiterpènes	15 ± 1	6,5 ± 0,3	8,6 ± 0,5
Sesquiterpénoïdes	30 ± 2	29 ± 1	28,2 ± 0,8
Autres	2,3 ± 0,5	6,6 ± 0,3	2,9 ± 0,2
Proportion totale de composés identifiés	81 ± 4	48 ± 2	68 ± 3

Les indices de rétention linéaire (LRI) provenant de la littérature qui sont présentés dans le tableau 13 sont les valeurs les plus proches des valeurs expérimentales selon les sources : [A] FFNSC 3⁹²; [B] Robert P. Adams⁹³; [C] NIST 14⁹⁴

[D] : Identification à partir de l'indice de rétention sur colonne non polaire semi-standard.

[E] : Identification à partir de l'indice de rétention sur colonne polaire.

† : Indices de rétention sur colonne polaire obtenus en fonction des séries de standards présentées selon l'ordre suivant : n-alcane^[C] /FAEEs^[A] /FAMEs^[A].

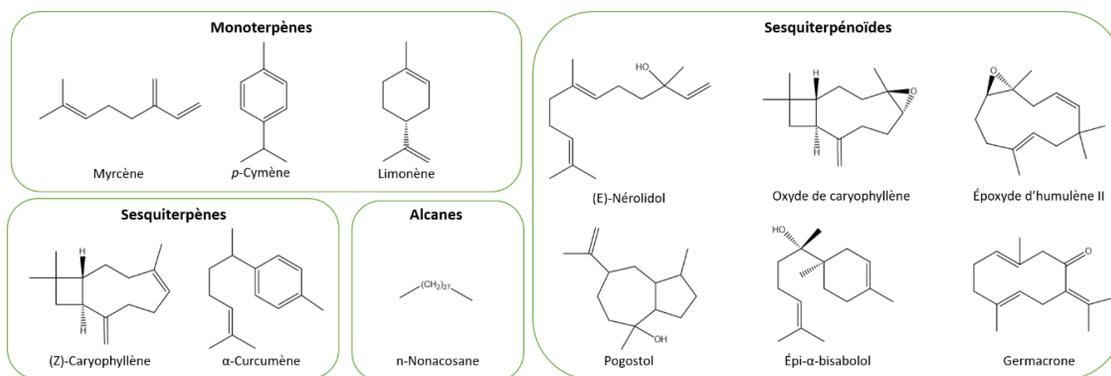
* : Composés observés dans des échantillons d'huile essentielle de *M. gale* rapportés dans la littérature.^{142, 144, 146, 149-151, 162, 163}

Gras : Métabolites principaux (> 2 % de la composition totale).

tr: La proportion relative est indiquée comme trace (tr) pour les valeurs < 0.1 %.

Spectres de masse des composés non identifiés: A : m/z=97 (100), 107 (74), 55 (54), 53 (46), 93 (38), 79 (31), 81 (29); B : m/z=97 (100), 55 (46), 107 (44), 53 (34), 81 (21); C : m/z=59 (100), 55 (60), 79 (58), 73 (51), 91 (51), 93 (47), 53 (44), 81 (44), 67 (44), 77 (44); D : m/z=107 (100), 67 (719), 53 (577), 91 (57), 55 (57), 79 (48), 77 (44), 93 (42), 105 (36), 68 (36); E : m/z=68 (100), 67 (79), 53 (51), 55 (26), 79 (26), 167 (24), 69 (23 (121 (20), 91 (19)); F : m/z=149 (100), 91 (83), 53 (80), 55 (78), 67 (76), 77 (65), 79 (61), 105 (61), 107 (52), 68 (44); G : m/z=55 (100), 105 (88), 67 (78), 79 (77), 91 (76), 53 (76), 77 (67), 93 (63), 107 (61), 95 (60); H : m/z=67 (100), 55 (98), 53 (90), 79 (73), 81 (63), 97 (61), 69 (60), 68 (53), 107 (51), 95 (43); I : m/z=67 (100), 53 (98), 55 (96), 91 (874), 77 (86), 79 (82), 234 (78), 105 (67), 107 (62), 93 (57).

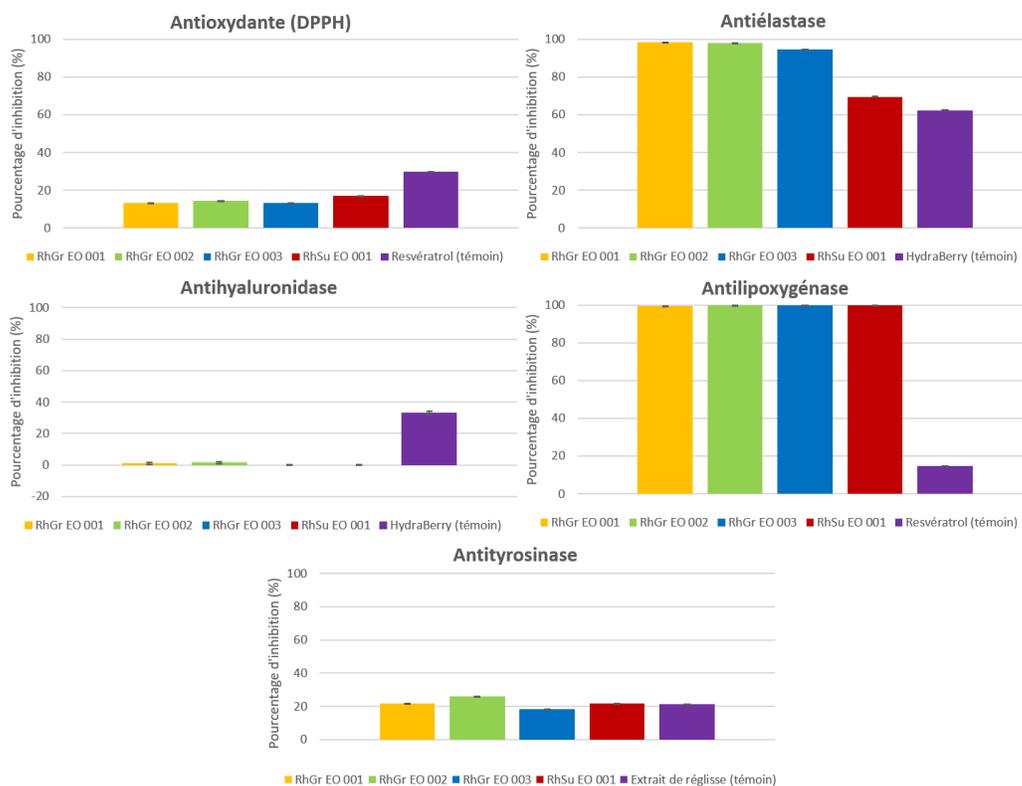
‡ LRI en phase polaire pour le composé non identifié E.



Les métabolites représentant plus de 2 % de la proportion totale d'un des échantillons d'huile essentielle de *M. gale* sont présentés ici.

Figure 32. Structures des métabolites principaux des huiles essentielles de *M. gale* en provenance de Whapmagoostui-Kuujuarapik.

5.3 Activités biologiques



La bande mauve correspond à l'activité d'un témoin positif.

Figure 33. Résultats de tests préliminaires d'évaluation d'activités biologiques à applications cosméceutiques pour les échantillons d'huile essentielle de *Rhododendron groenlandicum* et de *Rhododendron subarcticum*.

Quelques activités biologiques ont été évaluées pour les huiles essentielles préparées des feuilles de *R. groenlandicum* et *R. subarcticum*. Ces activités visent à évaluer le potentiel de ces huiles essentielles pour des applications dans le domaine de la cosméceutique, principalement. Les résultats des premiers tests effectués rapportent le pourcentage d'inhibition observé *in vitro* pour des activités antioxydante, antiélastase, antihyaluronidase, antilipoxygénase et antityrosinase. Les résultats compilés sont présentés en graphiques à la figure 33, avec le pourcentage d'inhibition d'un témoin positif. Les données sont rapportées comme des moyennes de l'activité observées pour trois répliques par échantillon et l'écart type est rapporté sous la forme d'une barre d'erreur (les écarts types sont faibles et les barres d'erreur sont peu visibles sur les graphiques).

5.4 Discussion

5.4.1 *Rhododendron groenlandicum*

Les rendements obtenus peuvent difficilement être comparés avec la littérature pour les huiles essentielles de *R. groenlandicum*, car le rendement est rarement rapporté dans les articles trouvés pour cette espèce et la seule mention qui en est faite est d'un rendement calculé par rapport à la masse fraîche¹⁰³, une valeur qui est difficile à comparer avec confiance, car la teneur en eau peut être très variable⁸⁴. Il s'agit malgré cela d'un bon rendement qui se compare avec ce qui est obtenu pour des plantes assez riches en huile essentielle comme le *R. tomentosum*.¹²⁶ Le rendement des trois échantillons est assez semblable, bien que l'échantillon RhGr EO 003 ait été produit avec un rendement légèrement plus élevé. Les proportions relatives qui ont pu être identifiées (86 – 91 %) sont assez grandes et permettent d'obtenir un portrait assez global de la composition de ces huiles essentielles. Il est courant, dans la littérature, d'observer des proportions identifiées autour de 90 %.

La grande majorité des métabolites secondaires volatils qui ont été identifiés ont déjà été rapportés dans la littérature¹⁰²⁻¹⁰⁵ pour des huiles essentielles de *R. groenlandicum*, provenant généralement de la portion sud de la forêt boréale, avec quelques exceptions : des composés retrouvés à l'état de trace et pas dans tous les échantillons comme le 1,8-cinéole, le *p*-mentha-1(7),8-diène, le fenchone, le 1,3,8-*p*-menthatriène, le camphre, le 2-(1Z)-propenyl-phénol; des composés en faible concentration comme l' α -thujone, le trans-*p*-menth-2-èn-1ol, le pentyl cyclohexa-1,3-diène, la cryptone, la cis-dihydrocarvone, le verbenone, le phellandral, l'alcool périllique, le 1,10-di-épi-cubénol, le 14-hydroxy-(Z)-caryophyllène; et un composé présent en proportion importante : le cedroxyde, dont l'identification serait à confirmer puisque son spectre de masse ressemble à celui de plusieurs sesquiterpénoïdes et ses LRI aussi. Les compositions qui ont été rapportées dans la littérature ne permettent pas d'éclaircir l'identification de ce composé puisqu'aucun composé n'est rapporté pour un LRI autour de 1709 avec un tel spectre de masse.

Tableau 14. Proposition de chimiotypes en fonction des compositions en métabolites secondaires observés et rapportés dans la littérature pour *R. groenlandicum*.

Chimiotype	Composés majoritaires
I	Sabinène -
II	β -Sélinène -
III	Limonène -
IV	β -Bisabolène -
V	Germacrone -
VI	Limonène β -Sélinène
VII	β -Sélinène Sabinène

Les métabolites majoritaires fréquemment rapportés dans la littérature sont pour la plupart observés dans les huiles essentielles préparées à partir d'échantillons de la nordicité, à l'exception du β -bisabolène, un sesquiterpène qui est parfois très abondant dans certains échantillons et absent dans d'autres, selon ce qui a été observé précédemment.¹⁰²

Les chimiotypes présentés au tableau 14 sont une proposition qui est faite ici sur la base des compositions moléculaires rapportées jusqu'ici pour l'huile essentielle de *R. groenlandicum*, en se basant sur la littérature¹⁰²⁻¹⁰⁵ ainsi que les résultats expérimentaux obtenus dans le cadre des travaux concernés ici. Ils sont établis en fonction du ou des métabolites majoritaires (minimalement 10% de la composition totale de l'huile essentielle). Les compositions moléculaires considérées sont celles étant rapportées pour des huiles essentielles correspondant à la description donnée plus haut (norme ISO 9235)⁴⁷ et préparées à partir de *Rhododendron groenlandicum* (Oeder) Kron & Judd, identifié ainsi ou par ses autres noms reconnus : *Ledum groenlandicum* Oeder et *Ledum palustre* Linnaeus subsp. *Groenlandicum* (Oeder) Hultén. Il s'agit d'une proposition et l'établissement de ces chimiotypes n'a pas été faite à l'aide d'analyses statistiques multivariées comme il est de plus en plus courant de le faire.^{65, 168-170} Ils sont utilisés ici pour illustrer la grande variabilité observée dans la littérature au niveau des composés majoritaires retrouvés dans les huiles essentielles de ce thé du Labrador.

Les échantillons récoltés au Nunavik et analysés pendant cette maîtrise peuvent être comparés à ce qui a déjà été préparé dans la littérature, mais sans entrer dans les détails de la composition moléculaire. En effet, le grand nombre de paramètres pouvant entraîner des compositions moléculaires différentes fait en sorte qu'il est peu pertinent de comparer les proportions de tous les métabolites observés. La détermination d'un pourcentage d'abondance relative est la méthode la plus couramment utilisée, la plus simple, mais son utilité pour la comparaison d'échantillons est discutable. Elle est souvent employée pour des comparaisons dans la

littérature, entre plusieurs échantillons, mais il faut être prudent avec ce type d'analyse qui produit des comparaisons hasardeuses et peu fiables en raison de la grande variabilité qui peut être induite à plusieurs étapes. Outre la récolte, le traitement de la matière première et le mode de préparation des extraits, qui sont des impondérables communs à toutes les méthodes de quantification, la quantification à l'aide de pourcentages relatifs d'abondance ne permet pas de tenir compte des concentrations réelles dans l'extrait, qui nécessiterait au minimum un étalon interne, mais aussi de calculer les concentrations par rapport à des composés communs à tous les échantillons. Évidemment, la méthode d'intégration et de calcul engendre aussi des biais difficiles à contrôler lors de comparaison avec la littérature.⁷² De plus, comme les échantillons préparés représentent en réalité la moyenne des compositions d'un ensemble de feuilles provenant de multiples arbustes, la composition moléculaire n'est possiblement pas représentative de l'huile essentielle produite par les individus, elle représente uniquement une huile essentielle au même titre que ce qui est généralement rapporté dans la littérature et que ce qui est commercialisé. Il faut également garder en tête que les pourcentages de proportion relative qui sont rapportés sont des moyennes de trois répliques et que les écarts types associés à ces pourcentages sont parfois assez grands, pour différentes raisons. Ils peuvent être dû, comme ce fut le cas pour plusieurs pics dans les chromatogrammes des échantillons d'huile essentielle de *R. groenlandicum*, à une mauvaise résolution des pics. En effet, puisque plusieurs métabolites retrouvés dans les huiles essentielles ont des structures et des propriétés physicochimiques très semblables, il est parfois très difficile de les séparer en chromatographie gazeuse pour bien les quantifier tout en utilisant des colonnes standards permettant le calcul des LRI pour pouvoir faire la correspondance avec les résultats d'analyses (identification) en GC-MS. D'autres raisons peuvent expliquer ces écarts types comme une variabilité liée à l'intégration manuelle des chromatogrammes ou encore une certaine variabilité de l'appareil. Il demeure intéressant, malgré cela, de faire ces comparaisons au niveau des métabolites secondaires volatils principaux, sans tenir compte de la proportion relative exacte qui est rapportée.

Les échantillons RhGr EO 001 et RhGr EO 003 contiennent chacun le β -sélinène comme composé majoritaire suivi du myrtenal, du *cis-p*-mentha-1(7),8-dièn-2-ol et du *trans-p*-mentha-1(7),8-dièn-2-ol. Le premier, un sesquiterpène, a plusieurs fois été rapporté comme étant un composé important ou le composé majoritaire dans les huiles essentielles de *R. groenlandicum*. Les trois autres composés sont aussi fréquemment parmi les principaux métabolites.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Ces deux échantillons appartiendraient au chimiotype composé majoritairement de β -sélinène. L'échantillon RhGr EO 002, quant à lui, est composé de deux métabolites principaux avec une proportion relative assez semblable, soit le sabinène et le β -sélinène. Le sabinène est aussi fréquent dans les huiles essentielles de cette espèce et est parfois le principal métabolite.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Cet échantillon serait attribué au chimiotype caractérisé par ces deux métabolites majoritaires, un chimiotype qui a déjà été observé aussi. Le sabinène est bien moins présent dans les deux autres échantillons, mais il est tout de même présent en proportion non négligeable. Si les proportions de sabinène et de β -sélinène observées dans ces

échantillons sont représentatives des plants desquels proviennent les feuilles ou s'il ne s'agit que d'une moyenne avec des plants contenant beaucoup de sabinène et d'autres beaucoup de β -sélinène, il n'est pas possible de le déterminer avec les résultats que nous avons. Il en va de même pour tous les composés.

Ainsi, les trois échantillons préparés à partir des feuilles de *R. groenlandicum* en provenance de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik présentent des compositions moléculaires qui sont légèrement différentes, mais les composés principaux qui y sont retrouvés sont assez similaires, comme en font foi les résultats présentés au tableau 9. Ils ne correspondent pas à de nouveaux chimiotypes et leurs compositions sont assez conformes à des compositions qui ont déjà été observées ailleurs au Québec.

5.4.2 *Rhododendron subarcticum*

Dans le cas de l'huile essentielle de *R. subarcticum*, le rendement de 1,18 % s'est avéré dans les chiffres généralement rapportés dans la littérature, qui s'étendent entre 0,3 %¹²⁸ et 2,0 %¹²⁶. Le rendement de production des huiles essentielles de *R. subarcticum* est connu pour varier de manière considérable selon la durée de la distillation¹²⁹, la période de récolte¹²¹ ainsi que l'âge des plants et des feuilles utilisées¹¹². Le rendement de production n'est pas ici un paramètre qui est utilisé pour une comparaison outre que pour vérifier qu'il se situe dans les valeurs attendues.

La proportion relative qui a été identifiée pour l'échantillon RhSu EO 001 est très élevée (99 %) et permet de bien connaître les métabolites qui le composent. On peut remarquer qu'un des métabolites, l'ascaridole, est très fortement majoritaire dans cet échantillon (65 %), suivi du *p*-cymène (21 %). Ces deux métabolites ensemble correspondent à 86 % de l'huile essentielle. Les données de RMN ¹H ont permis de confirmer l'identification de l'ascaridole qui avait été faite par GC-MS. Le spectre obtenu correspond à ce qui est rapporté dans la littérature.^{171, 172} Cependant, il y a une différence entre l'indice de rétention obtenu sur colonne polaire et l'indice de rétention qui est rapporté dans la base de données NIST 14, sur un même type de colonne. En effet, au tableau 11, on peut voir que le LRI expérimental obtenu est de 1712 par rapport à une série de *n*-alcane. Dans les bases de données consultées et dans la littérature, seul le LRI calculé selon cette série de standards a été retrouvé. Dans la base de données NIST 14, le LRI, qui correspond à une moyenne de LRI retrouvés dans la littérature est de 1889. En consultant la littérature, certains auteurs ont bel et bien rapporté un LRI proche de cette valeur^{128, 173}, mais l'on retrouve aussi un LRI plus proche de ce qui a été obtenu lors de l'analyse de l'échantillon RhSu EO 001¹⁶⁷. Avec la correspondance des LRI en phase apolaire, du spectre de masse et des spectres RMN, l'identification est considérée comme fiable malgré ce point.

La composition moléculaire de l'huile essentielle de *Rhododendron subarcticum* n'est rapportée nulle part dans la littérature, sous ce nom, mais comme expliqué plus haut, il semble souvent être considéré comme

appartenant à la même espèce que le *Rhododendron tomentosum*, aussi appelé *L. palustre*. Aucune huile essentielle de cet arbuste, peu importe le nom qui lui est accordé, n'a été rapportée et caractérisée en la préparant de matière végétale provenant d'Amérique du Nord. Ainsi, il s'agit ici soit de la première caractérisation de l'huile essentielle de *Rhododendron tomentosum*, aussi appelé *L. palustre*, provenant d'ailleurs que de l'Europe et du nord de l'Asie, soit de la première caractérisation de l'huile essentielle de *R. subarcticum*. Selon les chimiotypes de *Rhododendron tomentosum* rapportés dans la littérature¹²³ et présentés au tableau 5, il s'agit d'une huile essentielle qui peut présenter des compositions moléculaires très variées avec des composés majoritaires différents, en fonction de nombreux paramètres. L'échantillon provenant des environs de la rivière Boniface, au Nunavik, Québec, Canada, correspond au chimiotype caractérisé par l'ascaridole ainsi que le *p*-cymène comme métabolites secondaires majoritaires. Il s'agit d'un chimiotype qui a déjà été observé à différents endroits, en Finlande, en Lituanie, en Russie et en Chine. Cette composition moléculaire ne peut être rattachée à des facteurs précis ou à un type d'environnement en particulier, étant donné la variété d'endroits où il a été observé.

La plupart des métabolites qui ont été identifiés ont déjà été observés dans des huiles essentielles d'autres échantillons présentés dans la littérature et préparés à partir de matière végétale correspondant à l'un des noms qui peuvent être associés au *Rhododendron tomentosum* ou au *Ledum palustre*. Quelques métabolites n'ont été retrouvés dans aucun article publié concernant la composition moléculaire d'huiles essentielles de ces végétaux : le vinyl amyl carbinol, le camphre, le thuj-3-èn-10-al, la cryptone et le 3-méthyl-6-(1-méthyléthyl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-one. Ces composés étaient présents en faible proportion. Seuls le thuj-3-èn-10-al (0,25 %) et le 3-méthyl-6-(1-méthyléthyl)-7-oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-one (0,47 %) ne sont pas considérés comme étant à l'état de trace.

Les expériences qui ont été faites sur la température du port d'injection et la dégradation de l'ascaridole n'ont été faites qu'avec un seul réplica. Ces résultats devraient être confirmés en injectant en triplicata pour avoir des proportions fiables, mais ils permettent tout de même une comparaison préliminaire et permettent de bien déceler la tendance pour l'ascaridole et son produit de décomposition, l'isoascaridole. Il a été décidé, sur la base de ces résultats, que l'analyse semi-quantitative serait préférablement faite à une température de 170 °C, température à laquelle l'ascaridole ne semble pas se décomposer, du moins par en grande proportion, en isoascaridole, puisque ce second composé est très peu présent à cette température. La présence de l'isoascaridole (0,34 %), malgré l'injection à plus basse température, peut être due à la présence réelle de ce métabolite dans l'huile essentielle ou encore à une légère dégradation de l'ascaridole à l'injection (la dégradation de l'ascaridole est rapportée à 150 °C¹⁶⁷). L'injection en GC-FID à 170 °C permet d'éviter de faire ce qui est fréquemment rapporté dans la littérature pour les huiles essentielles contenant de l'ascaridole, soit d'ajouter

le pourcentage d'ascaridole et d'isoascaridole^{128, 167} pour le rapporter comme étant entièrement de l'ascaridole. L'impact sur le reste de la composition en métabolites secondaires a semblé faible.

5.4.3 *Myrica gale*

L'huile essentielle de *Myrica gale* a déjà été étudiée à quelques reprises, avec des échantillons provenant de différents endroits, mais jamais en provenance de la nordicité, en Amérique du Nord. Les trois échantillons qui sont présentés plus haut sont les premiers qui sont préparés à partir de feuilles provenant du Nunavik. Les rendements (0,06 – 0,22 %) qui ont été obtenus sont bas et n'ont pas permis d'obtenir une quantité d'huile essentielle permettant de pousser les analyses de la composition moléculaire. Il a déjà été rapporté que les rendements sont plutôt faibles pour le myrique baumier et que l'extraction à plus grande échelle peut entraîner un rendement plus faible. Également, il a été observé que le rendement en huile essentielle du myrique baumier diminue durant les mois d'été, jusqu'en août, pour ensuite remonter en septembre.¹⁴² Les huiles essentielles de myrique baumier du Nunavik ont été préparées de feuilles récoltées en juillet. De plus, les huiles essentielles de *M. gale* sont souvent préparées à partir de feuilles sèches, ce qui peut permettre d'améliorer le rendement comme c'est parfois le cas pour certaines huiles essentielles.⁸⁶ Ici, les feuilles ont été utilisées fraîches pour tenter d'obtenir un portrait plus réel de ce que les feuilles contiennent au moment de la récolte.

Malgré cela, plusieurs métabolites ont pu être identifiés. La proportion relative qui a été identifiée est assez variable d'un échantillon à l'autre (48 – 81 %) en raison de différences considérables dans la composition moléculaire des trois échantillons, malgré qu'ils aient été récoltés tous les trois sur un même site, d'une superficie très restreinte, en bordure de la Grande rivière de la Baleine. Les trois échantillons ont été récoltés chacun dans un coin d'un petit site d'échantillonnage. Ici aussi, il faut garder en tête que la composition est en fait une moyenne de la composition de feuilles récoltées sur plusieurs plants différents et ne reflète pas le métabolisme des individus pris séparément. Des variations importantes de la composition moléculaire de certaines plantes récoltées dans une région très restreinte ont déjà été observées, comme il a été mentionné plus haut. Il est déjà connu que certaines espèces sont plus variables que d'autres pour la composition en métabolites secondaires de leur huile essentielle.⁴⁵ Il est possible que ce soit le cas pour le myrique baumier, une plante très odorante.

Les chimiotypes des huiles essentielles de *Myrica gale* n'ont jamais été définis, mais il semble que les métabolites majoritaires soient assez variables. Pour les trois échantillons présentés ici, en provenance du Nunavik, les métabolites majoritaires sont différents selon l'échantillon. Pour MyGa EO 001, il s'agit de l'oxyde de caryophyllène (12 %), du *p*-cymène (10,3 %) et du limonène (10,3 %). Dans le cas de l'échantillon MyGa EO 002, il s'agit d'un métabolite qui n'a pu être identifié et quantifié de manière fiable puisque son pic n'est pas résolu avec le pic d'un autre composé. Ce composé non identifié est présent également dans les échantillons

001 et 003, mais en proportion bien moindre, en étant toujours difficile à quantifier en raison de la présence d'un second pic non résolu. L'échantillon 002 contient tout de même une quantité importante d'oxyde de caryophyllène (7,5 %), mais beaucoup moins de *p*-cymène (2,18 %) et de limonène (0,99 %), en comparaison avec l'échantillon 001. Dans l'échantillon 003, le germacrene est majoritaire (10,9 %), suivi du *p*-cymène (9,3 %) et du limonène (8,2 %). Le germacrene a été retrouvé également dans les deux autres échantillons à hauteur de 6,4 et 4,0 % pour les échantillons 001 et 002 respectivement. Ces composés, mis à part les composés non identifiés, sont souvent retrouvés dans les huiles essentielles rapportées, parfois majoritaires ou en proportion importante. Parmi les autres composés retrouvés en proportion importante dans les huiles essentielles provenant du Nunavik, il y a des métabolites secondaires fréquents dans les huiles essentielles de myrique baumier comme le myrcène, le (*Z*)-caryophyllène, l' α -curcumène, le (*E*)-nérolidol et l'époxyde d'humulène II, le myrcène étant d'ailleurs parfois un des métabolites majoritaires. On retrouve aussi des métabolites qui n'ont jamais été rapportés dans l'huile essentielle de myrique baumier soit le pogostol et l'épi- α -bisabolol. De plus, des métabolites non identifiés sont présents en quantité importante, il aurait été intéressant d'avoir accès à plus d'huile essentielle pour les isoler et les identifier, en particulier dans l'échantillon MyGa EO 002.

5.4.4 Activités biologiques

Les résultats d'activité d'inhibition de différentes enzymes qui sont présentées à la figure 33 sont des résultats préliminaires, obtenus *in vitro*, en plaques 96 puits. Il s'agit de premiers essais pour guider les choix de tests qu'il serait intéressant de poursuivre ensuite. Les huiles essentielles présentées dans ce chapitre ont toutes déjà démontré des activités biologiques intéressantes, mais la composition moléculaire variable des huiles essentielles fait en sorte qu'une activité rapportée n'est pas forcément valable pour les autres huiles essentielles de la même espèce et parfois elle n'est pas valable non plus pour les huiles essentielles du même chimiotype. En effet, il a été rapporté dans plusieurs études qu'il peut y avoir une synergie entre les différents métabolites constituant une huile essentielle et que l'activité biologique est plus grande que la somme des activités biologiques des métabolites pris individuellement ou encore que l'activité peut être liée à des métabolites moins concentrés qui sont négligés lors de l'identification du chimiotype.^{65, 174, 175} Cette synergie a déjà été observée entre l'ascaridole et d'autres métabolites¹⁷⁶ et possiblement entre l'ascaridole et le *p*-cymène¹²⁸, les deux métabolites majoritaires de l'échantillon d'huile essentielle de *R. subarcticum* présentée ici.

Parmi les résultats obtenus, les huiles essentielles de *Rhododendron groenlandicum* et de *Rhododendron subarcticum* ont présenté des tendances similaires, avec des activités intéressantes vis-à-vis des mêmes enzymes et des activités faibles, également vis-à-vis des mêmes enzymes. Il est possible que leur activité ne soit pas uniquement due à leurs métabolites principaux, étant donné que les huiles essentielles obtenues de ces deux espèces de thé du Labrador sont constituées de métabolites majoritaires très différents.

Il est aussi possible que différents métabolites secondaires présentent des activités similaires, leurs structures étant parfois proches, étant donné qu'il s'agit ici de différents terpénoïdes.

Ainsi, leur activité antioxydante au test du DPPH s'est avérée faible. Il ne s'agit donc pas de bons candidats pour cette utilisation. De même, les huiles essentielles évaluées n'ont pas inhibé l'activité de l'enzyme hyaluronidase. Dans le cas de l'activité antioxydante, une huile essentielle de *Rhododendron groenlandicum* composé majoritairement de sabinène (16,1 %), de β -sélinène (7,4 %) et de terpinèn-4-ol (6,3 %) avait déjà montré un bon potentiel au test du DPPH, avec un IC_{50} assez bas, de deux fois celui de l'huile essentielle d'eucalyptus, reconnu comme un bon antioxydant.¹⁰⁴ Le sabinène est le composé majoritaire de l'échantillon RhGr EO 002, avec le β -sélinène, et ce dernier est le métabolite principal des échantillons RhGr EO 001 et 003, mais le terpinèn-4-ol y est retrouvé en proportion moins grande que dans l'échantillon testé par les auteurs de l'étude présentée. De même, des variations au niveau des autres métabolites peuvent expliquer que l'activité observée lors des essais présentés pour les extraits provenant du Nunavik n'ait pas été particulièrement bonne.

En contrepartie, leur activité antityrosinase a surpassé le témoin, pour chaque huile essentielle testée avec l'échantillon RhGr EO 002 légèrement en tête. Il s'agit d'un résultat qui laisse entrevoir le potentiel de ces échantillons et ces huiles essentielles pourront être soumises à de nouvelles évaluations de leur activité d'inhibition de l'enzyme tyrosinase, une enzyme impliquée dans la mélanogénèse et dont l'activité d'inhibition est recherchée pour le développement de produits cosméceutiques pour le blanchiment de la peau.¹⁷⁷

Pour ce qui est de l'évaluation de l'activité antiélastase, les résultats ont aussi été encourageants. Les trois échantillons d'huile essentielle de *Rhododendron groenlandicum* ont inhibé l'activité de l'enzyme à plus de 90 % alors que l'échantillon d'huile essentielle de *Rhododendron subarcticum*, malgré un effet moins marqué, a tout de même surpassé le standard, un extrait de framboises commercial. Cette activité des huiles essentielles testées sera évaluée plus en détail à l'aide de tests subséquents. L'élastase est une enzyme qui digère l'élastine, une protéine qui est impliquée dans la fermeté de la peau.¹⁷⁸ L'activité antiélastase est utilisée en cosméceutique pour les soins de la peau pour contrer les effets du vieillissement.¹⁷⁹

La dernière activité qui a été évaluée est l'inhibition des lipoxgénases, des enzymes impliquées dans l'inflammation à plusieurs niveaux et pour différents problèmes de santé.¹⁸⁰ Le test qui a été effectué pour les huiles essentielles des deux *Rhododendron* présentées ici ont mis en lumière de très fortes activités de ces extraits, avec des inhibitions de 100 % de l'activité de l'enzyme utilisée pour chacun d'entre eux. Ces résultats devront aussi être évalués à nouveau avec des tests utilisant des lipoxgénases humaines ou encore des tests avec des cellules pour vérifier les activités observées lors de ces premiers essais *in vitro*, mais ces huiles essentielles ont montré un bon potentiel.

Dans le cas de l'huile essentielle de *R. subarcticum* contenant une grande proportion d'ascaridole, il est important de mentionner qu'avant d'envisager son application à des soins de la peau, il faudra considérer son effet sensibilisant. En effet, l'ascaridole, un monoterpénoïde qui contient un peroxyde endocyclique, est considéré comme responsable de réactions allergiques au contact de l'huile essentielle d'espèces des genres *Chenopodium* et *Melaleuca*.¹⁸¹ La sensibilisation de la peau par les huiles essentielles riches en ascaridole a été rapportée à plusieurs reprises.¹⁸¹⁻¹⁸⁶

En considérant les résultats obtenus, il apparaît que ces huiles essentielles de *R. groenlandicum* et de *R. subarcticum* méritent d'être évaluées plus en détail pour leurs activités biologiques puisqu'elles ont démontré au moins une certaine activité biologique vis-à-vis de quelques enzymes.

5.5 Conclusion

Le projet de recherche qui a été présenté dans ce chapitre visait plusieurs objectifs. Au cours des travaux, il a été possible de récolter de la matière végétale au Nunavik, dans une région de la nordicité, au Québec, et d'utiliser cette matière pour préparer des huiles essentielles et les analyser pour en connaître la composition en métabolites secondaires. Une proportion importante des huiles essentielles de *R. groenlandicum* a été identifiée, de même que celle de *Rhododendron subarcticum*, alors que des proportions plus ou moins grandes des huiles essentielles de *Myrica gale* ont pu être identifiées. La plupart des métabolites principaux des huiles essentielles étudiées, à l'exception de certains métabolites secondaires volatils présents dans le myrique baumier, ont pu être identifiés, permettant de reconnaître le chimiotype ou de comparer ceux-ci avec la littérature pour discerner des différences ou des similarités. Cela a mis en lumière la variabilité des huiles essentielles en ce qui a trait à leur composition moléculaire, avec une très grande variabilité observée pour le myrique baumier, même au sein des trois échantillons provenant d'un même site. L'huile essentielle de petit thé du Labrador appartient à un chimiotype qui a déjà été observé dans différents pays, dans des écosystèmes différents, mais l'huile essentielle analysée dans le cadre de mes travaux de recherche était la première étude de la composition moléculaire de l'huile essentielle de petit thé du Labrador provenant de l'Amérique du Nord. Les métabolites non identifiés, particulièrement dans les huiles essentielles de myrique baumier, pourraient mettre en lumière des métabolites encore jamais rapportés dans ces huiles essentielles ou des métabolites rares ou inédits, mais le temps a manqué jusqu'à présent pour pousser leur identification à la suite de l'isolement et de la purification. Dans le cas des métabolites non identifiés du myrique baumier, la faible quantité d'huile essentielle produite restreint la portée des travaux possibles, il faudra préparer à nouveau des huiles essentielles pour pouvoir procéder à des fractionnements. Il n'est pas certain, cependant, que les mêmes métabolites seront retrouvés en raison de la variabilité de la composition. Dans le cas des huiles essentielles des *Rhododendron*, le fractionnement et la purification des métabolites principaux pourront être effectués dans le futur afin de confirmer

les identifications faites par GC-MS et de les inclure dans les tests d'activité biologique afin de tenter de connaître les métabolites responsables de ces activités.

Les premiers tests d'activités biologiques qui ont été effectués ont mis en lumière le potentiel des huiles essentielles des deux espèces de *Rhododendron* pour d'éventuelles applications. Leur activité antiélastase, antityrosinase et antilipoxygénase mériteront davantage d'attention et de nouveaux tests sont prévus afin d'évaluer de manière plus rigoureuse leur potentiel réel pour des applications dans le domaine de la cosméceutique. D'autres tests d'activités sont aussi en cours pour évaluer l'activité antiparasitaire de l'huile essentielle de *Rhododendron subarcticum* et de son métabolite principal, l'ascaridole.

Il s'agissait ici des premiers travaux portant sur des huiles essentielles effectuées dans notre laboratoire et de rares travaux sur des huiles essentielles de régions de la nordicité, avec tous les défis que cela a posés. Quelques pistes peuvent être envisagées pour améliorer la recherche dans ce domaine au sein du laboratoire et pour être plus efficaces, entre autres pour améliorer le rendement en huile essentielle du myrique baumier. Colliger davantage d'information concernant les conditions environnementales ainsi que les différents paramètres pouvant influencer la composition moléculaire pourrait être intéressant et permettre une analyse plus approfondie des facteurs influençant le métabolome de ces plantes. Des analyses sur un plus grand nombre d'échantillons, provenant d'un plus grand nombre de sites, pourraient permettre d'avoir un meilleur portrait des chimiotypes retrouvés dans la nordicité. La comparaison avec des échantillons d'autres régions, à l'extérieur de la zone de la nordicité, préparés par notre laboratoire serait une bonne façon de pouvoir observer des particularités des extraits provenant du Nord, s'il y en a.

Tous ces travaux peuvent aider à mettre de l'avant la richesse des écosystèmes du Nord. Ces régions, qui ont historiquement reçu moins d'attention que les régions chaudes par les phytochimistes devraient être étudiées davantage puisqu'elles renferment aussi une grande diversité d'organismes et des conditions particulières qui peuvent donner lieu à d'intéressantes découvertes. La production d'huiles essentielles, des extraits qui sont populaires auprès du public, à partir de végétaux récoltés au Nunavik, peut permettre de valoriser ce vaste territoire et les ressources végétales qu'il renferme.

Chapitre 3 Caractérisation de la fraction volatile de *B. glandulosa* provenant du Nunavik

1 Objectifs spécifiques

- Récolter des feuilles de bouleau glanduleux au Nunavik;
- Préparer de l'huile essentielle, si possible, ou extraire la fraction volatile des feuilles;
- Identifier les métabolites secondaires présents dans l'huile essentielle ou dans la fraction volatile;
- Effectuer la première caractérisation des métabolites volatils de *Betula glandulosa*;
- Comparer la composition en métabolites secondaires avec d'autres espèces du genre *Betula*.



Figure 34. Feuilles de *B. glandulosa* Michaux.¹⁸⁷



Figure 35. Plants de *Betula glandulosa* Michaux.

2 Présentation générale de l'arbuste

2.1 Classification et description botanique

Nom scientifique : *Betula glandulosa* Michaux

Noms vernaculaires : Bouleau glanduleux¹⁸⁷

Le bouleau glanduleux est un arbuste nain prostré ou érigé, qui peut s'élever entre 0,3 et 2,5 m de hauteur. Ses branches sont brun foncé et l'écorce est lisse et ne s'exfolie pas. Les feuilles mesurent entre 0,5 et 2 cm de long et de 0,5 à 1,5 cm de large et sont vert foncé sur le dessus et jaune vert à vert foncé sur le dessous. Le bouleau glanduleux est retrouvé en Amérique du Nord, d'un océan à l'autre, ainsi qu'au Groenland. Il peut être retrouvé un peu partout dans la portion nord du continent, en Alaska, dans les territoires du nord du Canada, ainsi que plus au sud, dans des endroits en altitude, avec une limite de répartition septentrionale liée à la température et au couvert de neige. Dans les régions les plus au nord, les archipels du nord du Canada par exemple, *B. glandulosa* est souvent restreint aux portions océaniques puisque le climat continental de ces régions présente un couvert de neige moins important, défavorable au bouleau glanduleux.¹⁸⁸

2.2 Utilisations traditionnelles

Plusieurs espèces du genre *Betula* ont été employées en médecine traditionnelle à travers le monde, les arbres comme les arbustes, en particulier leur écorce ainsi que les extraits de leur écorce. Les espèces de bouleaux ont surtout été employées pour traiter des problèmes liés aux os comme l'arthrite, les rhumatismes, la goutte ainsi que pour soigner les problèmes rénaux.¹⁸⁹ Le bouleau glanduleux n'est cependant pas connu pour avoir été très utilisé, peu d'études en ethnobotanique rapportent son utilisation par des communautés autochtones. Malgré cela, quelques exemples d'utilisations en médecine traditionnelle par des communautés autochtones de la forêt boréale canadienne sont présentés au tableau 15.

Tableau 15. Utilisations traditionnelles de *Betula glandulosa* par les communautés autochtones de la forêt boréale du Canada. (Adapté de Uprety et al., 2012)⁴⁸

	Infusion	Autre
Plante complète	Problèmes d'estomac	
Feuilles		Soigner les piqûres d'insectes
Feuilles et petites branches		Pour soigner les plaies profondes (maché et appliqué)
Écorce interne		Problèmes d'estomac

2.3 Importance, impacts et considérations

Le bouleau glanduleux est une espèce arbustive intéressante et importante à plusieurs égards. Comme il a déjà été souligné, il s'agit d'un arbuste répandu dans des écosystèmes de la nordicité, dont le Nunavik. Son impact au niveau de la densification arbustive est reconnu.^{5, 16, 23} Il est le principal responsable de la densification arbustive dans certaines zones du Nunavik.^{5, 23} Son expansion est limitée par la faible viabilité de son pollen lors

des saisons froides, mais avec le réchauffement observé dans les écosystèmes de la nordicité, elle peut s'accélérer de manière importante.^{12, 31}

Une espèce très proche de *Betula glandulosa*, *Betula nana*, est aussi parmi les arbustes qui colonisent les écosystèmes de la nordicité à travers le nord de l'hémisphère Nord. Les bouleaux nains, *Betula nana* et *Betula glandulosa* sont d'ailleurs parfois confondus, lorsqu'ils sont présents dans les mêmes régions, en raison de leur ressemblance et d'hybridation entre les deux espèces ainsi qu'avec d'autres bouleaux.¹⁸⁸ La capacité de *Betula nana* à coloniser les écosystèmes nordiques pourrait être liée à la plasticité de son développement, sa croissance clonale et son grand potentiel de reproduction. Il génère de nombreuses longues tiges qui produisent des feuilles ce qui lui permet de rapidement prendre avantage des nutriments disponibles et du réchauffement.²⁷ Il est possible que ces caractéristiques permettent aussi l'expansion du bouleau glanduleux.⁵ À ces propriétés s'ajoute aussi la consommation restreinte, par certains herbivores, de ses plants,¹⁹⁰ ce qui peut lui permettre de se répandre sans être consommé, mais certaines observations laissent aussi entrevoir une consommation du bouleau glanduleux par les caribous, qui pourraient avoir des impacts sur son expansion territoriale dans les régions où les hardes sont grandes^{24, 191}.

2.4 Justification du choix

Le bouleau glanduleux a été sélectionné pour faire l'objet d'une investigation phytochimique de son huile essentielle ou de sa fraction volatile pour plusieurs raisons. Cet arbuste a été suggéré par le professeur Stéphane Boudreau du département de biologie de l'Université Laval, puisqu'il s'agit d'une espèce très abondante dans le Nunavik et qu'elle a un impact important sur les écosystèmes de la nordicité, tel que déjà mentionné. Ainsi, sa répartition et son abondance en font un bon candidat, la ressource étant facile à trouver et il est possible d'en récolter sans risque de mettre en danger la ressource. De plus, la littérature scientifique sur cette espèce est très limitée dans les domaines de la phytochimie, de la pharmacognosie ou des autres disciplines qui s'intéressent aux métabolites secondaires des végétaux. Lors de travaux précédents au laboratoire du professeur Normand Voyer, des extraits de bouleau glanduleux présentaient une odeur intense. C'est en prenant en compte ces différents facteurs qu'est venue l'idée d'extraire des métabolites volatils des feuilles de *Betula glandulosa*. Cette investigation phytochimique visait à fournir une première investigation phytochimique de la fraction volatile du bouleau glanduleux, à partir de matière végétale récoltée dans la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik.

3 Revue de littérature sur la phytochimie de *B. glandulosa* et du genre *Betula*

3.1 Métabolites secondaires

Le bouleau glanduleux a reçu peu d'attention en phytochimie et dans les sciences des produits naturels, contrairement à certains autres bouleaux. Plusieurs bouleaux produisent de l'huile essentielle et leur composition moléculaire a déjà été investiguée. Par exemple, des huiles essentielles de certains bouleaux (*B. pendula*, *B. browicziana*, *B. litwinowii*, *B. medwediewii*, *B. recurvata*) ont été obtenues par distillation à partir des branches, des feuilles et des bourgeons en provenance de la Turquie, de même que les bourgeons de *B. pubescens* ssp. *pubescens* et *B. pubescens* ssp. *czerepanovii* échantillonnés en Finlande ainsi que les bourgeons de *Betula pendula* échantillonnés en Allemagne. Des dérivés du caryophyllène, des sesquiterpénoïdes composés d'un cycle à 9 membres et d'un cycle à 4 membres, représentaient généralement les métabolites secondaires volatiles principaux des huiles essentielles produites de végétaux de la Turquie, avec les 14-hydroxy- β -caryophyllène et 14-hydroxy-4,5-dihydro- β -caryophyllène comme représentant les plus abondants. Les branches et les feuilles de *B. medwediewii* représentaient des exceptions dans leurs investigations avec comme métabolite volatil principal le salicylate de méthyle. En Finlande, le 14-acétoxy- β -caryophyllène le 6-hydroxycaryophyllène et le birkenal étaient les composés majoritaires des huiles essentielles des bourgeons de *B. pubescens* ssp. *pubescens* et *B. pubescens* ssp. *czerepanovii*. En Allemagne, l'huile essentielle de bourgeons de *B. pendula* était composée des sesquiterpènes α -copaène, germacrène D et δ -cadinène. Les rendements en huile essentielle pour les bourgeons des espèces présentes en Turquie étaient de 0,1 – 6,3 % selon l'espèce alors que pour les feuilles des mêmes végétaux, ils s'étendaient de 0,1 à 0,6 %.

192, 193

L'huile essentielle du bouleau nain *Betula nana* L., morphologiquement proche du bouleau glanduleux, a été investiguée ainsi que celle d'autres bouleaux présents en Estonie. Il a été noté que la composition moléculaire de l'huile essentielle de *Betula nana* était considérablement différente de celle des huiles essentielles des autres bouleaux à l'étude. Les feuilles des bouleaux *B. pendula*, *B. pubescens* et *B. humilis* (bouleau nain arctique) contenaient surtout des sesquiterpènes bicycliques dérivés du caryophyllène alors que celles de *B. nana* contenaient principalement des composés aliphatiques (alcanes et acides gras). Le rendement a été plus élevé pour *B. humilis*, une espèce de bouleau arbustif, avec 0,27 % et il a été le plus bas pour *B. nana*, alors que l'huile essentielle a été observée en trace et que le rendement n'a pu être calculé.¹⁹⁴

La seule investigation phytochimique du métabolome secondaire de *Betula glandulosa* Michx a porté sur des métabolites extraits par macération dans le méthanol puis séparés par extraction liquide-liquide avec de l'eau et de l'acétate d'éthyle. Dans la phase organique, des triterpènes ont été isolés, dont l'acide déacétoxypapyriférique, un métabolite inédit.¹⁹⁰

4 Partie expérimentale

La méthodologie générale de caractérisation d'un extrait volatil a été présentée au chapitre 1. Le schéma 2 illustre en gros le processus général qui est impliqué, de la récolte à l'identification.

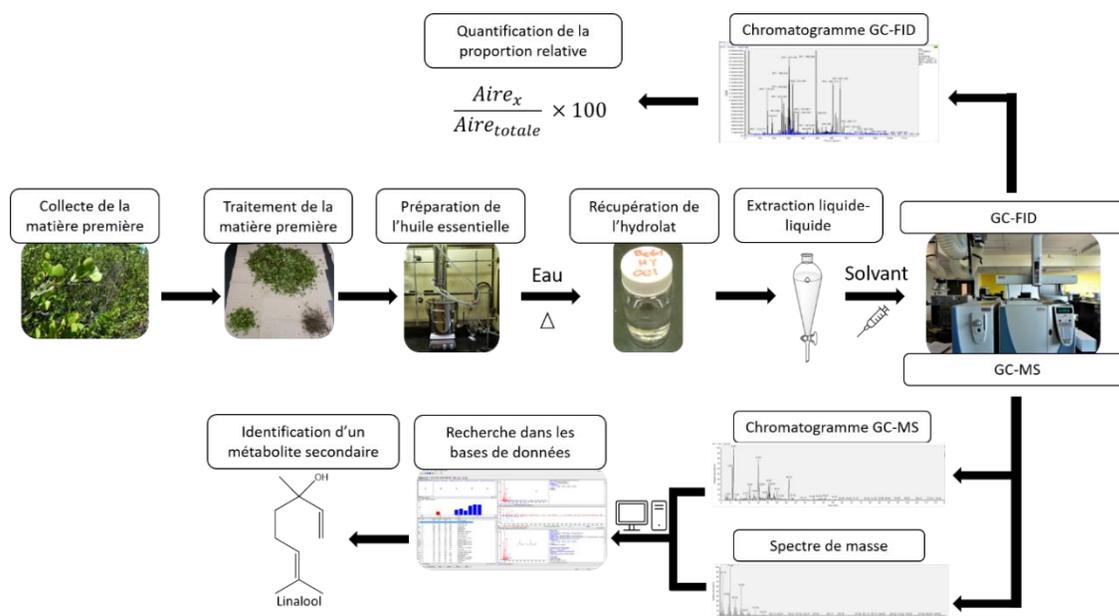


Schéma 2. Méthodologie générale de caractérisation d'un extrait volatil.

4.1 Solvants, réactifs et standards

Pour la préparation des extraits, l'eau utilisée pour la distillation est de l'eau courante, prise du robinet du laboratoire à Whapmagoostui-Kuujuarapik. Les solvants purifiés pour la préparation d'échantillons et les extractions liquide-liquide (éther diéthylique et dichlorométhane) ont été traités à l'aide d'un appareil de purification de solvants organiques communs anhydres et inertes de la compagnie *Vacuum Atmospheres Compagny* (VAC) de modèle *Solvent Purification System*.

Les standards utilisés pour la détermination des indices de rétention ont été achetés chez Millipore Sigma (C7 – C30 *Saturated alkanes* (49451-U), C4 – C24 *Even Carbon Saturated FAMES* (49453-U), C4 – C24 *Even Carbon Saturated FAEEs* (49454-U)).

Les gaz utilisés pour les analyses GC-MS et GC-FID étaient de l'air comprimé grade médical (Praxair), de l'hydrogène PP 4,5 (Praxair), de l'hélium Ultra High Purity 5,0 (Praxair) et de l'azote HP 4,8 (Praxair).

4.2 Matière végétale

Les échantillons de feuilles de *Betula glandulosa* Michaux ont été récoltés les 15 et 17 juillet 2019, sur deux sites près de Whapmagoostui-Kuujuarapik. La figure 18 montre une carte présentant la localisation des sites de récoltes, avec les numéros de sites correspondant à ceux qui sont rapportés au tableau 16. Les coordonnées ainsi que les informations se rapportant aux échantillons végétaux récoltés sont également présentées au tableau 16.

Tableau 16. Description de la provenance et de la matière végétale récoltée pour les échantillons de *B. glandulosa*.

ID échantillon	Espèce	Partie	Coordonnées du site	# du site	Masse fraîche (g)
BeGI 001	<i>B. glandulosa</i>	Feuilles	N 55°19'01,9" O 77°43'00,3" (alt. 29 m)	3	1739,56
BeGI 002	<i>B. glandulosa</i>	Feuilles	N 55°21'28,9" O 77°38'55,9" (alt. 14 m)	4	1482,55

Deux échantillons de feuilles ont été récoltés, en échantillonnant aléatoirement plusieurs individus sur une superficie limitée de quelques milliers de mètres carrés. Les deux sites d'échantillonnage se trouvaient à plusieurs kilomètres des villages de Whapmagoostui-Kuujuarapik. Les individus ont été identifiés par Stéphane Boudreau, professeur au département de biologie de l'Université Laval, et la récolte des feuilles s'est faite selon les bonnes pratiques de récolte telles qu'expliquées par ce dernier afin d'éviter d'endommager les individus.

Les feuilles ainsi récoltées ont été conservées au congélateur, dans des sacs de plastique refermables, afin de les extraire fraîches. Avant l'extraction, les échantillons ont été triés afin d'en retirer tout ce qui n'était pas des feuilles de bouleau glanduleux (bouts de branches, feuilles d'autres espèces, insectes, etc.). Les feuilles n'ont pas subi d'autre prétraitement (hachage, broyage, etc.). Les extractions ont été faites à l'intérieur de 72 heures suivant la cueillette.

4.3 Préparation des extraits

Les feuilles ont été soumises à une distillation par entraînement à la vapeur, avec cohobation, durant 2 h à l'aide d'un appareil élaboré par notre laboratoire tel que décrit au chapitre 2 et présenté à la figure 20. La masse de feuilles fraîches utilisées est présentée au tableau 16. La fraction volatile des feuilles de *B. glandulosa* a été récupérée par extraction liquide-liquide de la totalité de l'hydrolat présent dans le séparateur à la fin de la

distillation (environ 100 ml), à l'éther purifié à l'aide d'un système de purification de solvants (VAC). L'hydrolat était incolore, mais présentait une odeur assez forte. L'éther a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif, sans chauffage (bain d'eau à température pièce) et les extraits ont été récupérés dans des flacons à scintillation, pesés puis conservés à 4 °C à l'abri de la lumière dans une boîte placée dans un réfrigérateur. Le produit obtenu, une fois l'éther évaporé, est une petite quantité d'huile jaunâtre. Les échantillons ont été conservés ainsi jusqu'à leur analyse.

4.4 Caractérisation

Les échantillons pour analyse par chromatographie en phase gazeuse ont été préparés à environ 10 % en masse dans du dichlorométhane purifié à l'aide d'un système de purification de solvants (VAC). L'analyse qualitative a été faite à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Trace GC Ultra (Thermo Scientifique) couplé à un spectromètre de masse DSQ II (Thermo Scientifique). Les injections ont été faites à l'aide d'un échantillonneur automatique Triplus (Thermo Scientifique). Pour les analyses en phase apolaire, la colonne était une DB-5MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm) (Agilent Technologies). Le volume d'injection était de 1,0 µl. La température du port d'injection était de 200 °C, le four a été réglé initialement à 50 °C pour 5 min, suivi d'une augmentation jusqu'à 270 °C à 2 °C/min, puis à 270 °C pour 5 min. Le débit de gaz porteur était de 1,000 ml/min. L'injection s'est faite en mode *split*, avec un ratio 1 : 10. La température de la source était de 200 °C, avec une plage de masses de 50 – 500 Da. La détection s'est faite en mode positif, en ionisation électronique (EI) avec une énergie d'ionisation de 70 eV. Pour les analyses en phase polaire, l'appareil était le même, avec une colonne HP-INNOWAX (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm) (Agilent Technologies). Les paramètres étaient les mêmes qu'en phase apolaire sauf pour le gradient : 50 °C pour 5 min, jusqu'à 250 °C à 2 °C/min et 250 °C pendant 5 min. L'identification des métabolites s'est fait, d'une part, à l'aide des indices de rétention calculés à l'aide d'une série de standards n-alcanes (C₇-C₃₀) pour les analyses en phase apolaire et à l'aide des séries de standards n-alcanes (C₇-C₃₀), FAMES (C₄-C₂₄) et FAEEs (C₄-C₂₄) pour les analyses en phase polaire ainsi qu'à l'aide des spectres de masse en comparant les indices de rétention et les spectres de masses avec les bases de données FFNSC3 (*Flavours and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds 3rd edition*, Wiley)⁹², NIST14 (NIST/EPA/NIH *Mass Spectral Library*)⁹⁴ et de Robert P. Adams (*Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*)⁹³ ainsi que par comparaison avec des données tirées de la littérature.

L'analyse quantitative s'est faite à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Trace GC Ultra (Thermo Scientific) avec un détecteur FID et un échantillonneur automatique Triplus (Thermo Scientific). La colonne était encore une fois une DB-5MS (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm). Le port d'injection a été réglé à 220 °C. L'injection s'est faite en mode *split*, avec un ratio 1 : 50. Le gradient était le même que pour les analyses en

GC-MS sur colonne apolaire. Le débit de gaz était de 1,0 ml/min, en mode débit constant. Le détecteur FID a été réglé à 300 °C, avec un *signal range* de 10. Les débits de gaz étaient réglés à 350 ml/min pour l'air comprimé, à 35 ml/min pour l'hydrogène et à 30 ml/min pour l'azote (*makeup*).

5 Résultats

5.1 Préparation de l'extrait

Lors de la distillation, seul un très mince film grassex a été observé en surface du distillat dans le séparateur en verre, impossible à récupérer par des procédés physiques. La nature de ce film est inconnue et il a été extrait avec l'hydrolat pour analyser l'ensemble des métabolites volatils récupérés. Les échantillons ainsi préparés, avec les masses des extraits obtenues, sont présentés au tableau 17. Les rendements n'ont pas été calculés, de même que la masse sèche, puisqu'aucune huile essentielle n'a été obtenue et qu'un volume limité d'hydrolat (le contenu du séparateur) a été extrait seulement, puisque la distillation s'est faite avec cohobation. Deux échantillons ont été préparés, à partir de deux échantillons de feuilles.

Tableau 17. Masses d'extraits obtenues pour les échantillons de feuilles de *B. glandulosa* provenant de Whapmagoostui-Kuujuarapik.

Id. échantillon matière végétale	Id. échantillon extrait volatil	Masse feuilles fraîches (g)	Masse extrait volatil (g)
BeGI 001	BeGI HY 001	1739,56	0,0380
BeGI 002	BeGI HY 002	1482,55	0,0463

5.2 Caractérisation

Les résultats de la caractérisation de la composition en métabolites secondaires volatils des feuilles de *B. glandulosa* provenant de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik sont présentés en détail au tableau 19. Un résumé des résultats est présenté au tableau 18. Ainsi, les chromatogrammes obtenus en GC-MS en phase apolaire ont permis d'observer 239 et 328 pics, pour les échantillons BeGI HY 001 et BeGI HY 002 respectivement. De ce nombre, 120 et 137 métabolites ont été identifiés, représentant 90 et 92 % de la composition en métabolites secondaires totale, en proportion relative. Les chromatogrammes présentés à la figure 36 permettent d'observer le profil chromatographique des deux échantillons analysés et d'y voir les similarités et les divergences entre les deux échantillons. Les principaux métabolites retrouvés dans les extraits volatils analysés sont présentés à la figure 37, répertoriés par classes de métabolites. Les métabolites secondaires volatils majeurs des échantillons préparés appartiennent aux classes des monoterpénoïdes (linalool et α -terpinéol), des phénylpropanoïdes (eugénol, phényléthanol et alcool benzylique) et des dérivés d'acides gras ((*Z*)-3-hexen-1-ol, (*E*)-2-hexenol, hexanol et (*E*)-2-hexenal)

Tableau 18. Métabolites observés et identifiés et proportion relative identifiée pour les échantillons d'extraits volatils de feuilles de *B. glandulosa*.

Id. échantillon extrait	Nb métabolites observés	Nb métabolites identifiés	Proportion relative identifiée (%)
BeGI HY 001	239	120	90 ± 4
BeGI HY 002	328	137	92 ± 4

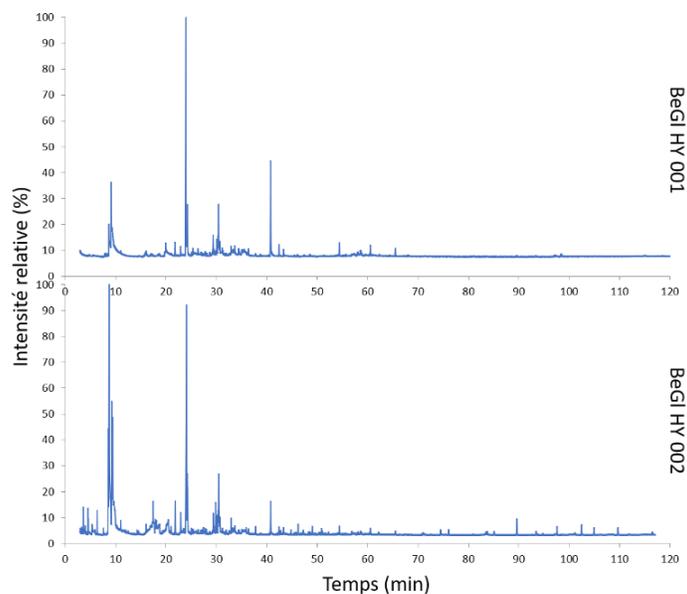
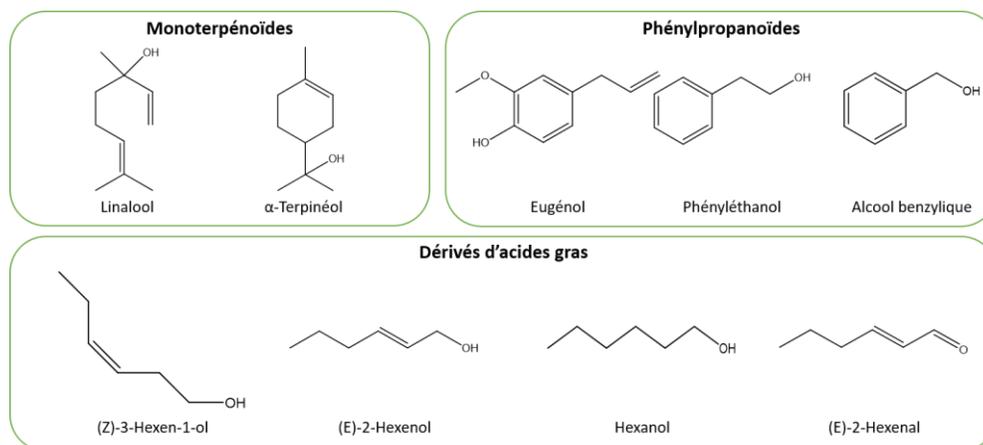


Figure 36. Chromatogrammes des échantillons d'extraits volatils de feuilles de *B. glandulosa* provenant de Whapmagoostui-Kuujuarapik.



Les métabolites représentant plus de 2 % de la proportion totale d'un échantillon d'extrait volatil de *B. glandulosa* sont présentés ici.

Figure 37. Structures des métabolites principaux des extraits volatils de *B. glandulosa* en provenance de Whapmagoostui-Kuujuarapik.

Tableau 19. Métabolites secondaires identifiés dans les échantillons d'extraits volatils de feuilles de *Betula glandulosa* provenant de la région de Whapmagoostui-Kuujuarapik

Composés	LRI _{exp.}	LRI _{lit.}	LRI _{exp.} †	LRI _{lit.} †	Proportion relative (DB-5MS)		Méthode d'identification
	(DB- 5MS)	(Apolaire semi- standard)	(HP-Innowax)	(Polaire)	[% ± écart type]		
	A	B					
1-Penten-3-ol	691	680 ^[A]	1160/503/559	1159/-/-	tr	0,93 ± 0,00	MS, LRI ^[D,E]
3-Pentanone	699	697 ^[A]			-	tr	MS, LRI ^[D]
3-Pentanol	701	710 ^[A]	1113/446/486	1110/459/506	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Acétoin	706	713 ^[C]			tr	0,19 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
Alcool isoamylique	728	729 ^[A]	1210/563/616	1209/564/618	tr	0,62 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
2-Méthyle-1-butanol	731	731 ^[A]	1210/563/616	1208/558/611	tr	0,40 ± 0,04	MS, LRI ^[D,E]
(E)-2-pentenal	744	751 ^[A]	1134/475/523	1127/-/-	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
(Z)-2-Pentenol	759	767 ^[A]	1325/683/727	1318/-/-	0,12 ± 0,02	0,39 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
3-Méthyle-2-butenal	778	780 ^[A]	1204/553/610	1215/-/-	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Méthylisobutylcétone	798	798 ^[C]	1134/475/523	1127/482/530	-	tr	MS, LRI ^[D,E]
Hexanal	801	801 ^[A]	1086/430/466	1083/435/477	tr	0,58 ± 0,02	MS, LRI ^[D,E]
3-Furfural	824	816 ^[A]		1454/779/825	0,48 ± 0,01	0,32 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
(E)-3-Hexen-1-ol	843	847 ^[A]	1367/727/775	1367/744/792	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
(E)-2-Hexenal	849	850^[A]	1220/578/625	1216/581/628	0,28 ± 0,02	4,07 ± 0,09	MS, LRI^[D,E]
(Z)-3-Hexen-1-ol	857	857^[C]	1390/750/800	1382/740/789	6,5 ± 0,2	23,2 ± 0,1	MS, LRI^[D,E]
(E)-2-Hexenol	869	864^[A]	1412/775/821	1405/768/816	6,2 ± 0,3	7,2 ± 0,2	MS, LRI^[D,E]
Hexanol	874	868^[C]	1357/716/763	1355/711/758	5,1 ± 0,2	5,0 ± 0,2	MS, LRI^[D,E]
Acide 2-méthylbutanoïque	875	881 ^[A]	1691/1055/1097	1662/1053/1294	tr	0,29 ± 0,09	MS, LRI ^[D,E]
2-Heptanone	888	891 ^[C]	1184/530/592	1182/547/597	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]

(Z)-4-Heptenal	900	900 ^[C]	1241/606/644	1240/603/645	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Heptanal	902	901 ^[C]	1188/534/597	1184/539/598	0,18 ± 0,01	0,32 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
2-Acétylefuran	907	911 ^[C]	1505/869/912	1499/875/1117	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
(E,E)-2,4-Hexadienal	909	911 ^[C]	1402/763/811	1400/-/-	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Formiate de (Z)-3-Hexenyl	917	920 ^[A]	1272/632/673	1258/625/668	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Formiate d'hexyle	925	929 ^[A]	1357/716/763	1352/580/627	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
(E)-3-Hepten-2-one	931	932 ^[A]			-	tr	MS, LRI ^[D]
Tiglate d'éthyle	934	937 ^[C]			tr	-	MS, LRI ^[D]
(E)-2-Heptenal	952	956 ^[A]	1323/681/725	1323/683/728	tr	0,17 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
Benzaldéhyde	955	960 ^[A]	1518/882/925	1520/-/-	tr	0,14 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
(E)-4-Oxohex-2-enal	956	956 ^[C]			-	tr	MS, LRI ^[D]
(Z)-4-Hepten-1-ol	962	960 ^[A]			tr	tr	MS, LRI ^[D]
Heptanol	968	970 ^[A]	1456/824/867	1453/849/894	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
1-Octen-3-one	973	973 ^[A]			tr	tr	MS, LRI ^[D]
1-Octen-3-ol	978	978 ^[A]	1456/821/864	1450/814/858	0,38 ± 0,06	tr	MS, LRI ^[D,E]
6-Méthyle-5-Hepten-2-one	982	986 ^[A]	1338/696/741	1338/701/746	0,3 ± 0,1	0,33 ± 0,02	MS, LRI ^[D,E]
6-Méthyle-5-Hepten-2-ol	992	994 ^[C]	1469/834/877	1465/822/867	0,61 ± 0,05	tr	MS, LRI ^[D,E]
Hexanoate d'éthyle	999	1000 ^[C]	1234/600/637	1233/600/637	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Octanal	1003	1003 ^[C]	1290/648/689	1289/655/698	tr	0,19 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
Acétate de (Z)-3-Hexen-1-ol	1005	1005 ^[C]	1319/677/720	1315/-/-	tr	1,11 ± 0,07	MS, LRI ^[D,E]
Acide 3-méthylpentanoïque	1006	1002 ^[A]			tr	tr	MS, LRI ^[D]
(E, E)-2,4-Heptadienal	1009	1012 ^[C]	1490/854/895	1495/851/896	0,55 ± 0,02	0,11 ± 0,00	MS, LRI ^[D,E]
Acétate d'hexyle	1012	1011 ^[C]	1273/634/674	1272/-/-	0,28 ± 0,02	0,16 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
Acétate de (E)-2-hexen-1-ol	1014	1016 ^[C]	1336/695/740	1333/696/741	0,16 ± 0,01	0,24 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
Alcool benzylique	1032	1036^[C]	1877/1237/1277	1870/-/-	2,51 ± 0,05	1,23 ± 0,02	MS, LRI^[D,E]

Phénylacétaldéhyde	1038	1045 ^[A]	1639/1002/1045	1640/988/1031	0,32 ± 0,09	tr	MS, LRI ^[D,E]
Hexenoate de (<i>E</i>)-2-éthyle	1042	1041 ^[A]	1345/704/749	-/709/756	0,19 ± 0,06	tr	MS, LRI ^[D,E]
o-Crésol	1053	1054 ^[C]	2014/1370/1408	2008/-/-	0,71 ± 0,05	-	MS, LRI ^[D,E]
(<i>E</i>)-2-Octen-1-al	1055	1053 ^[A]	1426/790/834	1429/-/-	0,62 ± 0,03	0,49 ± 0,04	MS, LRI ^[D,E]
Oxyde de (<i>Z</i>)-linalool (furanoïde)	1068	1069 ^[A]	1439/805/847	1444/-/-	0,97 ± 0,01	1,41 ± 0,02	MS, LRI ^[D,E]
(<i>Z</i>)-5-Octen-1-ol	1072	1074 ^[C]	1621/984/1027	1615/-/-	0,17 ± 0,00	tr	MS, LRI ^[D,E]
p-Crésol ou <i>m</i> -crésol	1075	P : 1077 ^[C] M : 1075 ^[C]	2090/1445/1484	P : 2080/-/- M : 2091/-/-	tr	-	MS, LRI ^[D,E]
Fenchone	1082	1090 ^[A]	1387/748/797	1401/759/803	-	tr	MS, LRI ^[D,E]
Oxyde de (<i>E</i>)-linalool (furanoïde)	1084	1086 ^[A]	1466/831/874	1452/-/-	0,87 ± 0,03	0,92 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
3-Décyn-2-ol	1092	1101 ^[C]			0,17 ± 0,03	0,26 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
Linalool	1104	1101^[A]	1555/919/962	1547/913/956	18,9 ± 0,3	14,6 ± 0,2	MS, LRI^[D,E]
(<i>E</i>)-6-methyl-3,5-Heptadien-2-one	1104	1103 ^[C]	1587/951/993	-/950/992	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Hotrienol	1105	1107 ^[C]	1616/980/1022	1613/-/-	1,4 ± 0,2	2,2 ± 0,3	MS, LRI ^[D,E]
Nonanal	1105	1104 ^[A]	1393/754/803	1391/751/800			MS, LRI ^[D,E]
Phényléthanol	1110	1113^[A]	1908/1268/1308	1906/-/-	3,7 ± 0,2	1,54 ± 0,04	MS, LRI^[D,E]
(<i>E, E</i>)-2,4-Octadiénol	1112	1118 ^[A]			0,22 ± 0,03	tr	MS, LRI ^[D]
β -Thujone	1114	1114 ^[C]	1431/796/839	1448/803/849	-	0,22 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
Déhydrosabinacétone	1115	1122 ^[A]			0,23 ± 0,03	0,17 ± 0,02	MS, LRI ^[D]
trans- <i>p</i> -Mentha-2,8-dièn-1-ol	1119	1122 ^[A]	1627/990/1033	1639/-/-	0,60 ± 0,02	0,20 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
Limona cétone	1126	1131 ^[A]	1544/908/950	-/-/-	-	tr	MS, LRI ^[D,E]
Nopinone	1131	1137 ^[C]			-	tr	MS, LRI ^[D]
cis- <i>p</i> -Mentha-2,8-dièn-1-ol	1133	1134 ^[C]	1670/1033/1075		0,54 ± 0,03	0,10 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
(<i>E</i>)-Pinocarvéol	1134	1139 ^[C]	1648/1011/1054	1664/-/-	tr	0,20 ± 0,02	MS, LRI ^[D,E]
Camphre	1139	1142 ^[C]	1499/864/906	1520/-/-	0,21 ± 0,02	0,15 ± 0,02	MS, LRI ^[D,E]

Isobutyrate de (Z)-3-Hexenyl	1141	1145 ^[C]			tr	0,15 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
4-Acétyle-1,4-diméthyle-1-cyclohexene	1144	1149 ^[C]			tr	0,18 ± 0,00	MS, LRI ^[D]
Acétate de 2-Éthylhexyle	1148	1150 ^[A]	1384/745/794	-/745/793	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Oxyde de nérol	1148	1153 ^[C]	1466/831/874	-/833/876	0,20 ± 0,04	0,24 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
(E,Z)-2,6-Nonadienal	1149	1153 ^[A]	1581/944/987	1584/-/-	0,10 ± 0,03	-	MS, LRI ^[D,E]
Sabina cétone	1151	1156 ^[C]			0,25 ± 0,03	tr	MS, LRI ^[D]
Oxyde de β-Pinène	1153	1156 ^[A]			tr	tr	MS, LRI ^[D]
Pinocarvone	1155	1164 ^[A]			0,29 ± 0,04	0,16 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
(E)-2-Nonenal	1157	1163 ^[A]	1529/894/936	1534/-/-	0,27 ± 0,05	tr	MS, LRI ^[D,E]
Benzoate d'éthyle	1164	1170 ^[A]	1659/1022/1065	-/1008/1052	0,29 ± 0,01	0,21 ± 0,00	MS, LRI ^[D,E]
Oxyde de (Z)-linalool (pyranoïde)	1167	1169 ^[A]			tr	0,10 ± 0,01	MS, LRI ^[D]
Oxyde de (E)-linalool (pyranoïde)	1173	1173 ^[C]	1738/1101/1142	1739/-/-	0,19 ± 0,04	tr	MS, LRI ^[D,E]
Terpinèn-4-ol	1175	1177 ^[C]	1597/961/1003	1602/959/1002	1,89 ± 0,08	0,90 ± 0,05	MS, LRI ^[D,E]
Thuj-3-en-10-al	1177	1184 ^[A]	1616/980/1022	1642/-/-	0,5 ± 0,1	0,20 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
trans- <i>p</i> -Mentha-1(7),8-dièn-2-ol	1185	1187 ^[B]	1794/1156/1198		0,42 ± 0,03	1,28 ± 0,03	MS, LRI ^[D]
Salicylate de méthyle		1192 ^[A]	1762/1125/1165	1765/-/-			MS, LRI ^[D,E]
Isomère de butyrate de 3-Hexenyle	1185	E : 1185 ^[C] Z : 1187 ^[C]	1460/8225/868	E : 1454/-/- Z : 1455/-/-	1,47 ± 0,05	0,73 ± 0,04	MS, LRI ^[D,E]
Myrtenal	1188	1193 ^[C]	1612/975/1018	1647/-/-	1,1 ± 0,1	0,83 ± 0,07	MS, LRI ^[D,E]
α-Terpinéol	1192	1189^[C]	1694/1058/1100	1697/-/-	4,83 ± 0,07	3,80 ± 0,01	MS, LRI^[D,E]
Non identifié A	1195				0,4 ± 0,1	0,43 ± 0,09	MS, LRI ^[D]
(-)-trans-Isopiperiténol	1196	1210 ^[C]	1748/1110/1151	1745/-/-	0,95 ± 0,08	0,70 ± 0,02	MS, LRI ^[D,E]
(Z)-Dihydrocarvone	1198	1195 ^[C]	1594/958/1001		tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Isomère de 4-caranone	1200	Cis : 1205 ^[A] Trans : 1200 ^[A]	1602/966/1008		0,39 ± 0,05	0,17 ± 0,01	MS, LRI ^[D]

Décenal	1204	1208 ^[A]	1495/860/903	1498/867/910	0,68 ± 0,08	tr	MS, LRI ^[D,E]
3-Caren-10-al	1207		1711/1074/1115	1711/-/-	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
(-)-cis-Isopiperitéol	1212	1228 ^[C]	1742/1104/1145	1742/-/-	0,51 ± 0,05	0,21 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
(E)-Carvéol	1215	1223 ^[A]	1834/1193/1235	1845/1185/1226	0,21 ± 0,08	tr	MS, LRI ^[D,E]
(-)-Myrtenol	1219	1213 ^[C]	1788/1150/1190	1797/-/-	-	tr	MS, LRI ^[D,E]
Nérol	1223	1229 ^[A]	1802/1163/1203	1797/1147/1189	0,25 ± 0,03	0,12 ± 0,02	MS, LRI ^[D,E]
cis- <i>p</i> -Mentha-1(7),8-dièn-2-ol	1225	1230 ^[A]	1887/1247/1287		0,82 ± 0,05	0,65 ± 0,02	MS, LRI ^[D]
Isogéranol	1227	1240 ^[C]	1816/1177/1217	1820/-/-	0,37 ± 0,05	-	MS, LRI ^[D,E]
Butanoate de (Z)-3-Hexenyl-2-méthyle	1229	1231 ^[A]	1472/837/879	-/837/880	0,57 ± 0,08	0,20 ± 0,00	MS, LRI ^[D,E]
Ester d'acide d'hex-(3Z)-enyl-but-(2E)- énoïque	1233	1237 ^[A]	1599/962/1005	1599/963/1005	0,37 ± 0,04	0,10 ± 0,00	MS, LRI ^[D,E]
Cuminaldéhyde	1234	1239 ^[C]	1766/1128/1169	1789/1130/1171	0,51 ± 0,04	0,14 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
Carvone	1237	1242 ^[C]	1718/1081/1122	1741/1081/1127	0,87 ± 0,07	0,27 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
Géranol	1250	1255 ^[A]	1852/1211/1253	1847/1189/1232	1,08 ± 0,06	0,28 ± 0,02	MS, LRI ^[D,E]
Chavicol	1250	1252 ^[A]	2346/1694/1730	2334/-/-	0,31 ± 0,02	-	MS, LRI ^[D,E]
Isomère de 2-Décenal	1259	E : 1265 ^[A] Z : 1252 ^[C]	1636/999/1042	E : 1644/1004/1049 Z : 1622/-/-	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
Salicylate d'éthyle	1260	1266 ^[B]	1797/1159/1198	1820/1163/1202	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Perillaldéhyde	1266	1269 ^[B]		1775/1133/1174	0,25 ± 0,03	tr	MS, LRI ^[D]
Phellandral	1268	1277 ^[A]		1744/-/-	tr	tr	MS, LRI ^[D]
Acétate de bornyle	1277	1284 ^[B]	1570/934/976	1581/942/984	0,53 ± 0,00	0,19 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
<i>p</i> -Cymèn-7-ol	1287	1289 ^[C]	2099/1454/1492	2113/-/-	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Carvacrol	1294	1300 ^[A]	2222/1573/1609	-/1565/1601	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
(E, E)-2,4-Décadienal	1313	1317 ^[C]	1800/1162/1201	1811/1166/1207	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Isomère de tiglate de 3-Hexenyle	1319	E : 1319 ^[A] Z : 1325 ^[A]	1664/1027/1070	E : -/1013/1057 Z : -/1027/1070	0,22 ± 0,01	tr	MS, LRI ^[D,E]

1,5,5-Triméthyl-6-méthylène-cyclohexène	1340	1338 ^[C]			0,12 ± 0,01	tr	MS, LRI ^[D]
Eugénol	1345	1356^[B]	2164/1518/1555	2169/1443/1484	8,54 ± 0,09	1,63 ± 0,02	MS, LRI^[D,E]
α-ylangène	1365	1371 ^[A]	1477/842/885	1491/-/-	-	tr	MS, LRI ^[D,E]
Isomère de β-damascenone	1370	E : 1379 ^[A] Z : 1360 ^[A]	1807/1168/1209	E : 1823/1180/1220 Z : 1794/1180/1220	0,86 ± 0,01	0,34 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
β-Bourbonène	1373	1382 ^[A]	1502/867/909	1526/-/-	-	tr	MS, LRI ^[D,E]
(Z)-Jasmoné	1383	1392 ^[B]	1925/1268/1308	1906/-/-	0,62 ± 0,01	0,35 ± 0,00	MS, LRI ^[D,E]
(Z)-Caryophyllène	1406	1413 ^[A]	1578/842/985	1589/-/-	-	0,21 ± 0,00	MS, LRI ^[D,E]
(E)-α-Bergamotène	1425	1432 ^[A]	1575/939/981	1580/-/-	-	0,12 ± 0,00	MS, LRI ^[D,E]
Guaia-6,9-diène	1431	1442 ^[B]	1591/955/998	1615/-/-	-	0,49 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
Aromadendrène	1437	1438 ^[A]	1624/987/1030	1618/953/1000	-	tr	MS, LRI ^[D,E]
α-Humulène	1442	1454 ^[A]			tr	tr	MS, LRI ^[D]
trans-β-Ionone	1469	1487 ^[B]	1923/1283/1322	1940/-/-	tr	-	MS, LRI ^[D,E]
β-Chamigrène	1475	1476 ^[C]	1701/1065/1107	1725/-/-	-	0,39 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
α-Murolène	1488	1497 ^[A]	1709/1072/1114	1726/-/-	-	tr	MS, LRI ^[D,E]
(Z)-α-Bisabolène	1500	1504 ^[C]	1725/1127/1167	1740/-/-	-	0,10 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
(E)-Calamenène	1510	1521 ^[B]	1814/1175/1215	1826/-/-	-	0,16 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
(E)-α-Bisabolène	1533	1540 ^[A]	1725/1127/1167	1741/-/-	-	0,11 ± 0,01	MS, LRI ^[D,E]
(E)-Nérolidol	1555	1561 ^[A]	2044/1398/1438	2042/1391/1431	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Oxyde de caryophyllène	1566	1582 ^[B]	1952/1311/1350	1989/1325/1364	1,09 ± 0,02	0,46 ± 0,02	MS, LRI ^[D,E]
Époxyde de trans-Z-α-bisabolène	1576	1586 ^[C]			tr	tr	MS, LRI ^[D]
Époxyde d'isoaromadendrène	1589	1589 ^[C]			0,15 ± 0,01	tr	MS, LRI ^[D]
épi-Cadinol	1632	1640 ^[C]	2147/1501/1538	2169/-/-	tr	tr	MS, LRI ^[D,E]
Jasmonate de méthyle	1633	1638 ^[C]	2321/1670/1707	2338/-/-	0,59 ± 0,05	0,14 ± 0,00	MS, LRI ^[D,E]
Cubénol	1642	1642 ^[C]	2045/1399/1439	2080/-/-	0,94 ± 0,05	0,23 ± 0,02	MS, LRI ^[D,E]

14-hydroxy-(Z)-caryophyllène	1656	1664 ^[A]			0,10 ± 0,03	-	MS, LRI ^[D]
Germacrone	1675	1693 ^[B]	2199/1551/1587	2217/-/-	0,97 ± 0,06	0,36 ± 0,00	MS, LRI ^[D,E]
14-hydroxy-4,5-dihydro-caryophyllène	1708	1706 ^[B]			tr	tr	MS, LRI ^[D]
Non identifié B	1768				0,71 ± 0,01	0,18 ± 0,00	MS, LRI ^[D]
Néophytadiène	1837	1837 ^[C]			-	tr	MS, LRI ^[D]
Octadécanol	2080	2081 ^[B]			-	tr	MS, LRI ^[D]
Phytol	2103	2106 ^[A]	2615/1955/1988	2622/-/-	-	tr	MS, LRI ^[D,E]
Ester d'éthyle d'acide linoléique	2153	2162 ^[C]			-	tr	MS, LRI ^[D]
Éthyl-9,12,15-octadécatrienoate	2158	2153 ^[C]			-	tr	MS, LRI ^[D]
Acide trans-13-octadecenoïque	2161	2164 ^[C]			-	0,17 ± 0,02	MS, LRI ^[D]
1-Heneicosanol	2393	2380 ^[C]	3000/2329/2361	2995/-/-	-	tr	MS, LRI ^[D,E]
Docosanal	2423	2430 ^[C]	2971/2300/2333		-	tr	MS, LRI ^[D]
1-Hexacosène	2593	2595 ^[C]			-	tr	MS, LRI ^[D]
Tetracosanal	2628	2632 ^[C]	3115/2499/2529		-	0,4 ± 0,3	MS, LRI ^[D]
Hexacosanal	2832	2832 ^[C]			-	0,3 ± 0,2	MS, LRI ^[D]
Terpénoïdes					44 ± 2	33 ± 1	
Monoterpènes					0 ± 0	0 ± 0	
Monoterpénoïdes					40 ± 2	29,81 ± 0,9	
Sesquiterpènes					0,03 ± 0,01	1,81 ± 0,06	
Sesquiterpénoïdes					4,3 ± 0,2	1,62 ± 0,09	
Autres terpénoïdes					0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,01	
Phénylpropanoïdes					16,9 ± 0,5	5,5 ± 0,2	
Dérivés d'acides gras					20,2 ± 0,8	42 ± 1	
Oxylipin (dérivés d'acides gras)					18,1 ± 0,7	40,0 ± 0,6	
Autres					8,6 ± 0,9	11 ± 1	
Proportion totale des composés identifiés					90 ± 4	92 ± 4	

Les indices de rétention provenant de la littérature présentés au tableau 19 sont les valeurs les plus proches des valeurs expérimentales provenant des bases de données : [A] FFNSC 3⁹²; [B] Robert P. Adams⁹³; [C] NIST 14⁹⁴

[D] Identification à l'aide du LRI obtenu sur colonne apolaire semi-standard.

[E] Identification à l'aide du LRI obtenu sur colonne polaire.

† : Les LRI sur colonne polaire ont été obtenus en fonction de séries de standards *n*-alcanes^[C] /FAEEs^[A] /FAMEs^[A].

tr : La proportion relative est indiquée comme trace (tr) pour les valeurs < 0.1 %.

Gras : Métabolites principaux (> 2 % de la composition totale).

Spectres de masse des composés non identifiés: A : (m/z= 71 (100), 67 (50), 55 (49), 96 (43), 53 (27)); B : (m/z : 95 (100), 67 (51), 69 (48), 91 (43), 79 (38), 77 (37), 53 (34), 55 (32)).

6 Discussion

6.1.1 Caractérisation de la fraction volatile

Cette investigation phytochimique représente une rare investigation phytochimique des métabolites secondaires de *Betula glandulosa* Michaux et la première investigation des métabolites secondaires volatils de cette espèce, malgré sa présence à plusieurs endroits et son abondance dans certaines régions. La quantité d'extrait obtenue est faible parce que l'objectif initial était d'essayer de préparer de l'huile essentielle, ce qui n'a pas été possible, ou du moins il n'a pas été possible d'en récupérer. Dans le cas où une huile essentielle a été formée en très petite quantité, si le mince film blanc laiteux observé lors de la distillation des deux échantillons en était, elle n'a pas été analysée seule. Il aurait été possible d'obtenir davantage de masse d'extraits volatils si la distillation avait été faite différemment pour viser directement la récupération de la fraction volatile à l'aide d'une distillation-extraction simultanée par exemple, sans égard à une possible huile essentielle.¹⁹⁵⁻¹⁹⁷ L'extraction liquide-liquide en même temps que la distillation permet de récupérer les métabolites dans la phase organique malgré la cohobation qui entraîne un retour du distillat vers la cuve pour être distillé à nouveau. La quantité d'extrait obtenue a tout de même permis de procéder à la caractérisation par GC-MS et à la semi-quantification par GC-FID.

Un monoterpénoïde, le linalool, est le métabolite secondaire principal de l'échantillon BeGI HY 001 (18,9 %) et il est le second plus important dans l'échantillon BeGI HY 002 (14,6 %) derrière le (Z)-3-hexen-1-ol (23,2 %). D'ailleurs, la classe de métabolites majoritaire dans chacun des échantillons est en lien avec le métabolite principal. En effet, dans l'échantillon 001, les terpénoïdes (44 %) et particulièrement les monoterpénoïdes (40 %) sont les principales classes de composés, avec le linalool en tête, suivi de l' α -terpinéol (4,83 %), alors que les dérivés d'acides gras (42 %), particulièrement ceux qui font partie des oxylipins (40 %) sont les classes de métabolites les plus représentées dans l'échantillon 002. Quelques phénylpropanoïdes ont aussi été retrouvés, en proportion plus importante dans l'échantillon BeGI HY 001 (16,9 %) que dans l'échantillon 002 (5,5 %), avec comme principal représentant l'eugénol (8,54 -1,53 %). La variété de métabolites identifiés provenant de différentes classes biosynthétiques est intéressante.

Les terpénoïdes sont les métabolites secondaires volatils les plus fréquents et les plus abondants dans les plantes en général.^{198, 199} Il s'agit de la classe de métabolites secondaires la plus vaste en termes de nombre de composés.⁶⁴ Les dérivés d'acides gras sont aussi représentés par un grand nombre de composés volatils dans les plantes.¹⁹⁸ Ici, ces derniers sont représentés par des composés qu'on appelle les oxylipins qui sont des dérivés oxydés d'acides gras.²⁰⁰ Plus particulièrement, les dérivés d'acides gras qui représentent une grande partie des deux échantillons de fraction volatile de *Betula glandulosa* sont des métabolites qui sont décrits

comme des *Green Leaf Volatiles*, des GLVs. Ces composés volatils de feuilles vertes, si l'on traduit l'expression anglophone, appartiennent à une branche biosynthétique de la voie des oxylipins et sont des alcools et des aldéhydes à six carbones, ainsi que leurs esters.²⁰¹ Les oxylipins et les GLVs sont reconnus comme d'importants métabolites de communication chez les plantes, pour la communication entre les plantes et avec les autres organismes, qui peuvent être biosynthétisés en réponse à des stress comme des blessures et des pathogènes^{200, 201} Généralement, les GLVs sont peu concentrés dans les plantes saines et intactes. Ils sont produits rapidement lorsque des blessures surviennent et sont très volatils.²⁰¹ Les métabolites secondaires qui sont relâchés rapidement par les plantes en cas d'attaques d'herbivores (dont les GLVs) sont les mêmes que ceux qui sont relâchés lors de blessures engendrées par une lame de rasoir.²⁰² Ainsi, la grande présence de ces métabolites dans les extraits volatils peut être le résultat de la récolte ou de la manipulation de la matière, tout comme elle peut être le témoin d'un mécanisme de défense du bouleau glanduleux contre des attaques d'herbivores, d'insectes ou encore la présence de pathogènes. Les résultats présentés ici ne permettent pas de tirer de conclusion sur ce sujet. Leur présence est cependant la preuve de la présence de mécanismes de défense et de communication chez le bouleau glanduleux. Des études portant sur leurs impacts pour ce bouleau seraient intéressantes et pourraient peut-être apporter des indices sur les raisons qui font que cet arbuste est rarement consommé par certains herbivores comme le lièvre d'Amérique.¹⁹⁰

6.1.2 Comparaison avec d'autres espèces du genre *Betula*

La composition en métabolites secondaires volatils des échantillons de *Betula glandulosa* qui sont présentés ici ne peut être comparée avec celle d'autres échantillons de *Betula glandulosa* puisqu'il s'agit de la première investigation de sa fraction volatile. Néanmoins, plusieurs autres bouleaux ont fait l'objet d'investigations phytochimiques de leur huile essentielle ou de leurs composés volatils.

Parmi ceux-ci, le bouleau nain, *Betula nana*, qui est morphologiquement très proche du bouleau glanduleux¹⁸⁸, a été étudié conjointement à d'autres bouleaux et leurs huiles essentielles ont été analysées. De l'huile essentielle de *Betula nana* a déjà été produite, mais elle a été obtenue à l'état de trace et les auteurs ne précisent pas le procédé par lequel ils ont récupéré l'huile essentielle. Les principaux métabolites qui ont été identifiés sont les alcanes n-tricosane (21,5 %), n-pentacosane (16,2 %), n-eicosane (7,1 %), n-heneicosane (6,2 %), n-nonadecane (6,0 %), l'acide palmitique (un acide gras) (5,0 %) et l'acétone d'hexahydrofarnesyl. Très peu de linalool a été retrouvé dans cet extrait (0,8 %), les auteurs n'ont rapporté aucune trace d' α -terpinéol ou de phénylpropanoïdes.¹⁹⁴ Les métabolites volatils retrouvés dans l'huile essentielle de *Betula nana* en Estonie diffèrent donc grandement de ceux qui ont été retrouvés dans la fraction volatile de *Betula glandulosa*. Évidemment, une partie des différences peut être liée à la récupération de métabolites volatils hydrosolubles²⁰³ lors de l'extraction de l'hydrolat, comme ce fut fait pour les extraits de *Betula glandulosa*, puisqu'il n'est pas

mentionné le moyen utilisé pour récupérer la trace d'huile essentielle dans l'étude présentée pour *Betula nana*¹⁹⁴. Cependant, il apparaît que les métabolites volatils produits par les deux espèces de bouleaux nains, même en excluant les GLVs, sont très différents, si l'on se fie aux résultats rapportés jusqu'à maintenant. Ces résultats sont cependant peu nombreux et ne reflètent probablement pas la chimiodiversité de ces deux espèces.

Pour ce qui est des autres bouleaux, il est généralement rapporté que les métabolites secondaires volatils présents dans leurs huiles essentielles (certaines espèces de bouleaux produisent une quantité non-négligeable d'huile essentielle) sont plutôt des sesquiterpènes et des sesquiterpénoïdes comme l' α -betulenol (14-hydroxy- β -caryophyllène), le 14-hydroxy-4,5-dihydro- β -caryophyllène, le β -betulénal, le des-4-méthylcaryophyll-8(14)-èn-5-one, l'oxyde de caryophyllène, l'humulène ou le β -caryophyllène.^{192, 194, 204} *Betula nana* a été noté comme présentant une composition très différentes¹⁹⁴ de même que *Betula medwediewii* (riche en salicylate de méthyle et salicylate d'éthyle)¹⁹². Le linalool n'est jamais rapporté comme un métabolite majoritaire dans ces études. L'oxyde de caryophyllène, le 14-hydroxy-4,5-dihydro- β -caryophyllène, le 14-hydroxy- β -caryophyllène, le β -caryophyllène et l'humulène sont présent dans les échantillons volatils de *Betula glandulosa*, mais seul l'oxyde de caryophyllène est présent à plus de 0,5 % (BeGI HY 001). Il semble donc y avoir des différences importantes parmi les bouleaux au niveau de leurs compositions en métabolites secondaires volatils.

Ces différences, si elles pouvaient être observées à l'aide d'un plus grand nombre d'échantillons provenant de différents endroits, pourraient permettre d'utiliser la composition en métabolites secondaires volatils en chimiotaxonomie¹⁹⁴, entre autres pour différencier des espèces très proches morphologiquement comme *B. nana* et *B. glandulosa*.

7 Conclusion

Dans ce chapitre, un projet de caractérisation des métabolites secondaires volatils du bouleau glanduleux a été présenté. Des feuilles de *B. glandulosa* ont été récoltées près de Whapmagoostui-Kuujuarapik, au Nunavik, Québec, Canada, et ont été utilisées pour tenter de préparer de l'huile essentielle. Puisqu'aucune huile essentielle n'a été observée, à tout le moins pas en quantité suffisante pour pouvoir la récupérer par des procédés physiques, la fraction volatile a été extraite de l'hydrolat et a été caractérisée. Il s'agit ici de la première investigation phytochimique des métabolites volatils du bouleau glanduleux et d'une rare investigation de ses métabolites secondaires. Plus de 90 % de la composition des extraits a été identifiée. La composition moléculaire renferme à la fois des terpénoïdes, des dérivés d'acides gras et des phénylpropanoïdes. Cette composition en métabolites volatils diffère de la composition déjà observée pour plusieurs espèces du genre

Betula, dans leurs huiles essentielles. Ces différences sont intéressantes et peuvent laisser croire que les métabolites secondaires des bouleaux pourraient être utilisés en chimiotaxonomie.

Il s'agissait ici d'un premier projet du genre dans notre laboratoire. La caractérisation d'un plus grand nombre d'échantillons, de mêmes sites et de sites différents aurait été intéressante afin d'obtenir plus d'information sur les métabolites secondaires du bouleau glanduleux, une espèce abondante dans le Nunavik. Des ajustements au niveau des méthodes de production des fractions volatiles pourront être apportés afin d'en récolter davantage, ce qui pourrait permettre d'utiliser moins de matière végétale par échantillon. Les études phytochimiques de plantes qui n'ont jamais été étudiées ou presque permettent d'acquérir des connaissances intéressantes et importantes qui améliorent la compréhension et le savoir sur le métabolome. Les travaux sur les végétaux de la nordicité remplissent ces objectifs généraux de la phytochimie et permettent de mieux connaître ces régions négligées par les chercheurs.

Chapitre 4 Investigation de l'impact de la nordicité sur le métabolome des lichens *C. stellaris* et *S. paschale*

1 Objectifs spécifiques

- Développer une méthode d'extraction et d'analyse semi-quantitative normalisée pour analyser des échantillons de lichens;
- Valider la méthode développée;
- Extraire les métabolites secondaires d'échantillons récoltés selon un gradient de latitude;
- Analyser de manière semi-quantitative les extraits selon la méthode développée;
- Comparer les résultats obtenus pour chaque échantillon en fonction de la latitude pour déceler des variations au niveau de certains métabolites secondaires;
- Déterminer si la latitude et le degré de nordicité ont un effet sur la composition en métabolites secondaires dans les lichens.



Figure 38. Tapis de lichen *Cladonia stellaris*.

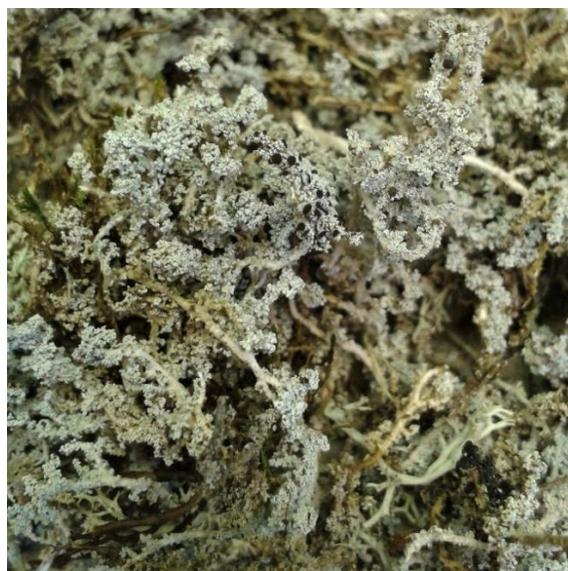


Figure 39. Un échantillon du lichen *Stereocaulon paschale* séché.

2 Présentation générale des lichens à l'étude

2.1 *Cladonia stellaris*

2.1.1 Description et classification botanique

Nom scientifique : *Cladonia stellaris* (Opiz) Pouzar & Vězda.²⁰⁵

Noms vernaculaires : Cladonie étoillée.²⁰⁶

Le lichen *Cladonia stellaris* (Opiz) Pouzar et Vězda est un lichen du genre *Cladonia*, composé de plus de 400 espèces.²⁰⁷ Il s'agit d'un lichen formant un thalle en apparence fruticuleux, avec un thalle primaire squamuleux. Il a l'apparence d'un buisson, de couleur jaune-vert pâle et s'élève entre 4 et 7 centimètres.²⁰⁸ On retrouve cette espèce un peu partout dans le nord de l'Amérique du Nord, dans le nord de l'Europe ainsi qu'à quelques endroits dans le nord de l'Asie.^{206, 207}

2.2 *Stereocaulon paschale*

2.2.1 Description et classification botanique

Nom scientifique : *Stereocaulon paschale* (L.) Hoffm.²⁰⁹

Le lichen *Stereocaulon paschale* (L.) Hoffm. appartient au genre *Stereocaulon*. Il s'agit d'un lichen de type fruticuleux avec des tiges érigées allant jusqu'à 6 cm. Il croit sur des sols, sur de l'humus et sur le sol au-dessus de roches.²¹⁰ Il est retrouvé à différents endroits dans le monde, dans le nord de l'Amérique du Nord (Alaska, côte Pacifique du Canada, Est du Canada, régions arctiques), dans le nord de l'Europe (Finlande, Suède et Norvège, entre autres), au Japon ainsi qu'à quelques autres endroits dans le monde où sa présence est moins importante.²¹¹

2.3 Justification du choix

Pour le projet d'investigation de l'impact de la nordicité sur les organismes, certains critères quant au choix des organismes étaient différents de ceux énoncés précédemment. La collaboration du Pr Stéphane Boudreau a, ici aussi, été sollicitée afin d'identifier des organismes qui seraient intéressants pour un projet comme celui-ci.

2.3.1 Vaste répartition géographique

Une vaste répartition géographique à travers le Québec était nécessaire puisqu'un des objectifs était d'analyser des échantillons provenant de différentes latitudes afin d'en comparer la composition en métabolites secondaires, en fonction du degré de nordicité. Ce critère a donc été évalué pour les organismes considérés. Les forêts de lichens sont un type de végétation dominant dans la forêt boréale de l'Amérique du Nord.^{212, 213} *Cladonia stellaris* et *Stereocaulon paschale* sont parmi les espèces de lichens qui sont les plus présentes dans plusieurs écosystèmes dominés par les lichens.²¹⁴

2.3.2 Abondance de la matière

L'abondance de la matière première était un critère moins important ici que pour les projets d'investigations d'huiles essentielles ou d'extraits volatils, car les analyses ne requéraient pas une aussi grande quantité de matière première. Il fallait malgré tout pouvoir récolter plusieurs échantillons sans endommager la ressource et il fallait que les organismes sélectionnés soient faciles à trouver sur le gradient latitudinal à l'étude.

2.3.3 Caractéristiques intrinsèques

Pour ce projet en particulier, afin de pouvoir déceler des impacts découlant de facteurs externes environnementaux pouvant être liés à la nordicité, certaines caractéristiques intrinsèques étaient recherchées. En partant de l'hypothèse que les organismes à croissance lente développent possiblement leurs métabolites secondaires plus lentement et que leur métabolisme est plus lent à synthétiser de nouveaux métabolites en fonction des facteurs externes ponctuels, la sélection s'est faite en considérant ce genre d'organismes. Les lichens ont un développement lent. La croissance de lichens du genre *Cladonia*, par exemple, est de 3 - 6 mm/année.²¹⁵ Les lichens sont considérés parmi les organismes inclus dans les plantes et les fungi qui ont la croissance la plus lente.²¹⁶

3 Revue de littérature sur les extraits des lichens

Cladonia stellaris et *Stereocaulon paschale*

3.1 Les métabolites lichéniques

Les lichens sont des organismes qui possèdent un métabolome très intéressant à étudier. En date de 2017, c'est autour de 1050 métabolites secondaires qui avaient été rapportés dans des lichens et près de 85 % d'entre eux étaient uniques aux lichens, c'est-à-dire qu'ils n'ont jamais été observés dans des plantes ou des fungi non lichéniques.²¹⁷

Le lichen *Cladonia stellaris* a fait l'objet de quelques investigations de sa composition en métabolites secondaires. Il est principalement composé de l'acide usnique et de l'acide perlatolique.^{208, 218-220} À ces deux métabolites secondaires s'ajoute parfois l'acide psoromique parmi les métabolites majoritaires. La présence de ce dernier métabolite a permis de considérer l'existence de deux chimiotypes répandus pour ce lichen, le premier sans acide psoromique (seulement les acides usnique et perlatolique) et le second en incluant l'acide psoromique.^{208, 219} Dans certains cas, l'acide perlatolique ne représente pas un métabolite important et un troisième chimiotype est rapporté, composé d'acide usnique (majoritaire) et d'acide psoromique. Dans quelques cas, l'acide usnique est le seul métabolite majeur et cette composition moléculaire est parfois attribuée à un quatrième chimiotype.²¹⁹ Certains auteurs considèrent les chimiotypes contenant de l'acide psoromique comme une espèce distincte, *Cladonia aberrans*, mais ils sont plus généralement reconnus comme des chimiotypes régionaux (*Cladonia stellaris* var. *aberrans*).²¹⁹ Pour ce qui est des métabolites secondaires mineurs dans le lichen *Cladonia stellaris*, plusieurs composés ont déjà été rapportés lors de différentes études comme l'acide olivetolique, l'ester méthylique de l'acide olivetorique, le diphénylméthanol, le 5-pentylrésorcinol, l'acide '2-O-déméthylpsoromique, l'acide 4-O-méthylolivetorique, l'éthyl-2,4-dihydroxy-6-pentylbenzoate, l'éthyl-2-hydroxy-4-méthoxy-6-pentylbenzoate et l'acide 4-O-méthylolivetocarboxylique.^{218, 219, 221}

Le lichen *Stereocaulon paschale* a rarement fait l'objet d'études de ses métabolites secondaires. Quelques métabolites secondaires ont été isolés et identifiés dans ce lichen dont l'acide lobarique (le métabolite rapporté comme majoritaire), le β -orcinol carboxylate de méthyle, l'haematommate de méthyle, l'haematommate d'éthyle, l'acide isostrepsilique, le sakisacaulon A, la lobarine méthylée, la lobarine estérifiée, le sakisacaulon méthylé, le sakisacaulon A estérifié, l'anhydro sakisacaulon, l'acide norlobarique. Dans le genre *Stereocaulon*, l'acide lobarique, l'acide stictique et l'acide norstictique, trois depsidones, ainsi que l'atranorine, un depside, sont les métabolites secondaires les plus fréquents et les plus abondants.^{221-224 225}

3.2 Rôles biologiques des métabolites lichéniques

Les métabolites lichéniques, des métabolites secondaires, sont produits par les lichens pour répondre à différents besoins. Comme les autres métabolites secondaires, ils remplissent différents rôles biologiques. L'adaptation des lichens aux conditions de vie difficiles qui sont retrouvées dans certains de leurs habitats est liée à la présence de métabolites secondaires de protection.²¹⁷ Les lichens sont souvent retrouvés dans des environnements où ils sont exposés à une radiation UV intense. Il a été rapporté que plusieurs des métabolites lichéniques remplissent, entre autres, un rôle de protection vis-à-vis de cette radiation.^{226, 227} D'autres métabolites lichéniques sont considérés comme jouant un rôle de défense contre les stress oxydatifs.²¹⁶ Aussi, certains des métabolites lichéniques sont produits pour fournir des minéraux à l'organisme, ou encore jouent un rôle dans la relation symbiotique entre le photobiotte et le mycobiote, les deux organismes qui composent les

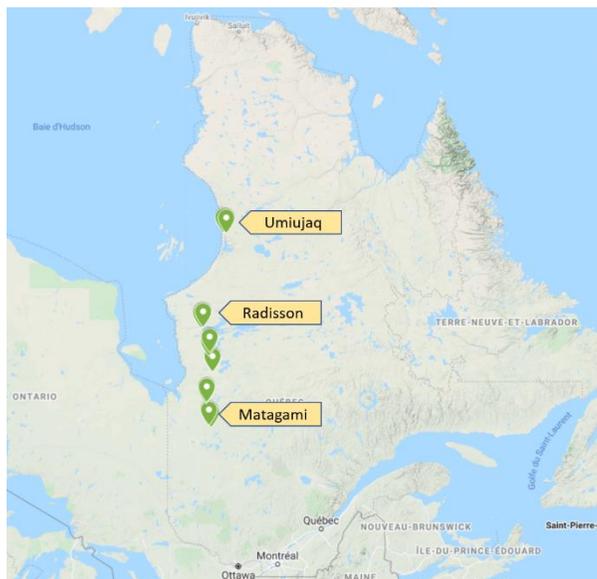
lichens. Il semble aussi que certains des métabolites lichéniques servent à la communication avec leur environnement (les autres organismes).²¹⁶ Les métabolites secondaires permettent aussi au lichen de se protéger contre les insectes, les herbivores et les parasites, selon leurs activités biologiques rapportées.^{228, 229} De plus, l'hydrophobicité de certains métabolites lichéniques permet aux lichens de ne pas être saturés en eau.²³⁰

3.3 Influence des facteurs biotiques et abiotiques

Grâce à leurs propriétés (croissance lente, métabolites secondaires spécifiques, rôles biologiques de leurs métabolites, présence dans différents environnements dont des environnements extrêmes, etc.), les lichens montrent un grand potentiel pour l'observation des changements climatiques et les études environnementales.²¹⁷ Les lichens sont retrouvés dans des écosystèmes où les conditions environnementales et les stress biotiques et abiotiques sont parfois extrêmes.²³⁰ Des recherches sur l'influence de certains facteurs externes sur le métabolisme secondaire ont déjà été faites. Par exemple, une investigation de la concentration de l'acide usnique et de l'acide perlatolique dans des lichens *Cladonia stellaris* récoltés à différentes latitudes a déjà été rapportée et visait à observer des variations dans la concentration de ces deux métabolites, ainsi qu'au niveau des énantiomères de l'acide usnique, qui seraient liées à l'emplacement géographique et à la latitude. Cette étude effectuée en Finlande a permis d'observer des variations de la concentration de ces métabolites sans pouvoir observer de corrélation avec la position latitudinale.²¹⁸

L'effet de quelques facteurs externes a aussi été investigué. L'acide usnique et l'acide perlatolique ont quelques fois servi de marqueurs puisqu'ils sont abondants dans le lichen *Cladonia stellaris* et que ce lichen est abondant lui aussi. Les effets d'un réchauffement global simulé sur la concentration de ces métabolites ont été étudiés, pour le lichen *Cladonia stellaris*. L'acide usnique a été retrouvé en proportion beaucoup plus importante sous les effets d'une augmentation de la température, alors que l'acide perlatolique a diminué.²³¹ Une hausse de l'acide usnique a été observée dans trois lichens du genre *Cladonia*, dont *Cladonia stellaris*, en soumettant des lichens à une forte exposition à des rayons UV. Les rayons UV-B ont eu une influence sur la concentration en acide usnique.²³² Dans une autre étude de l'effet du rayonnement UV-B sur la concentration en acide usnique dans les lichens *Flavocetraria nivalis* et *Nephroma arcticum*, cette augmentation n'a pas été notée.²³³ Plusieurs autres études ont tenté d'observer les effets de facteurs externes sur les métabolites lichéniques comme l'effet de la saisonnalité ou de l'altitude.²³⁰

4 Développement et validation d'une méthode d'extraction normalisée pour l'analyse semi-quantitative des échantillons lichéniques



(Google map, 2020, maps.google.com.)

Figure 40. Localisation des sites d'échantillonnage des lichens *S. paschale* et *C. Stellaris* suivant un gradient latitudinal entre les municipalités de Matagami et d'Umiujaq.

4.1 Développement de méthode

Le développement d'une méthode d'extraction et d'analyse d'échantillons lichéniques permettant la comparaison rapide de plusieurs échantillons a été inspiré par la méthodologie déjà utilisée au laboratoire et présentée en détail par Claudia Carpentier dans son mémoire²²¹ ainsi que par des méthodes d'analyse présentées dans la littérature par quelques auteurs ayant rapporté des méthodes d'analyse quantitative de composés lichéniques, principalement l'acide usnique, l'acide perlatolique, l'acide lobarique et l'atranorine, des métabolites principaux de la plupart des échantillons de lichens *Cladonia stellaris* et du genre *Stereocaulon*.^{217, 218, 220, 234} La méthode a été développée de manière à permettre des analyses normalisées de plusieurs métabolites secondaires à la fois, sans avoir à les purifier et à les identifier. Ainsi, une analyse quantitative, en utilisant des standards pour chacun des composés analysés, n'était pas envisagée. À la place, la normalisation a impliqué ici un étalon interne permettant de corriger les fluctuations dues aux étapes durant l'extraction et l'analyse des échantillons. Les appareils d'analyse disponibles ont été pris en compte dans le choix de la méthodologie. Plusieurs paramètres ont été évalués et optimisés pour en arriver à une méthode permettant

d'arriver à nos fins. Le développement de la méthode s'est fait en utilisant un échantillon de chaque lichen (*Cladonia stellaris* et *Stereocaulon paschale*) prélevé dans les environs de Whapmagoostui-Kuujuuarapik en 2018 et en 2019 respectivement, qui ne figure pas parmi les échantillons prélevés en 2016 pour le projet en question ici.

4.2 Partie expérimentale

4.2.1 Solvants, réactifs et étalons

L'acétone utilisée pour l'extraction est de qualité ACS (Fisher Chemical). Le méthanol utilisé pour la préparation des solutions de étalons internes est de qualité HPLC (Fisher Chemical). Le DMSO utilisé pour la reconstitution des échantillons est de grade HPLC (Fisher Chemical). L'acide acétylsalicylique U.S.P. a été acheté chez Fisher Scientific et l'acide 2,6-diméthoxybenzoïque 98 % a été acheté chez Aldrich. Pour les analyses HPLC, de l'eau nanopure (Barnstead Nanopure II), de l'acétonitrile de grade HPLC (Fisher Chemical) et de l'acide formique (Sigma Aldrich) ont été utilisés dans la préparation des phases mobiles.

4.2.2 Récolte et traitement des échantillons

La récolte des échantillons des lichens *Stereocaulon paschale* et *Cladonia stellaris* a été effectuée au printemps 2016 par des étudiants du groupe du Pr Stéphane Boudreau. Les échantillons ont été récoltés le long de la route de la Baie-James, au Québec, Canada, mais en s'éloignant de la route à chaque point de récolte, ainsi que dans la région d'Umiujaq, au Nunavik, Québec, Canada. Le tableau 20 présente les positions de récolte ainsi que les dates de récolte des échantillons, qui sont identifiés en fonction de la borne kilométrique la plus proche sur la route de la Baie James et selon un descriptif fait par les étudiants qui ont récolté la matière pour les échantillons provenant de la région d'Umiujaq. À la figure 40, une carte est présentée, avec des marqueurs pour la position des sites de récolte. Les échantillons n'ont pas été récoltés tous à la même date, plusieurs jours séparent l'échantillonnage des échantillons sur la route de la Baie James de l'échantillonnage au Nunavik pour des raisons logistiques.

La route de la Baie James s'étend sur plusieurs kilomètres dans la forêt boréale ouverte caractérisée par des pessières à mousse et jusqu'à la zone de forêt boréale ouverte caractérisée par des pessières à lichens, dans le cas du village de Radisson, d'après les zones de végétation illustrée à la figure 2. Le village inuit d'Umiujaq est situé au Nunavik, Québec, Canada, et se trouve à la frontière des zones de végétation de toundra forestière et de toundra arbustive, une région décrite comme une mosaïque de toundra de lichen, de bosquets d'arbustes et de quelques peuplements forestiers.²³⁵ Après la récolte, les échantillons de lichen ont été entreposés dans des sacs de papier bien identifiés et datés et laissés à sécher à l'air libre, à température pièce. Ils ont été conservés ainsi jusqu'à leur utilisation.

Tableau 20. Information concernant la récolte des échantillons des lichens *Stereocaulon paschale* et *Cladonia stellaris* au printemps 2016.

Id. de l'échantillon	Position			Date de récolte
	Latitude	Longitude	Altitude	
Km 116	N 50°26'29.5"	O 77°09'07.8"	301 m	26-05-2016
Km 125	N 50°29'08.1"	O 77°17'39.2"	328 m	26-05-2016
Km 239	N 51°14'39.1"	O 77°25'29.1"	235 m	26-05-2016
Km 247	N 51°18'05.9"	O 77°22'40.6"	250 m	26-05-2016
Km 386	N 52°16'06.5"	O 77°06'06.8"	198 m	26-05-2016
Km 393	N 52°18'03.3"	O 77°05'59.1"	213 m	26-05-2016
Km 476	N 52°50'24.3"	O 77°17'17.6"	202 m	26-05-2016
Km 488	N 52°55'58.0"	O 77°16'33.3"	230 m	26-05-2016
Km 607	N 53°43'43.3"	O 77°40'36.6"	176 m	26-05-2016
Km 612	N 53°44'43.5"	O 77°36'00.5"	183 m	26-05-2016
Umiujaq Vallée	* N 56°33'30.9"	* O 76°32'55.2"	ND	26-07-2016
Umiujaq Plateau				28-07-2016

* Positions approximatives pour Umiujaq. Les positions exactes des sites n'ont pas été notées.

Avant de procéder aux extractions, chaque échantillon a été minutieusement trié afin de retirer tout ce qui ne correspondait pas au lichen concerné (autres lichens, morceaux de végétaux, excréments, terre, etc.). Les échantillons ainsi triés ont ensuite été soumis à un cryobroyage (broyage au mortier et pilon en baignant la matière lichénique dans de l'azote liquide). Le cryobroyage a été fait jusqu'à l'obtention d'une fine poudre d'apparence homogène.

4.2.3 Préparation des étalons internes

Une solution mère a été préparée pour chaque étalon interne. La solution d'étalon interne A a été préparée à une concentration de 11 mg/ml d'acide acétylsalicylique. La solution d'étalon interne B a été préparée à 45 mg/ml d'acide 2,6-diméthoxybenzoïque. Les deux solutions mères ont été préparées avec du méthanol de grade HPLC et conservées dans des bouteilles en verre avec bouchon en PTFE (Qorpak) à 4 °C et sorties seulement pour les analyses.

4.2.4 Préparation des extraits

La préparation des extraits s'est faite selon la méthode qui a été développée. Plusieurs paramètres ont été évalués et optimisés en fonction du rendement d'extraction, de l'écart type, de la possibilité d'analyser les extraits en HPLC-PDA-ELSD (chromatographie liquide haute-performance (HPLC) couplée à un détecteur UV-visible (PDA) et un détecteur évaporatif à diffusion de la lumière (ELSD)) et de considérations pratiques.

Ainsi, la matière lichénique broyée a été pesée pour préparer des répliques d'un même échantillon homogène. La masse utilisée, 250 mg, a été déterminée en fonction de la quantité de matière lichénique

disponible, parfois faible pour certains échantillons, ainsi que du signal obtenu (qui implique plusieurs autres paramètres de l'extraction).

Le type d'extraction choisi, la macération, est une méthode classique pour obtenir des métabolites secondaires, dont les métabolites secondaires lichéniques. Le choix de l'acétone a été fait selon ce qui est fréquemment trouvé dans la littérature pour l'extraction de lichens. La durée (30 minutes) a, quant à elle, été optimisée. Le volume de solvant, 50 ml, a été choisi en prenant en compte le ratio entre la quantité de matière lichénique et le volume de solvant. Les contenants utilisés sont des bouteilles en verre, 60 ml, avec bouchons PTFE (Qorpak). Durant la macération les bouteilles ont été agitées sur un agitateur horizontal, avec une cadence régulière et constante tout au long de la macération.

La filtration s'est faite sous vide à l'aide d'un entonnoir Büchner, avec des papiers-filtres Whatman. L'évaporation de l'acétone s'est faite sur un évaporateur rotatif, avec un bain thermostaté à 35 °C et les échantillons ont ensuite été séchés sur une rampe à vide.

Les échantillons séchés et pesés ont été reconstitués avec 5,000 ml de DMSO. Le solvant a été sélectionné parmi plusieurs solvants de reconstitution testés en fonction de la solubilité des échantillons et des impacts sur la chromatographie.

Un résumé de la méthode d'extraction est présenté au tableau 21.

Tableau 21. Résumé de la méthode d'extraction des échantillons de lichen.

Masse de lichen :	0,250 g
Nombre de réplicas :	4
Volume d'étalons internes :	200 µl de chaque solution
Type d'extraction :	Macération
Solvant :	Acétone (50 ml)
Durée :	30 min
Contenant :	Bouteilles en verre (60 ml) avec bouchons PTFE (Qorpak)
Conditions particulières :	Agitation horizontale constante
Filtration :	Sur Büchner, papier-filtre Whatman
Évaporation :	Évaporateur rotatif, bain thermostaté à 35 °C et séchage sur rampe à vide
Reconstitution :	5,000 ml (DMSO)

4.2.5 Analyse des extraits

L'analyse des extraits s'est faite par HPLC-PDA-ELSD (Agilent Technologies 1260 Infinity et Agilent Technologies 1260 Infinity ELSD). La colonne avait une phase stationnaire de type C18-HC 1 et des dimensions

de 150 mm X 4,6 mm X 5 µm (Phenomenex). Les phases mobiles étaient composées d'eau contenant 0,1 % d'acide formique (MPA) et d'acétonitrile contenant 0,1 % d'acide formique (MPB).

Les injections ont été faites à deux volumes différents (5 µl et 40 µl), en deux injections pour chaque échantillon, de manière à évaluer autant des métabolites secondaires très concentrés que des métabolites secondaires beaucoup moins concentrés. Le débit de phase mobile était de 0,900 ml/min avec un gradient débutant à 5 % de MPB, jusqu'à 100 % en 35 min, gardé à 100 % jusqu'à 40 minutes puis un retour à 5 % en 1 minute et gardé dans ces conditions initiales jusqu'à 51 min.

Les paramètres de la méthode ont été optimisés de manière à avoir une séparation adéquate des pics observés, à avoir un signal intéressant et à permettre une intégration répliquable, pour la semi-quantification. Le détecteur UV-visible a été utilisé pour la semi-quantification par intégration des pics sur le chromatogramme. La longueur d'onde de détection est de 280 nm. Une méthode d'intégration a été développée et utilisée avec les mêmes paramètres pour tous les échantillons afin d'assurer la constance. Le détecteur ELSD a été utilisé pour avoir une idée de la proportion des métabolites.

4.2.6 Choix des étalons internes

Pour la normalisation de cette méthode, le choix s'est arrêté sur l'utilisation d'un étalon interne, permettant de corriger les fluctuations entraînées par l'extraction et l'analyse et de s'assurer de la constance des analyses grâce à la présence de composés à concentration constante. Le choix des étalons internes s'est fait en s'inspirant de la littérature. Quelques composés ont été évalués. Leur disponibilité au laboratoire, leur signal en UV-visible et en ELSD, leur utilité pour la correction des fluctuations, la constance de leur signal d'une injection à l'autre, leur stabilité après l'extraction, leur séparation avec les pics d'analytes et leur solubilité sont tous des critères qui ont servis à déterminer les meilleurs étalons internes.

Certains étalons internes ont déjà été utilisés lors de l'analyse de métabolites secondaires lichéniques comme l'acide benzoïque et la vanilline.^{217, 220} Nous avons évalué la vanilline, l'acide acétylsalicylique, l'acide 2,6-diméthoxybenzoïque et l'acide 3,4,5-triméthoxybenzoïque. L'acide acétylsalicylique (SI A) et l'acide 2,6-diméthoxybenzoïque (SI B) ont été sélectionnés, un étalon interne pour chaque volume d'injection.

4.2.7 Comparaison des échantillons

La semi-quantification s'est faite par intégration des pics du chromatogramme et en calculant le ratio entre l'aire d'un analyte et de l'étalon interne associé. Les résultats sont donc présentés comme des moyennes des ratios calculés pour chaque analyte pour 4 répliquas de chaque échantillon, avec l'écart type. Le pourcentage de coefficient de variation (% CV), calculé comme le ratio entre l'écart type et la moyenne et exprimé en

pourcentage, a été utilisé pour déterminer la fiabilité des résultats expérimentaux. Le seuil acceptable des coefficients de variation a été de 15 %. Les analytes ont été comparés entre eux, en fonction du ratio de leur signal dans chaque échantillon.

4.2.8 Normalisation des étapes

Le processus d'extraction et d'analyse a été prévu pour être effectué toujours selon une même méthode, avec un soin apporté à bien respecter la procédure établie lors du développement de la méthode. Les appareils, le matériel, les solvants et les étalons internes utilisés ont été les mêmes pendant la validation et l'analyse des échantillons. L'analyste a aussi été la même personne tout au long de ce processus, pour limiter au maximum les changements.

4.2.9 Rejet de données aberrantes

Aucune donnée aberrante n'a été rejetée durant la validation de la méthode, pour conserver toutes les données et avoir un portrait plus fidèle des résultats qui sont obtenus expérimentalement. Pour ce qui est des données d'analyse des échantillons de lichens prélevés à différentes latitudes, quelques données aberrantes ont été rejetées pour les analytes validés qui présentaient une valeur qui ne semblait pas reliée aux autres répliques d'un même échantillon. Les valeurs rejetées ont été limitées aux analytes validés qui n'obtenaient pas un pourcentage de coefficient de variation de moins de 15 % entre les répliques lors de l'analyse des échantillons du gradient latitudinal et pour lesquels une valeur était très différentes des trois autres. Le test de Dixon (Q)²³⁶ a été utilisé pour reconnaître les données aberrantes, avec un niveau de confiance $\alpha = 0,05$.

4.3 Validation

Une validation de la méthode a été faite, en ayant en tête qu'il s'agit d'une méthode de semi-quantification, pas de quantification, et qu'elle ne vise pas l'obtention d'une concentration chiffrée, mais plutôt la comparaison de la concentration de métabolites secondaires dans des échantillons complexes, naturels. La méthode ne vise pas non plus à connaître la proportion relative des analytes au sein des échantillons, elle vise la comparaison de chaque analyte avec lui-même selon son signal dans chaque échantillon. Les données de la validation sont présentées en annexes. La validation a porté uniquement sur les échantillons du lichen *Stereocaulon paschale*, pour le moment, le lichen qui a été analysé pour la première phase et dont les résultats sont présentés plus loin. Les tests de validation ont été faits en s'inspirant des recommandations du Conseil International d'Harmonisation (ICH)²³⁷, de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC)²³⁸ et de la Direction générale de la santé et de la sécurité alimentaire de la Commission européenne (SANCO)²³⁹.

4.3.1 Spécificité

La spécificité a été évaluée par l'injection d'échantillon de blancs, avec le solvant injecté directement ou le solvant extrait avec la méthode d'extraction puis injecté. Elle a aussi été évaluée en injectant une solution de référence contenant les deux étalons internes, aux concentrations utilisées et en injectant les étalons internes extraits sans échantillons lichéniques. Ces tests, effectués à chaque journée d'analyse durant la validation et l'analyse des échantillons permettent de s'assurer qu'aucun pic interférant n'affecte le signal des analytes, des métabolites lichéniques, à leurs temps de rétention respectifs. Faire ce test sur une base quotidienne permet de s'assurer qu'aucune contamination généralisée ne survient durant l'extraction ou l'analyse et que les solutions d'étalons internes sont stables. La spécificité a été évaluée selon la présence ou l'absence de pics interférant. Cependant, la spécificité au sein des échantillons lichéniques n'a pas été évaluée. La présence de pics interférant cachés sous un pic d'« analyte » n'a pu être déterminée. La résolution des pics d'analyte a cependant été évaluée, visuellement, pour s'assurer de l'absence de déformation des pics due à la présence d'un pic non résolu. Une illustration des chromatogrammes représentatifs des blancs (DMSO injecté et blanc extrait), des solutions d'étalons internes (référence SI en solution, sans extraction, et extrait SI sans lichen) et d'un échantillon extrait de *S. paschale* est présentée à l'annexe 3.

4.3.2 Précision de l'instrument

La précision de l'instrument, c'est-à-dire sa capacité à reproduire un même résultat pour un même extrait, a été évaluée à l'aide de trois injections consécutives d'un même extrait (un même réplica d'un échantillon). La moyenne des trois injections, l'écart type et le coefficient de variation ont été calculés. Le coefficient de variation a été utilisé pour évaluer la précision de l'instrument pour chaque analyte avec 15 % comme seuil maximal, mais idéalement, pour ce test, nous désirions obtenir 5 % ou moins. Les données des tests de précision de l'instrument sont présentées à l'annexe 2.

4.3.3 Réplicabilité

La réplicabilité a été évaluée plusieurs fois par l'extraction de huit répliques d'un échantillon lichénique réel. La réplicabilité a été vérifiée pour chaque analyte individuellement. La moyenne des répliques a été calculée, ainsi que l'écart type, et le coefficient de variation a été utilisé pour évaluer la réplicabilité. Les analytes présentant un coefficient de variation de moins de 15 % ont été considérés comme réplicables. Tous les analytes ont tout de même été considérés pour les comparaisons entre les échantillons, avec mention des analytes considérés comme incertains, non valides, puisque malgré des coefficients de variation plus élevés, les divergences entre les échantillons pourraient parfois être beaucoup plus grandes. La validation de la réplicabilité s'est faite à une seule concentration, dans un échantillon réel. Elle n'a pas été vérifiée à différents niveaux,

malgré le fait que les analytes soient observés à différentes concentrations selon l'échantillon. Les données des tests de réplicabilité sont présentées à l'annexe 4.

4.3.4 Répétabilité

La répétabilité a été évaluée seulement en changeant la journée d'analyse, le facteur temps, mais en conservant le même analyste, le même appareil et tous les autres paramètres. Il était déjà prévu de ne pas changer d'appareil d'analyse ou d'analyste pour ce projet. Ces paramètres pourront être validés plus tard pour démontrer la répétabilité à ce niveau. La façon dont la répétabilité doit, selon l'ICH, être établie est en fonction des conditions selon lesquelles la méthode sera utilisée.²³⁷ La répétabilité a été évaluée, dans un premier temps, en comparant deux journées d'extraction (huit répliques par journée) avant l'analyse des échantillons et, dans un second temps, en prenant aussi en compte une journée d'analyse (huit répliques) effectuée après l'analyse des échantillons. Le coefficient de variation a été utilisé, ici aussi, pour évaluer la validité des résultats, avec 15 % comme seuil maximal. Les données des tests de répétabilité sont présentées à l'annexe 5.

4.3.5 Stabilité des analytes

La stabilité après l'extraction des analytes a été évaluée par une réinjection d'une séquence évaluant la réplicabilité. Les échantillons ont été réinjectés 20 heures après la première injection, ce qui correspond à la durée des séquences d'injection faites lors des analyses. Ce test permet de vérifier que chaque analyte ne présente pas de diminution ou d'augmentation importante de son ratio au cours d'une séquence d'injection. Les analytes ayant présenté un pourcentage de changement plus grand que $\pm 15\%$ en 20 heures ont été notés. Ils ont été considérés lors des analyses, mais leur potentiel de changement en fonction du temps a été pris en compte lors des comparaisons entre les échantillons. Les données de stabilité sont présentées à l'annexe 6.

5 Résultats

Les résultats présentés ici concernent les échantillons du lichen *Stereocaulon paschale*, prélevés selon un gradient latitudinal à l'été 2016. Au total, 12 échantillons ont été extraits, analysés et comparés pour tenter d'observer des variations de la concentration de certains analytes, lors de cette première phase d'analyses d'échantillons. Les échantillons extraits, toujours par 4 répliques, ont été pesés après extraction et évaporation du solvant et les rendements d'extraction sont présentés au tableau 22. La figure 41 permet une meilleure représentation visuelle des rendements en fonction du site d'échantillonnage et de la latitude. Le rendement d'extraction se situe entre 7,55 % et 9,19 %, selon l'échantillon, des pourcentages qui incluent la masse d'étalons internes (qui représentent environ la moitié de la masse récupérée). La variation au niveau du rendement entre les répliques est généralement assez faible, à l'exception de l'échantillon du km 239, qui présente un coefficient

de variation de 11,06 %. Les résultats indiquent que le procédé d'extraction est constant, au moins au niveau de la masse extraite. Si l'on compare les divers échantillons entre eux, la moyenne du rendement pour les échantillons de lichen *S. paschale* est de 8,53 % et le coefficient de variation total est de 6,28 %. Ces résultats indiquent qu'en général le rendement d'extraction est assez proche entre les échantillons, même si des variations sont bien visibles et que la différence relative entre les valeurs extrêmes (9,19 % et 7,55 %) est considérable, à 21,72 %. Le graphique présenté à la figure 41 permet de remarquer que les variations de rendements ne semblent pas suivre de tendance claire, à tout le moins pas de tendance en lien avec la latitude.

Tableau 22. Rendements d'extraction des échantillons de lichen *Stereocaulon paschale* prélevés à différentes latitudes.

Échantillon	Rendement (%)		% CV
	Moyenne	Écart type	
Km 116	7,97	0,08	1,00
Km 125	7,99	0,40	5,02
Km 239	8,76	0,97	11,06
Km 247	9,18	0,41	4,51
Km 386	8,15	0,59	7,22
Km 393	9,18	0,17	1,84
Km 476	8,47	0,10	1,22
Km 488	9,19	0,48	5,25
Km 607	7,55	0,10	1,29
Km 612	8,82	0,14	1,56
Umiujaq Vallée	8,68	0,33	3,83
Umiujaq plateau	8,45	0,13	1,48
Total	8,53	0,54	6,28

Les résultats d'analyse HPLC-PDA sont présentés sous forme de graphiques à la figure 44 pour les analytes valides et à la figure 43 pour les analytes non valides. Pour chaque analyte, les résultats sont présentés par site d'échantillonnage et le ratio entre l'aire du pic intégré pour l'analyte et l'aire du pic de l'étalon interne correspondant est utilisé comme variable dépendante. La valeur de ratio est une moyenne des réplicas et les barres d'erreur représentent l'écart type calculé pour ces réplicas. La validation a permis de déterminer neuf analytes répondant aux critères alors que cinq analytes n'ont pas respecté les critères de validité. Pour les neuf analytes validés, les résultats d'analyses des échantillons de *S. paschale* récoltés à différentes latitudes ont montré des coefficients de variation acceptables de moins de 15 % pour chaque échantillon, sauf quelques exceptions. Les exceptions ont été soumises au test de Dixon pour identifier les valeurs aberrantes. Quelques valeurs ont été rejetées sur la base de ce test (maximum un réplica sur quatre) et les échantillons qui ont présenté une valeur aberrante sont identifiés sur les graphiques. Certains écarts types plus grands témoignent

d'échantillons pour lesquels la variation du ratio a été un peu plus grande, mais les coefficients de variation, après retrait des valeurs aberrantes, n'ont dépassé le seuil fixé à 15 % que pour un seul échantillon dans le cas de l'analyte 8 (km 247) et un échantillon dans le cas de l'analyte 9 (km 247).

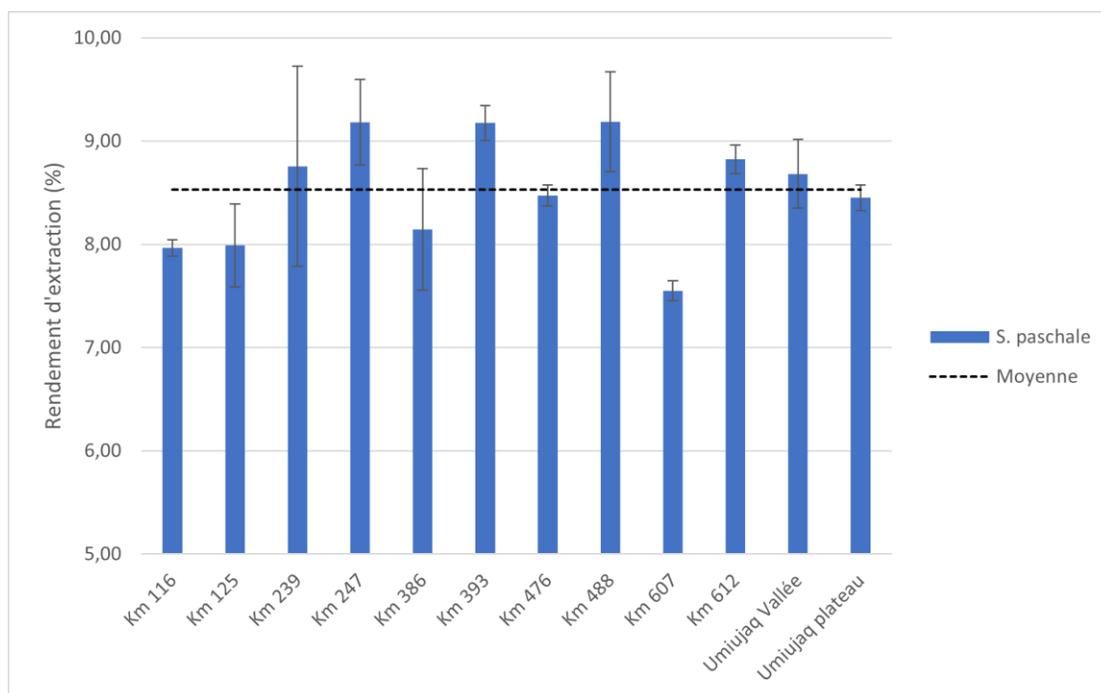
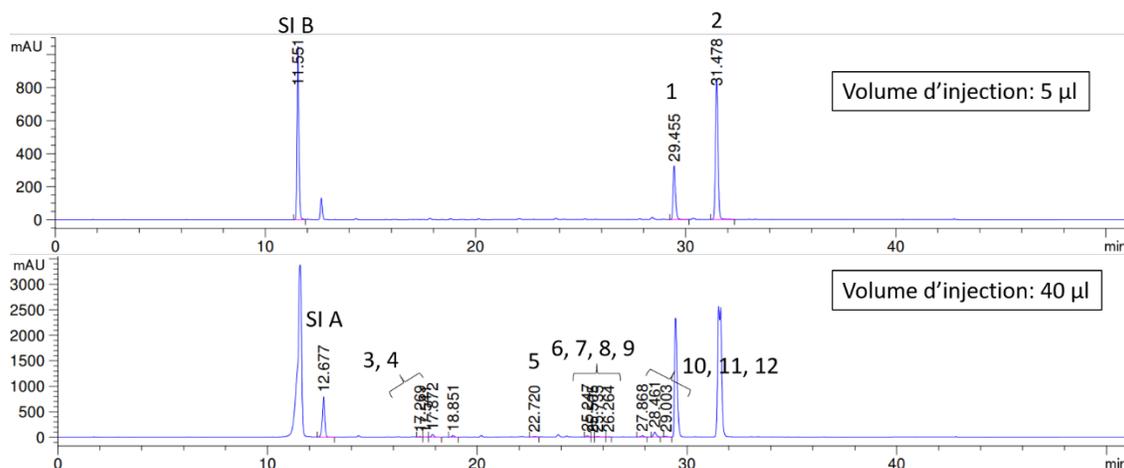
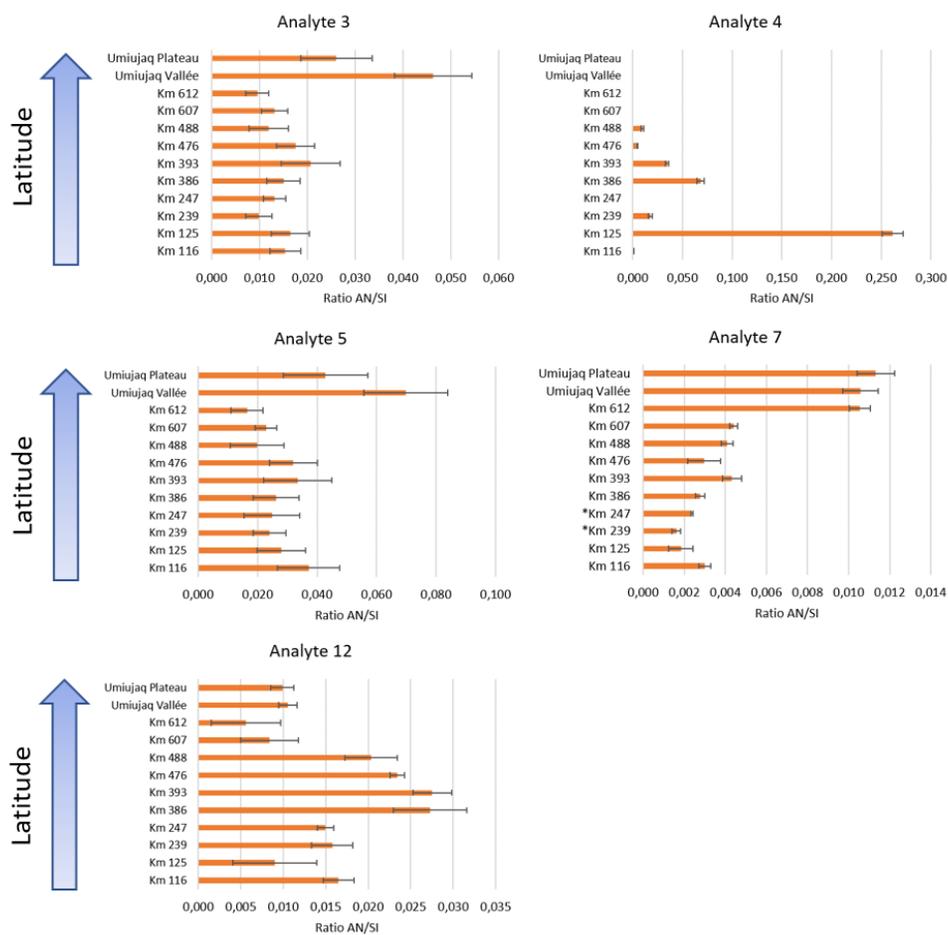


Figure 41. Compilation des rendements d'extraction des échantillons du lichen *S. paschale* selon le site d'échantillonnage.



Les numéros correspondent aux analytes tel qu'ils ont été numérotés pour les analyses comparatives.

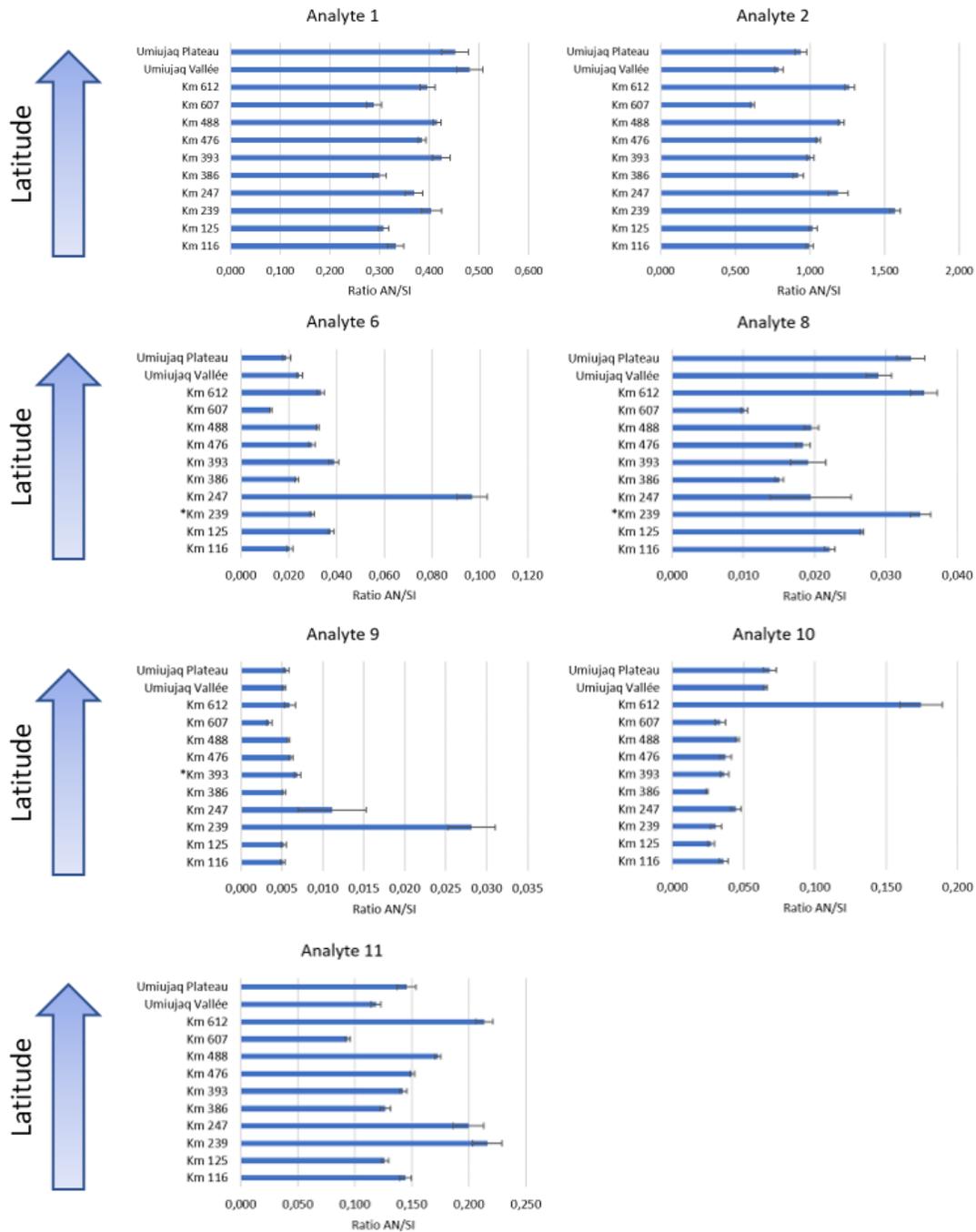
Figure 42. Chromatogrammes représentatifs des échantillons de lichen *S. paschale* (km 476) obtenus par analyse HPLC-PDA (280 nm) aux deux volumes d'injections.



Seuls les analytes ayant échoué lors des tests de validation sont présentés ici.

*Échantillons pour lesquels une donnée aberrante a été retirée selon le résultat au test de Dixon.

Figure 43. Résultats d'analyse semi-quantitative de la concentration des métabolites secondaires non valides observés dans le lichen *Stereocaulon paschale* en fonction de la latitude.



*Échantillons pour lesquels une donnée aberrante a été retirée selon le résultat au test de Dixon.
Seuls les analytes validés sont présentés ici.

Figure 44. Résultats d'analyse semi-quantitative de la concentration des métabolites secondaires observés dans le lichen *Stereocaulon paschale* en fonction de la latitude.

La figure 42 montre des chromatogrammes représentatifs des échantillons du lichen *S. paschale* aux deux volumes d'injection. Les analytes 1 et 2 ont été analysés avec des injections de 5 µl d'extrait reconstitué dans le DMSO, en utilisant l'étalon interne B (acide 2,6-diméthoxybenzoïque) pour le calcul des ratios. Les analytes 3-12 ont plutôt été analysés avec des injections de 40 µl d'extrait reconstitué dans le DMSO, en utilisant l'étalon interne A (acide acétylsalicylique) pour le calcul des ratios.

Les résultats présentés à la figure 43, pour les analytes non valides, montrent que ces analytes ne peuvent être extraits et analysés de manière fiable selon la méthode utilisée. Les résultats d'analyse des échantillons de *S. paschale* prélevés à différentes latitudes sont présentés de la même façon pour les analytes non valides que pour les analytes valides. Dans le cas des premiers, les écarts types sont beaucoup plus grands, tel qu'illustré sur les graphiques et les coefficients de variation étaient supérieurs à 15 % pour les analytes 3, 4, 5 et 12 à tous les points de récolte. Dans le cas de l'analyte 7, seuls deux échantillons ont présenté des coefficients de variation supérieurs à 15 %, après retrait de valeurs aberrantes.

Les tableaux de données sont présentés à l'annexe 7 et fournissent des informations supplémentaires comme les coefficients de variation pour chacun des analytes de chacun des échantillons ainsi que la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation calculés pour l'ensemble des échantillons pour un analyte.

6 Discussion

Développement de méthode

Le développement de la méthode s'est basé sur quelques exemples de méthodes d'extraction et d'analyse retrouvés dans la littérature et sur les méthodes qui étaient déjà utilisées au sein de notre laboratoire.^{217, 218, 220, 221, 234} Contrairement aux méthodes de quantification présentées dans la littérature, qui portaient sur les quelques métabolites secondaires principaux des lichens à l'étude, nous désirions avoir un portrait plus global de la variation du métabolome secondaire des lichens en fonction de la latitude. Il était donc nécessaire de pouvoir analyser un plus grand nombre de métabolites. Ce type d'étude était difficilement compatible avec une analyse quantitative utilisant des étalons pour les analytes étudiés puisque tous les métabolites ne peuvent toujours être identifiés et qu'il est parfois difficile d'obtenir des étalons ou le produit purifié pour préparer des étalons.

Utiliser plutôt un étalon interne afin de normaliser les extractions et l'analyse a donc paru une bonne option. Quelques étalons internes ont déjà été utilisés pour l'analyse de composés lichéniques comme ceux que nous nous attendions à retrouver en majorité dans les échantillons des lichens *S. paschale* et *C. stellaris*. En s'inspirant de ces exemples et des produits disponibles au laboratoire, nous avons sélectionné des étalons

internes qui présentent des groupements fonctionnels et des cycles aromatiques semblables aux métabolites lichéniques (acides carboxyliques, esters, cétones et éthers), mais qui ont des temps de rétention différents permettant une bonne séparation avec les métabolites à l'étude. La vanilline, qui a été évaluée, avait un signal très intense avec le détecteur PDA, mais beaucoup plus faible avec le détecteur ELSD. De plus, son signal semblait peu linéaire en fonction de sa concentration. Cet étalon a donc été abandonné. Les trois autres produits testés fournissaient des résultats intéressants. Leur coût a permis de trancher et de sélectionner l'acide acétylsalicylique et l'acide 2,6-diméthoxybenzoïque. La préparation des solutions mères d'étalons internes a été testée dans quelques solvants différents et à quelques concentrations différentes. Le but était d'avoir des résultats similaires jour après jour avec une même solution mère. Le méthanol a permis d'obtenir des résultats constants. Le volume de solution mère ajouté aux bouteilles pour l'extraction a été sélectionné pour être assez bas et limiter la quantité de méthanol puisque ce solvant s'évapore beaucoup plus difficilement et plus lentement que l'acétone et que l'évaporation se voulait la plus douce possible pour éviter au maximum la dégradation ou la perte de composés et assez rapide pour ne pas trop allonger la méthode d'extraction et le traitement des échantillons.

Parmi les paramètres évalués, le cryobroyage permet d'une part d'éviter, autant que possible, la dégradation qui pourrait se produire lors du broyage, et d'autre part de faciliter le broyage puisque la matière lichénique devient plus friable lorsque durcie par le froid. Le cryobroyage a été fait jusqu'à l'obtention d'une fine poudre d'apparence homogène. Des méthodes de broyage et la grosseur de particule ont été évaluées, pour en arriver à la méthode qui a été utilisée. Le rendement d'extraction ainsi que son écart type ont permis de comparer les tests entre eux. Des considérations pratiques ont aussi été prises en compte pour sélectionner la méthode de broyage.

L'extraction à l'acétone est fréquemment utilisée pour les métabolites lichéniques, dans différentes conditions. La méthode d'extraction développée pour ce projet, décrite plus haut, semble bien fonctionner, selon les rendements d'extraction obtenus, qui se comparent à ce qui a été observé précédemment au laboratoire avec des méthodes d'extraction beaucoup plus longues et utilisant plusieurs solvants avec un gradient de polarité croissante (trois solvants et trois macérations de 24 h pour chacun des trois solvants).²²¹ La méthode utilisée précédemment au laboratoire est prévue pour obtenir des fractions différentes selon le solvant, il s'agit d'une méthode éprouvée et utilisée pour des recherches en phytochimie et en chimie des produits naturels,²²³ mais pour le projet présenté ici, il n'était pas nécessaire, ni désiré, de séparer les composés par des macérations dans différents solvants. Les paramètres qui ont été optimisés sont le temps de macération, le ratio lichen/solvant, les modes de macération, la finesse de la matière lichénique, le volume et le solvant de reconstitution, le mode de filtration et le séchage des échantillons après l'extraction. Ils ont été optimisés dans un premier temps pour permettre le meilleur rendement d'extraction ainsi que la réplicabilité des extractions,

ensuite pour simplifier les manipulations et finalement en fonction des résultats d'analyse par HPLC-PDA-ELSD. Plusieurs durées ont été évaluées pour connaître l'effet du temps de macération sur le rendement. L'extraction des métabolites semble se faire assez rapidement et macérer pendant plus de 30 min n'apportait pas un rendement plus grand. Des extractions multiples, en macérant plusieurs fois chaque réplica, mais en utilisant un nouveau volume de solvant, ont aussi été évaluées et ne permettaient pas d'amélioration considérable du rendement. Cet ajout de manipulation rendait cependant l'extraction plus laborieuse et plus longue. Le volume de solvant, 50 ml, a été choisi en prenant en compte le ratio entre la quantité de matière lichénique et le volume de solvant. Ce ratio a eu un impact important sur le rendement d'extraction, plus le ratio était petit (le plus grand volume de solvant pour la plus petite masse de lichen) plus le rendement était élevé, jusqu'à un ratio qui est supérieur à celui utilisé. De plus, il n'était pas désiré d'utiliser de très grands volumes de solvant puisque le nombre d'échantillons à extraire était grand et que le besoin en solvant deviendrait très élevé à très grand volume. Les bouteilles en verre utilisées (bouteilles en verre, 60 ml, avec bouchons PTFE, Qorpak) ont été choisies en fonction de leur volume, de leur fabrication en verre et de leurs couvercles étanches. Elles ont été préférées, entre autres, aux tubes en polypropylène de 50 ml pour la facilité de leur lavage et de leur réutilisation. De plus, elles n'entraînaient pas de composés, de contaminants, dans les extraits en lien avec leurs matériaux de fabrication. La macération a été évaluée avec sonication, avec agitation horizontale et en laissant les bouteilles sur la paillasse. La sonication n'a pas permis d'améliorer le rendement d'extraction, en comparaison des échantillons laissés sur la paillasse. L'agitation horizontale a quant à elle amélioré le rendement. Le volume et la nature du solvant de reconstitution ont été sélectionnés afin de permettre une bonne solubilité des extraits et un signal intéressant aux deux volumes d'injection.

La méthode d'analyse a été développée selon ce qui est parfois utilisé dans la littérature et en fonction des appareils disponibles au laboratoire. C'est donc un appareil HPLC avec un détecteur UV-visible (PDA) et un détecteur ELSD qui a été utilisé. Au départ, le détecteur ELSD était préféré au détecteur UV-visible puisqu'il est assez universel et donne un signal en fonction de la concentration plutôt que lié aux propriétés optiques des métabolites, ce qui permet d'avoir une réponse en lien avec la concentration qui est à peu près semblable pour tous les composés non-volatils.²⁴⁰ Cependant, sa sensibilité et la plage de linéarité étaient trop faibles pour pouvoir l'utiliser pour analyser plusieurs analytes avec des concentrations différentes et variables en même temps. Le détecteur UV-visible s'est donc avéré plus utile pour la semi-quantification des métabolites secondaires lichéniques dans ce projet. Les métabolites lichéniques observés par détection ELSD au cours des analyses préliminaires absorbent dans le domaine de l'UV et peuvent donc être détectés avec un détecteur PDA. De plus, le signal obtenu avec ce détecteur est plus élevé qu'avec le détecteur ELSD. Les analytes ont donc été sélectionnés sur la base de leur présence sur les chromatogrammes obtenus par détection ELSD (pour s'assurer d'analyser des métabolites présents en concentration considérable) et ont été semi-quantifiés à la suite de l'intégration des pics sur les chromatogrammes obtenus avec le détecteur UV-visible.

Analyser des échantillons naturels, comme des lichens, représente plusieurs défis. Les extraits de plantes ou de lichens sont des mélanges contenant plusieurs métabolites, qui peuvent être de nature variée et présents en proportion très différentes. Ce fut le cas pour les lichens *C. stellaris* et *S. paschale*. Si la nature des métabolites n'a pas encore été déterminée, leurs proportions ont représenté un défi pour le développement de la méthode. La différence de concentration entre les métabolites majoritaires (analytes 1 et 2 présentés pour le lichen *Stereocaulon paschale*) et les métabolites moins concentrés était très grande pour les deux lichens en question dans ce projet. La solution qui a été trouvée a été de procéder à l'analyse des métabolites en deux injections de volumes différents, à partir d'un même extrait reconstitué. La grande différence de concentration entre les deux métabolites principaux et les autres métabolites a impliqué une grande différence dans les volumes d'injection. C'est ainsi qu'il a été déterminé qu'avec une injection à 5 µl et une autre à 40 µl, dans le cas des échantillons de *S. paschale*, il était possible de procéder à des analyses semi-quantitatives de plusieurs analytes.

La méthode permet des extractions et des analyses assez précises pour que l'aire sous les pics des analytes soit utilisable tel quel (selon ce qui a été observé lors de la compilation des résultats, les coefficients de variation sont semblables en aire et en ratio), mais l'utilisation d'étalons internes permet de s'assurer d'une normalisation de la méthode avec les valeurs des étalons internes qui peuvent être comparées, jour après jour, pour s'assurer que les signaux sont constants et permet de corriger d'éventuelles fluctuations liées à des manipulations lors de l'extraction ou de l'analyse et des fluctuations de l'appareil.

Validation de méthode

La validation a été faite pour s'assurer que la méthode d'extraction et d'analyse qui a été développée est constante, fiable et précise. Les tests de validation touchant les méthodes quantitatives, qui visent à connaître la concentration exacte en analytes, n'ont pas été fait ici, car l'objectif était de développer une méthode semi-quantitative. Les critères pour les différents tests de validation ont été établis en s'inspirant des recommandations de l'IUPAC²³⁸, de l'ICH²³⁷ et de la Direction générale de la santé et de la sécurité alimentaire de la Commission européenne (SANCO)²³⁹.

La spécificité a été évaluée en fonction de la présence ou de l'absence de pics interférant aux temps de rétention des analytes et des étalons internes en évaluant le solvant (DMSO) en injection directe, mais aussi le solvant ayant subi toutes les étapes d'extraction, de même qu'une solution de référence contenant les étalons internes, en injection directe, et une solution d'étalons internes ayant subi toutes les étapes d'extraction. Pour les analytes 1 et 2, analysés à la suite d'une injection de 5 µl, les blancs et solutions d'étalons internes considérés ont aussi été analysés avec des injections de 5 µl, alors que pour les autres analytes, le volume d'injection des extraits, des blancs et des solutions d'étalons internes a été de 40 µl. À leurs volumes d'injection respectifs,

aucun pic interférant considérable n'a été remarqué. La méthode permet donc une séparation et une spécificité suffisamment bonnes à ce niveau. Comme il a été brièvement mentionné, la spécificité au sein des échantillons lichéniques n'a pas été évaluée. La présence de nombreux pics sur les chromatogrammes des échantillons de *S. paschale* a été notée, les pics analysés semblent assez bien résolus, mais la présence de pics interférant aux mêmes temps de rétention que les analytes n'a pas été vérifiée. Il n'est donc pas impossible que les aires de certains pics correspondent en réalité à l'addition du signal correspondant à plusieurs métabolites. Ceci pourra possiblement être vérifié subséquemment par HPLC-MS ou à la suite de HPLC préparative permettant d'obtenir chacun des pics séparément et de les caractériser.

La précision de l'instrument a été évaluée et permet de savoir quelle proportion de la variation observée entre des répliques est due à des fluctuations au niveau de l'appareil d'analyse (fluctuations qui ne sont pas dues au processus d'extraction ou à des variations liées aux caractéristiques des métabolites). Les résultats obtenus montrent que l'instrument est adéquatement précis et stable, pour les deux étalons internes (résultats présentés en aire) et les analytes. Seuls les résultats pour 3 des 12 analytes ont montré un coefficient de variation supérieur à 2 % et un seul analyte a eu un coefficient de variation légèrement supérieur à 5 %. Ces trois analytes (3, 5 et 7) ont été rejetés sur la base de leurs résultats pour d'autres tests de validation. Il est possible que la moins bonne précision de l'appareil remarquée pour ces trois analytes soit plutôt due à leur manque de stabilité, tel qu'il sera discuté plus loin.

La précision globale de la méthode a été évaluée à l'aide de deux tests. Un premier test visait l'évaluation de la réplicabilité et le second l'évaluation de la répétabilité dans le temps. La réplicabilité a été évaluée à plusieurs reprises et a été suivie aussi tout au long des analyses. Les analytes 3, 4, 5 et 12 n'ont pas démontré une bonne réplicabilité, leurs coefficients de variation ont dépassé le seuil fixé à 15 % à plusieurs reprises. Pour la répétabilité, ce sont les mêmes analytes qui ont échoué la validation. Il apparaît donc que ces quatre analytes ne peuvent être analysés de manière fiable à l'aide de cette méthode de semi-quantification, leur variabilité est trop grande et peut être liée à plusieurs facteurs. Pour les analytes 3 et 5, il est probable que la variabilité soit liée à leur manque de stabilité, mais pour les analytes 4 et 12, qui ont démontré une bonne stabilité dans le temps, la faible précision qui a été observée doit être due à d'autres facteurs, qui n'ont pas encore été identifiés.

L'évaluation de la stabilité a été faite de manière à démontrer qu'au cours d'une séquence d'analyse, les analytes ne montrent pas de fluctuations importantes de leur signal. La stabilité a donc été validée pour une durée de 20 heures, soit la durée d'une séquence d'injection typique pour ce projet. Les étalons internes et la plupart des analytes ont montré une bonne stabilité sur cette durée. Les analytes 3, 5 et 7 ont dépassé le seuil

de 15 % et ont donc été considérés comme instables. L'analyte 8 a montré une instabilité considérable, mais seul un réplica sur quatre a dépassé le seuil de 15 %, il a donc été considéré comme valide.

À la lumière de ces résultats, les analytes 3, 4, 5, 7 et 12 n'ont pas respecté les critères de validation pour au moins un des tests. Ils ont été considérés à part, non valides, mais les résultats sont présentés tout de même puisque de très grandes fluctuations pourraient être significatives malgré tout. Les autres analytes (1, 2, 6, 8, 9, 10 et 11) ont été validés avec succès.

*Impact de la latitude sur le métabolome du lichen *S. paschale**

Ce projet est encore en cours et seule une première phase d'analyse d'échantillon a été faite, avec douze échantillons de *S. paschale* provenant de différentes latitudes. Ces analyses permettent de mettre la méthode à l'essai avec des échantillons réels et variés. Avec un petit nombre d'échantillons, il est plus difficile de déceler de réelles tendances ou de rattacher des variations à quelque facteur que ce soit. Il est néanmoins intéressant de constater que la méthode permet d'analyser ces différents échantillons et d'obtenir des ratios pour chacun des analytes validés qui peuvent être comparés entre eux.

D'ailleurs, les coefficients de variation sont beaucoup plus élevés entre les échantillons qu'entre les réplicas d'un même échantillon. Pour tous les analytes, la variabilité entre les échantillons montre qu'il est possible d'observer des fluctuations avec la méthode qui a été développée. Il n'est cependant pas vraiment possible, pour le moment, de remarquer des tendances. La différence de latitude, avec les différences au niveau des stress qui sont impliqués, ne peut être liée aux fluctuations.

Pour certains analytes (6, 9 et 10), la concentration est beaucoup plus élevée pour un des sites de récolte que pour tous les autres. Il s'agit aussi d'une observation qui laisse présager que pour de futurs projets de recherche en continuité avec celui-ci, il pourrait être envisageable, en contrôlant ou en connaissant les facteurs de stress, les paramètres environnementaux, etc. de rattacher des fluctuations à certains paramètres. D'ailleurs, le site d'échantillonnage divergeant n'est pas le même pour les trois analytes, il ne s'agit donc pas de la même source de fluctuation. Pour les autres analytes validés, 1, 2, 8 et 11, on remarque des fluctuations entre les échantillons, mais aucune tendance claire.

L'analyte 7, qui a échoué le test de stabilité durant la validation, a été analysé tout comme les autres analytes non valides. Les résultats obtenus avec cet analyte sont intéressants, même s'il a montré qu'il n'était pas tout à fait stable. Les trois échantillons les plus au nord présentent une concentration beaucoup plus grande de cet analyte. Il s'agit d'une tendance qui pourrait être gardée en tête pour les futures analyses et qui pourrait mériter une investigation plus en détail.

Portée de la méthode

Cette méthode d'extraction et d'analyse semi-quantitative permet de faire des comparaisons entre des échantillons différents et ce pour plusieurs métabolites à la fois. D'après les résultats observés lors du développement de la méthode, elle est applicable aux deux lichens testés (*C. stellaris* et *S. paschale*). Les travaux devront se poursuivre dans le cas de *C. stellaris* afin de confirmer cette applicabilité par une validation et une mise à l'essai de la méthode. Seuls quelques paramètres ont été optimisés pour l'utiliser avec un lichen différent : le volume de reconstitution et les volumes d'injection. Pour le moment, la méthode n'a pas été utilisée avec d'autres lichens ou avec des plantes, nous ne savons donc pas encore si elle est applicable à d'autres organismes. Il est probable qu'en appliquant cette méthode à d'autres lichens ou à des plantes, il soit nécessaire d'optimiser d'autres paramètres également (temps de macération, gradient, phases mobiles, etc.), mais elle pourrait fournir les bases pour le développement d'autres méthodes semblables.

Pour pouvoir déceler les impacts de certains facteurs en particulier, il serait nécessaire de contrôler ces facteurs, ou de bien les connaître et d'effectuer des analyses statistiques multivariées. Pour repérer des fluctuations qui pourraient être liées au portrait global des sites, comme c'était un des objectifs ici, il pourrait être possible de remarquer des tendances, si tendance il y a. En effet, la méthode a permis de bien observer les fluctuations entre les échantillons. Cependant, il serait préférable d'analyser un nombre plus grand d'échantillons pour se faire.

Ce genre de méthode pourrait aussi être utilisé en chimiotaxonomie pour apporter de nouvelles informations permettant de différencier des taxons morphologiquement semblables, mais chimiquement différents. Il a déjà été proposé que les métabolites secondaires lichéniques peuvent servir à différencier les espèces.²⁴¹ Elle pourrait aussi permettre de repérer rapidement des chimiotypes différents au sein d'une même population ou au sein de populations différentes.

7 Conclusion

Pour conclure ce chapitre portant sur le développement d'une méthode permettant d'investiguer les impacts de la nordicité sur le métabolome de lichens, il est important de préciser à nouveau qu'il s'agit d'un projet de recherche encore en cours. Malgré tout, une méthode a été développée et validée. Elle a permis l'analyse d'échantillons du lichen *S. paschale* récoltés à différents endroits selon un gradient de latitudes couvrant près de 700 km au sein de la forêt boréale québécoise, entre Matagami et Umiujaq. La méthode a permis l'analyse de neuf métabolites validés et la comparaison de ces métabolites en fonction de la position de

récolte. Elle n'a cependant pas permis de déceler des indices de l'impact de la nordicité sur ces échantillons, bien que des fluctuations aient été observées pour plusieurs analytes.

Plusieurs travaux sont encore en cours ou sont prévus. La validation de la méthode pour le lichen *Cladonia stellaris* et l'analyse des échantillons du lichen *Cladonia stellaris* récoltés sur un gradient de latitude est prévue. L'analyse d'échantillons prélevés au Nunavik pour les deux lichens en question ici, lors d'autres séjours de terrain dans les dernières années est aussi dans les plans, afin d'augmenter le nombre d'échantillons comparés, ce qui permettra de mieux évaluer les possibilités qui sont offertes avec cette méthode et ses limitations et de pouvoir continuer d'étudier les variations du métabolome de ces lichens. L'identification des métabolites analysés dans les lichens étudiés est prévue également, ces travaux sont d'ailleurs en cours en ce qui concerne les métabolites observés dans les extraits de *Stereocaulon paschale*. De plus, des analyses statistiques des résultats sont prévues, afin de démontrer statistiquement que des fluctuations sont observées ou pas. L'application de la méthode développée ici à d'autres organismes est aussi dans les plans.

Par l'accumulation de données, au fil du temps, et en utilisant de bons outils d'analyses statistiques, il pourrait devenir possible d'observer des tendances et de les lier à certains paramètres ou à des contextes globaux.

Conclusion

Les travaux présentés dans ce mémoire sont le résultat d'une maîtrise bien remplie, riche en expériences et en apprentissages. Le projet de recherche sur les huiles essentielles de végétaux de la nordicité était le premier projet de recherche de ce genre au sein du laboratoire. Il m'a permis d'avoir l'opportunité d'effectuer un stage d'apprentissage et de recherche en chimie des huiles essentielles au sein du laboratoire du professeur Xavier Fernandez, à l'Université Côte d'Azur. Avec l'expérience et les connaissances ainsi acquises, il a ensuite été possible de mettre sur pied un projet d'investigation phytochimique de plantes issues de la nordicité, ce qui m'a permis de vivre toutes les étapes d'un tel projet, de la planification à l'analyse, en passant, entre autres, par la récolte des échantillons et la préparation des extraits. Il s'agit d'une expérience riche, qui permet de bien comprendre tout ce qui est impliqué dans ce genre de travaux. Pour avoir un défi supplémentaire, me permettant de remplir certains temps morts au cours de mes travaux sur les huiles essentielles et les extraits volatils, j'ai travaillé sur plusieurs autres projets, dont celui d'investigation de l'impact de la nordicité sur les lichens, un projet qui était dans les plans du laboratoire depuis plusieurs années. Ce fut une occasion d'utiliser une partie des connaissances acquises lors de mes expériences de stage en industrie et d'emmagasiner un bagage supplémentaire, ce projet étant bien différent de celui portant sur les huiles essentielles et de celui sur les extraits volatils.

Ces travaux ont aussi permis, en plus de tout ce que ça m'a apporté, de poser des bases en chimie des huiles essentielles au sein du laboratoire et de développer une méthode d'analyse qui permet la comparaison de multiples échantillons lichéniques (et possiblement d'autres organismes). Ces projets pourront donc permettre de pousser plus loin les travaux au laboratoire. Plusieurs projets de recherche pourront découler de ces travaux. Il faut voir les travaux sur les huiles essentielles et extraits volatils comme de premiers travaux d'investigation sur ces types d'extraits au laboratoire. Il s'agissait de développer la méthodologie, d'acquérir de l'expérience, de bien s'équiper. Les travaux ont porté sur plusieurs plantes pour ouvrir des possibilités, mais pour la suite, les travaux pourraient poursuivre des objectifs plus précis, sur moins de plantes simultanément, mais pousser plus loin les travaux sur la ou les plantes investiguées. Plusieurs idées sont sur la table pour la suite des choses. Des travaux portant aussi sur des organismes provenant de la toundra arctique, plutôt que la toundra forestière, seraient particulièrement intéressants. Ils sont plus difficiles à mettre en place, mais très peu d'études ont porté sur la chimie d'organismes de la toundra arctique.⁴

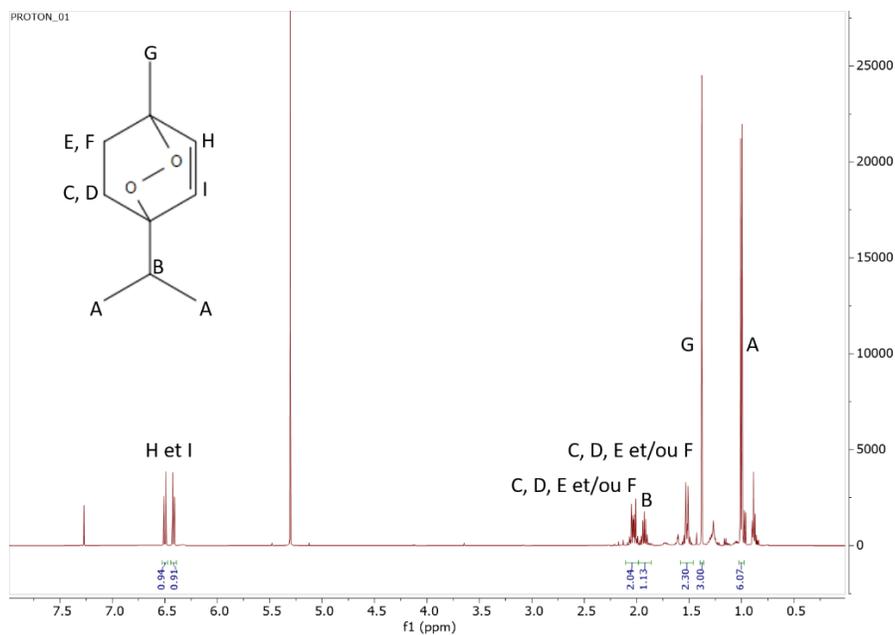
Les grands objectifs de mes travaux visaient à améliorer les connaissances sur la chimie des organismes de la nordicité. Il a été possible, à travers les différents projets présentés ici, d'apporter quelques blocs supplémentaires à l'édifice des connaissances scientifiques de ce domaine. Ils ouvrent aussi la porte à d'autres contributions pour le futur. Il était aussi visé d'étudier les impacts de la nordicité et des stress impliqués

sur le métabolome de végétaux et de lichens. Si les travaux présentés ici n'ont pas permis d'observer d'impacts clairs des stress liés à la nordicité, la méthode d'analyse présentée au chapitre 4 pourrait offrir des opportunités à cet égard. La mise en valeur des ressources et de la richesse du Nord du Québec, du Nunavik, était un aspect important de ces projets de recherche. Les travaux ont montré qu'il est possible de faire de la phytochimie au Nunavik, que des organismes intéressants s'y trouvent et que certains d'entre eux présentent des activités biologiques potentiellement applicables en industrie, laissant peut-être éventuellement place à des opportunités pour les habitants de cette vaste région.

Parmi les points qui seront à améliorer et à développer davantage figure la collaboration avec les communautés autochtones. Il s'agit d'un sujet qui m'a intéressé durant mes études, mais qui n'est pas forcément facile à mettre en pratique. Il est cependant reconnu que les recherches en sciences qui touchent des sujets liés aux communautés autochtones, ou qui impliquent d'utiliser leurs connaissances, leur territoire, etc. devraient prévoir l'inclusion des membres de ces communautés au sein du processus et devraient prévoir davantage de rétroaction et de collaboration. Il s'agit d'un aspect souligné par les membres des communautés autochtones. Au Canada, il s'agit d'un sujet important, qui a fait l'objet de rapports, de commissions, de reportages, etc. Récemment, un groupe composé de scientifiques et de membres des communautés autochtones ont publié un article présentant 10 recommandations pour les scientifiques afin d'améliorer la pratique des sciences de la nature dans des contextes qui touchent ces communautés.²⁴² Ils s'inspiraient entre autres des 94 appels à l'action publiés par la Commission de vérité et réconciliation du Canada en 2015. Ces recommandations devraient être gardées en tête pour tous les futurs projets du laboratoire qui impliqueront de près ou de loin des aspects touchant les communautés autochtones et leur territoire. Il y a un effort à fournir à ce niveau, mais il en vaut le coût, à la fois pour les scientifiques et pour les autochtones.

Annexes

Annexe 1. Spectre RMN ^1H de la fraction 41 de l'huile essentielle de *Rhododendron subarcticum* contenant le métabolite majoritaire, identifié comme étant l'ascaridole.



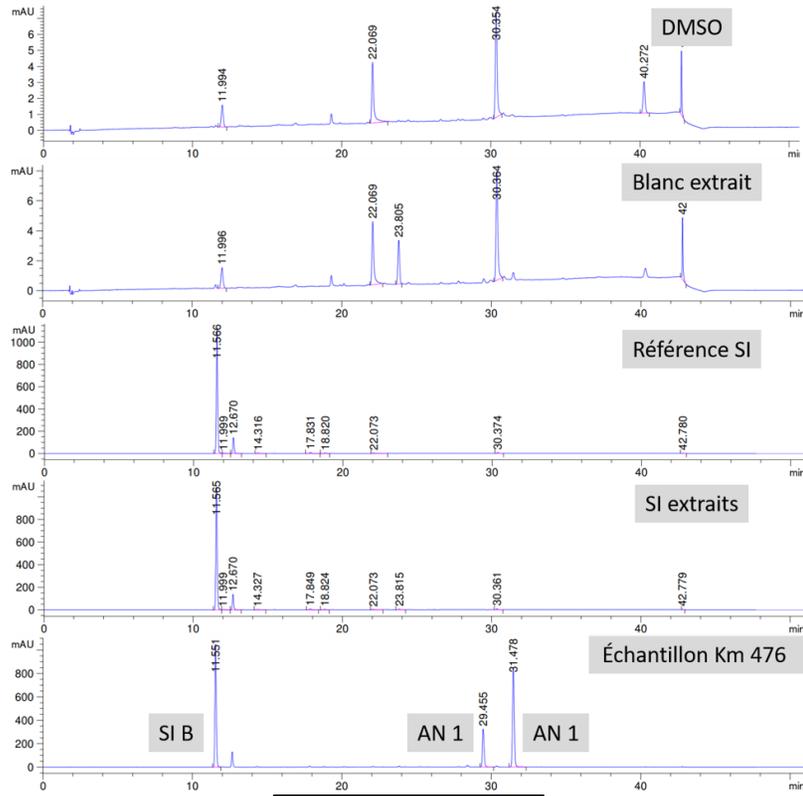
Ascaridole : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ 1.00 (d, $J=6,92$ Hz, 6H, H_A), 1.38 (s, 3H, H_G), 1.47-1.57 (m, 2H, H_C , D , E ou F), 1.93 (sept., $J=6,92$ Hz, 1H, H_B), 1.99-2.07 (m, 2H, H_C , D , E ou F), 6.42 (d, $J=8,49$ Hz, H_H , I), 6.5 (d, $J=8,53$ Hz, H_H , I).

Annexe 2. Résultats de la validation de la précision de l'instrument pour la méthode d'analyse semi-quantitative d'échantillons de lichen *S. paschale*.

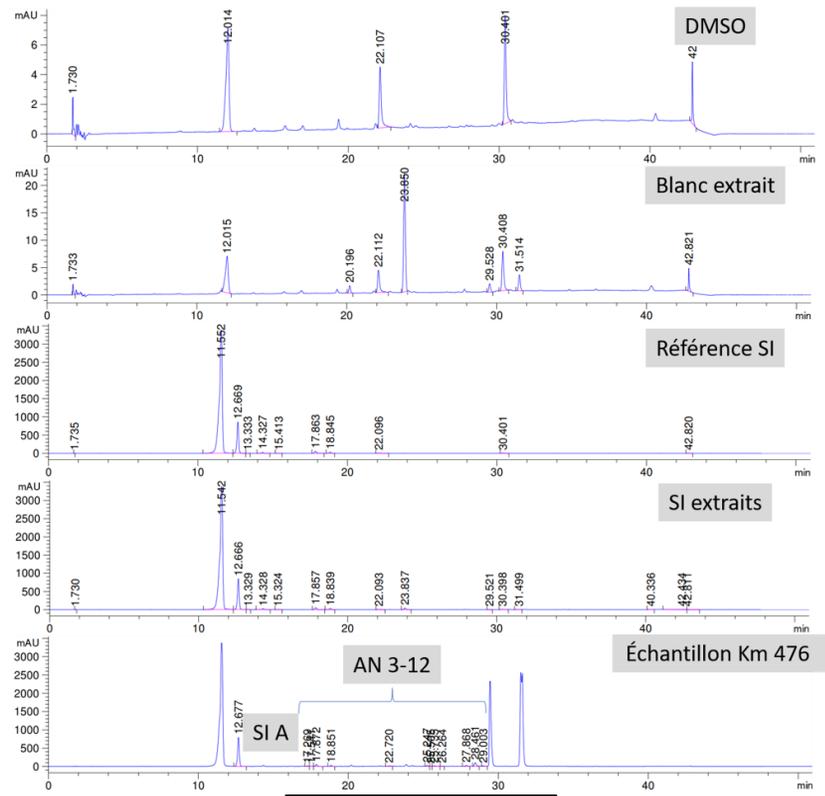
Résultats de la précision de l'instrument HPLC-PDA lors de l'analyse d'un échantillon de <i>Stereocaulon paschale</i>							
Échantillon	Aire		Ratio				
	SI A	SI B	AN 1	AN 2	*AN 3	AN 4	*AN 5
SP-16JUL2020-A-001	6332,73975	6478,75146	0,4439	1,1102	0,0137	0,0043	0,0189
SP-16JUL2020-A-002	6331,3530	6472,25195	0,4436	1,1091	0,0143	0,0044	0,0202
SP-16JUL2020-A-003	6330,7100	6471,29053	0,4434	1,1087	0,0148	0,0044	0,0212
Moyenne	6331,6009	6474,0980	0,4436	1,1093	0,01425	0,00433	0,02009
Écart-type	1,0374	4,0586	0,0003	0,0008	0,00053	0,00006	0,00115
% CV	0,02	0,06	0,06	0,07	3,71	1,28	5,75
Échantillon	Ratio						
	AN 6	*AN 7	AN 8	AN 9	AN 10	AN 11	AN 12
SP-16JUL2020-A-001	0,0297	0,0060	0,0253	0,0069	0,0627	0,1616	0,0177
SP-16JUL2020-A-002	0,0296	0,0062	0,0254	0,0069	0,0621	0,1615	0,0177
SP-16JUL2020-A-003	0,0296	0,0064	0,0257	0,0069	0,0616	0,1576	0,0178
Moyenne	0,02963	0,00620	0,02546	0,00688	0,06214	0,16024	0,01774
Écart-type	0,00004	0,00019	0,00021	0,00004	0,00051	0,00226	0,00002
% CV	0,14	3,01	0,84	0,53	0,83	1,41	0,14

* : Les coefficients de variation > 2 %.

Annexe 3. Illustration de la spécificité pour la méthode d'analyse semi-quantitative d'échantillons de lichen *S. paschale*.



Détecteur: PDA (280 nm)
Volume d'injection: 5 µl



Détecteur: PDA (280 nm)
Volume d'injection: 40 µl

Annexe 4. Résultats de la validation de la réplicabilité pour la méthode d'analyse semi-quantitative d'échantillons de lichen *S. paschale*.

Résultats de la réplicabilité (jour 1) lors de l'analyse d'un échantillon de <i>Stereocaulon paschale</i>							
Échantillon	Aire		Ratio				
	SI A	SI B	AN 1	AN 2	*AN 3	*AN 4	*AN 5
SP-16JUL2020-A	6332,74	6478,75	0,4439	1,1102	0,0137	0,0043	0,0189
SP-16JUL2020-B	6328,21	6452,78	0,4337	1,1077	0,0170	0,0042	0,0266
SP-16JUL2020-C	6214,39	6549,29	0,4435	1,1199	0,0210	0,0042	0,0321
SP-16JUL2020-D	6257,24	6441,85	0,3831	1,0311	0,0170	0,0037	0,0263
SP-16JUL2020-E	6603,72	6139,25	0,4696	1,2084	0,0229	0,0046	0,0382
SP-16JUL2020-F	6362,82	6653,38	0,4172	1,0625	0,0197	0,0056	0,0347
SP-16JUL2020-G	6198,78	6478,66	0,4343	1,1090	0,0077	0,0032	0,0115
SP-16JUL2020-H	6381,03	6643,40	0,4150	1,0346	0,0132	0,0038	0,0185
Moyenne	6334,86	6479,67	0,4300	1,0979	0,0165	0,0042	0,0258
Écart-type	127,78	160,30	0,0255	0,0571	0,0049	0,0007	0,0091
% CV	2,02	2,47	5,94	5,20	29,75	17,33	35,23
Échantillon	Ratio						
	AN 6	AN 7	AN 8	AN 9	AN 10	AN 11	*AN 12
SP-16JUL2020-A	0,0297	0,0060	0,0253	0,0069	0,0627	0,1616	0,0177
SP-16JUL2020-B	0,0280	0,0064	0,0237	0,0068	0,0603	0,1580	0,0185
SP-16JUL2020-C	0,0295	0,0077	0,0262	0,0072	0,0622	0,1658	0,0216
SP-16JUL2020-D	0,0260	0,0076	0,0243	0,0071	0,0519	0,1470	0,0159
SP-16JUL2020-E	0,0278	0,0075	0,0234	0,0068	0,0639	0,1684	0,0118
SP-16JUL2020-F	0,0280	0,0083	0,0263	0,0070	0,0553	0,1564	0,0134
SP-16JUL2020-G	0,0294	0,0080	0,0261	0,0070	0,0608	0,1636	0,0150
SP-16JUL2020-H	0,0286	0,0091	0,0271	0,0073	0,0532	0,1533	0,0085
Moyenne	0,0284	0,0076	0,0253	0,0070	0,0588	0,1593	0,0153
Écart-type	0,0012	0,0010	0,0014	0,0002	0,0046	0,0070	0,0041
% CV	4,27	12,93	5,36	2,69	7,88	4,41	26,82

* : Les coefficients de variation > 15 %.

Résultats de la réplicabilité (jour 2) lors de l'analyse d'un échantillon de <i>Stereocaulon paschale</i>							
Échantillon	Aire		Ratio				
	SI A	SI B	AN 1	AN 2	*AN 3	*AN 4	*AN 5
SP-17JUL2020-A	6401,67	6478,43	0,4508	1,0972	0,0238	0,0052	0,0430
SP-17JUL2020-B	6321,89	6531,79	0,4625	1,1042	0,0248	0,0055	0,0444
SP-17JUL2020-C	6166,49	6404,98	0,4440	1,1037	0,0227	0,0057	0,0385
SP-17JUL2020-D	6112,53	6350,04	0,4579	1,0976	0,0227	0,0045	0,0388
SP-17JUL2020-E	6788,17	6743,13	0,4509	1,0728	0,0085	0,0038	0,0128
SP-17JUL2020-F	6632,68	6494,58	0,4508	1,0625	0,0086	0,0033	0,0121
SP-17JUL2020-G	6546,00	6647,00	0,4455	1,0697	0,0082	0,0036	0,0143
SP-17JUL2020-H	6466,67	6486,39	0,4500	1,1040	0,0156	0,0045	0,0261
Moyenne	6429,51	6517,04	0,4515	1,0890	0,0169	0,0045	0,0287
Écart-type	228,93	126,27	0,0061	0,0175	0,0075	0,0009	0,0141
% CV	3,56	1,94	1,34	1,61	44,59	19,76	49,03
Échantillon	Ratio						
	AN 6	AN 7	AN 8	AN 9	AN 10	AN 11	*AN 12
SP-17JUL2020-A	0,0283	0,0062	0,0192	0,0068	0,0699	0,1633	0,0066
SP-17JUL2020-B	0,0276	0,0056	0,0195	0,0074	0,0715	0,1642	0,0045
SP-17JUL2020-C	0,0273	0,0064	0,0209	0,0071	0,0680	0,1757	0,0048
SP-17JUL2020-D	0,0284	0,0067	0,0215	0,0073	0,0692	0,1755	0,0045
SP-17JUL2020-E	0,0287	0,0078	0,0216	0,0067	0,0650	0,1551	0,0028
SP-17JUL2020-F	0,0291	0,0075	0,0210	0,0068	0,0655	0,1525	0,0020
SP-17JUL2020-G	0,0289	0,0065	0,0190	0,0068	0,0699	0,1564	0,0016
SP-17JUL2020-H	0,0284	0,0061	0,0181	0,0069	0,0728	0,1587	0,0009
Moyenne	0,0283	0,0066	0,0201	0,0070	0,0690	0,1627	0,0035
Écart-type	0,0006	0,0007	0,0013	0,0003	0,0027	0,0089	0,0020
% CV	2,21	11,26	6,55	3,81	3,91	5,46	56,16

* : Les coefficients de variation > 15 %.

Résultats de la réplicabilité (jour 3) lors de l'analyse d'un échantillon de <i>Stereocaulon paschale</i>							
Échantillon	Aire		Ratio				
	SI A	SI B	AN 1	AN 2	*AN 3	AN 4	*AN 5
SP-20AOU2020-A	6368,66	6553,65	0,4980	1,1908	0,0172	0,0055	0,0287
SP-20AOU2020-B	6423,59	6733,53	0,4957	1,1771	0,0218	0,0065	0,0401
SP-20AOU2020-C	6371,78	6712,16	0,4766	1,1524	0,0272	0,0063	0,0499
SP-20AOU2020-D	6278,40	6529,61	0,4945	1,1919	0,0311	0,0072	0,0574
SP-20AOU2020-E	6699,26	6868,82	0,4648	1,1122	0,0246	0,0061	0,0443
SP-20AOU2020-F	6573,80	6811,04	0,4898	1,1412	0,0261	0,0067	0,0473
SP-20AOU2020-G		6789,90	0,4842	1,1417			
SP-20AOU2020-H	6516,38	6804,61	0,5016	1,1774	0,0172	0,0059	0,0277
Moyenne	6461,70	6725,41	0,4882	1,1606	0,0236	0,0063	0,0422
Écart-type	143,63	123,29	0,0124	0,0283	0,0052	0,0006	0,0109
% CV	2,22	1,83	2,54	2,44	21,95	9,18	25,94
Échantillon	Ratio						
	AN 6	AN 7	AN 8	AN 9	AN 10	AN 11	AN 12
SP-20AOU2020-A	0,0314	0,0059	0,0213	0,0063	0,0783	0,1792	0,0130
SP-20AOU2020-B	0,0307	0,0057	0,0212	0,0063	0,0805	0,1811	0,0130
SP-20AOU2020-C	0,0297	0,0059	0,0217	0,0062	0,0752	0,1779	0,0112
SP-20AOU2020-D	0,0297	0,0061	0,0215	0,0062	0,0776	0,1816	0,0124
SP-20AOU2020-E	0,0284	0,0061	0,0207	0,0059	0,0702	0,1669	0,0112
SP-20AOU2020-F	0,0301	0,0064	0,0214	0,0061	0,0755	0,1739	0,0081
SP-20AOU2020-G							
SP-20AOU2020-H	0,0317	0,0079	0,0237	0,0064	0,0759	0,1807	0,0110
Moyenne	0,0302	0,0063	0,0216	0,0062	0,0762	0,1773	0,0114
Écart-type	0,0011	0,0007	0,0009	0,0002	0,0032	0,0053	0,0017
% CV	3,70	11,76	4,33	2,83	4,22	2,98	14,93

* : Les coefficients de variation > 15 %.

Annexe 5. Résultats de la validation de la répétabilité pour la méthode d'analyse semi-quantitative d'échantillons de lichen *S. paschale*.

Résultats de la répétabilité (2 journées différentes) lors de l'analyse d'un échantillon de <i>Stereocaulon paschale</i>							
Échantillon	Aire		Ratio				
	SI A	SI B	AN 1	AN 2	*AN 3	*AN 4	*AN 5
Moyenne	6382,19	6498,36	0,4408	1,0934	0,0167	0,0044	0,03
Écart-type	185,65	140,73	0,0211	0,0410	0,0061	0,0008	0,01
% CV	2,91	2,17	4,78	3,75	36,78	18,41	42,35
Échantillon	Ratio						
	AN 6	AN 7	AN 8	AN 9	AN 10	AN 11	*AN 12
Moyenne	0,0284	0,0071	0,0227	0,0070	0,0639	0,1610	0,0094
Écart-type	0,0009	0,0010	0,0030	0,0002	0,0064	0,0079	0,0068
% CV	3,29	13,86	13,17	3,20	10,04	4,93	72,93

Résultats de répétabilité obtenu par la compilation de deux journées d'analyses (8 réplicas par journée) les 16 et 17 juillet 2020 (résultats présentés ci-haut).

* : Coefficients de variation > 15 %.

Résultats de la répétabilité (3 journées différentes) lors de l'analyse d'un échantillon de <i>Stereocaulon paschale</i>							
Échantillon	Aire		Ratio				
	SI A	SI B	AN 1	AN 2	*AN 3	*AN 4	*AN 5
Moyenne	6406,39	6574,04	0,4566	1,1158	0,0188	0,0049	0,0318
Écart-type	174,72	171,75	0,0293	0,0489	0,0066	0,0012	0,0131
% CV	2,73	2,61	6,41	4,38	35,09	23,65	34,27
Échantillon	Ratio						
	AN 6	AN 7	AN 8	AN 9	AN 10	AN 11	*AN 12
Moyenne	0,0289	0,0068	0,0224	0,0068	0,0676	0,1660	0,0100
Écart-type	0,0013	0,0010	0,0026	0,0004	0,0080	0,0105	0,0058
% CV	4,54	14,21	11,46	6,16	11,86	6,32	57,99

Résultats de répétabilité obtenu par la compilation de trois journées d'analyses (8 réplicas par journée) les 16 et 17 juillet 2020 ainsi que le 20 août 2020 (résultats présentés ci-haut).

* : Coefficients de variation > 15 %.

Annexe 6. Résultats de la validation de la stabilité des analytes pour la méthode d'analyse semi-quantitative d'échantillons de lichen *S. paschale*.

Résultats de stabilité après l'extraction (20 heures) pour l'analyse HPLC-PDA-ELSD des échantillons de <i>Stereocaulon paschale</i>							
Échantillon	Aire		Ratio				
	SI A	SI B	AN 1	AN 2	*AN 3	AN 4	*AN 5
% changement après 20 heures	-0,33	0,00	-1,48	-1,71	53,70	1,23	62,80
	-0,32	-0,09	-1,83	-1,75	51,13	0,57	52,49
	-0,38	-0,13	-1,91	-1,97	50,12	1,31	52,00
	-0,46	-0,01	-1,65	-2,43	49,03	3,71	46,08
Moyenne	-0,37	-0,06	-1,72	-1,97	51,00	1,71	53,34
Écart-type	0,06	0,06	0,19	0,33	2,00	1,38	6,95
Échantillon	Ratio						
	AN 6	*AN 7	AN 8	AN 9	AN 10	AN 11	AN 12
% changement après 20 heures	-8,89	5,24	2,72	3,77	-13,18	-3,47	0,55
	-2,54	35,67	14,39	4,61	-12,86	0,34	10,66
	-2,83	28,88	13,01	2,57	-13,01	-1,60	0,37
	-2,20	28,71	15,53	3,44	-13,69	3,67	14,52
Moyenne	-4,12	24,63	11,41	3,60	-13,19	-0,26	6,52
Écart-type	3,20	13,33	5,89	0,84	0,36	3,05	7,18

* : Les analytes ayant présenté un % de changement > ± 15 % en moyenne.

Annexe 7. Tableaux de compilation de résultats d'analyse des échantillons du lichen *Stereocaulon paschale* récoltés à différentes latitudes.

* Indique les échantillons pour lesquels une donnée aberrante a été éliminée.

** Les proportions relatives sont calculées en utilisant la valeur la plus élevée comme 100 %.

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 1 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Position	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,3324	0,0162	4,87	69,06
Km 125	0,3076	0,0108	3,50	63,91
Km 239	0,4043	0,0207	5,13	84,00
Km 247	0,3691	0,0182	4,92	76,69
Km 386	0,2999	0,0136	4,55	62,31
Km 393	0,4241	0,0180	4,24	88,12
Km 476	0,3856	0,0077	2,00	80,11
Km 488	0,4151	0,0080	1,92	86,24
Km 607	0,2886	0,0145	5,03	59,97
Km 612	0,3963	0,0148	3,73	82,34
Umiujaq Vallée	0,4813	0,0264	5,48	100,00
Umiujaq Plateau	0,4518	0,0267	5,90	93,87
Moyenne	0,3797			
Écart type	0,0617			
% CV	16,25			

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 2 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Km	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,9975	0,0248	2,48	63,50
Km 125	1,0202	0,0283	2,78	64,94
Km 239	1,5709	0,0360	2,29	100,00
Km 247	1,1905	0,0654	5,50	75,78
Km 386	0,9204	0,0358	3,88	58,59
Km 393	1,0031	0,0232	2,32	63,86
Km 476	1,0556	0,0147	1,40	67,19
Km 488	1,2082	0,0191	1,58	76,91
Km 607	0,6154	0,0126	2,05	39,17
Km 612	1,2657	0,0323	2,55	80,57
Umiujaq Vallée	0,7919	0,0269	3,39	50,41
Umiujaq Plateau	0,9390	0,0393	4,19	59,77
Moyenne	1,0482			
Écart type	0,2437			
% CV	23,25			

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 3 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Km	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,0154	0,0032	20,83	33,28
Km 125	0,0165	0,0040	24,07	35,64
Km 239	0,0098	0,0027	27,91	21,19
Km 247	0,0132	0,0023	17,50	28,45
Km 386	0,0150	0,0035	23,48	32,42
Km 393	0,0207	0,0062	29,82	44,67
Km 476	0,0176	0,0039	22,38	37,93
Km 488	0,0119	0,0041	34,57	25,66
Km 607	0,0131	0,0028	21,07	28,38
Km 612	0,0096	0,0024	24,86	20,63
Umiujaq Vallée	0,0463	0,0080	17,33	100,00
Umiujaq Plateau	0,0261	0,0075	28,59	56,31
Moyenne	0,0179			
Écart type	0,0101			
% CV	56,15			

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 4 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Km	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,0003	0,0006	200,00	0,12
Km 125	0,2615	0,0107	4,09	100,00
Km 239	0,0177	0,0018	9,94	6,76
Km 247	-	-	-	-
Km 386	0,0684	0,0036	5,24	26,15
Km 393	0,0345	0,0016	4,51	13,21
Km 476	0,0047	0,0004	8,43	1,80
Km 488	0,0098	0,0013	13,03	3,76
Km 607	-	-	-	-
Km 612	-	-	-	-
Umiujaq Vallée	-	-	-	-
Umiujaq Plateau	-	-	-	-
Moyenne	0,0331			
Écart type	0,0748			
% CV	226,14			

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 5 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Km	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,0372	0,0105	28,12	53,34
Km 125	0,0280	0,0082	29,14	40,11
Km 239	0,0240	0,0055	22,97	34,41
Km 247	0,0248	0,0093	37,44	35,58
Km 386	0,0263	0,0077	29,31	37,66
Km 393	0,0334	0,0115	34,40	47,92
Km 476	0,0320	0,0080	24,96	45,94
Km 488	0,0198	0,0090	45,44	28,39
Km 607	0,0228	0,0037	16,19	32,75
Km 612	0,0164	0,0053	32,25	23,55
Umiujaq Vallée	0,0698	0,0141	20,21	100,00
Umiujaq Plateau	0,0428	0,0142	33,15	61,39
Moyenne	0,0315			
Écart type	0,0142			
% CV	45,05			

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 6 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Km	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,0205	0,0011	5,42	21,16
Km 125	0,0377	0,0013	3,35	38,89
*Km 239	0,0298	0,0010	3,29	30,80
Km 247	0,0969	0,0063	6,55	100,00
Km 386	0,0233	0,0008	3,59	24,09
Km 393	0,0389	0,0020	5,05	40,17
Km 476	0,0298	0,0013	4,51	30,73
Km 488	0,0322	0,0005	1,64	33,23
Km 607	0,0125	0,0004	3,10	12,91
Km 612	0,0335	0,0015	4,35	34,53
Umiujaq Vallée	0,0246	0,0012	5,04	25,34
Umiujaq Plateau	0,0190	0,0017	9,14	19,66
Moyenne	0,0332			
Écart type	0,0215			
% CV	64,77			

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 7 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Km	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,0030	0,0003	9,19	26,54
Km 125	0,0018	0,0006	32,10	16,28
*Km 239	0,0016	0,0002	12,14	14,25
*Km 247	0,0024	0,0001	2,36	20,97
Km 386	0,0028	0,0002	7,82	24,59
Km 393	0,0043	0,0005	10,67	38,21
Km 476	0,0030	0,0008	26,65	26,29
Km 488	0,0041	0,0003	7,29	36,06
Km 607	0,0044	0,0002	4,58	38,94
Km 612	0,0106	0,0005	4,84	93,22
Umiujaq Vallée	0,0106	0,0009	8,19	93,28
Umiujaq Plateau	0,0113	0,0009	8,15	100,00
Moyenne	0,0050			
Écart type	0,0036			
% CV	72,72			

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 8 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Km	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,0221	0,0007	3,25	62,57
Km 125	0,0266	0,0002	0,79	75,45
*Km 239	0,0348	0,0014	4,08	98,60
Km 247	0,0195	0,0057	29,05	55,14
Km 386	0,0151	0,0006	3,94	42,65
Km 393	0,0191	0,0024	12,79	54,04
Km 476	0,0184	0,0010	5,30	52,00
Km 488	0,0196	0,0010	4,91	55,38
Km 607	0,0101	0,0004	4,34	28,69
Km 612	0,0353	0,0018	5,22	100,00
Umiujaq Vallée	0,0290	0,0018	6,14	82,14
Umiujaq Plateau	0,0335	0,0020	5,92	94,88
Moyenne	0,0236			
Écart type	0,0082			
% CV	34,71			

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 9 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Km	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,0051	0,0003	5,12	18,13
Km 125	0,0052	0,0003	6,38	18,57
Km 239	0,0281	0,0029	10,22	100,00
Km 247	0,0111	0,0042	37,52	39,58
Km 386	0,0052	0,0002	3,90	18,58
*Km 393	0,0069	0,0004	6,13	24,53
Km 476	0,0061	0,0002	3,46	21,64
Km 488	0,0058	0,0001	1,97	20,68
Km 607	0,0034	0,0003	8,78	12,25
Km 612	0,0060	0,0007	11,32	21,21
Umiujaq Vallée	0,0053	0,0002	3,96	18,79
Umiujaq Plateau	0,0055	0,0003	5,65	19,72
moyenne	0,0078			
écart type	0,0067			
% CV	85,01			

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 10 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Km	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,0359	0,0031	8,61	20,61
Km 125	0,0273	0,0022	8,07	15,64
Km 239	0,0306	0,0040	13,11	17,56
Km 247	0,0447	0,0036	8,15	25,60
Km 386	0,0243	0,0008	3,27	13,91
Km 393	0,0364	0,0030	8,20	20,89
Km 476	0,0372	0,0042	11,38	21,33
Km 488	0,0457	0,0012	2,67	26,17
Km 607	0,0334	0,0036	10,90	19,15
Km 612	0,1744	0,0148	8,47	100,00
Umiujaq Vallée	0,0654	0,0012	1,91	37,48
Umiujaq Plateau	0,0685	0,0046	6,75	39,25
Moyenne	0,0520			
Écart type	0,0409			
% CV	78,75			

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 11 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Km	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,1446	0,0051	3,55	66,90
Km 125	0,1264	0,0030	2,41	58,49
Km 239	0,2162	0,0130	6,02	100,00
Km 247	0,1996	0,0135	6,75	92,32
Km 386	0,1269	0,0044	3,49	58,68
Km 393	0,1424	0,0031	2,17	65,85
Km 476	0,1504	0,0022	1,44	69,58
Km 488	0,1728	0,0024	1,39	79,92
Km 607	0,0938	0,0021	2,20	43,40
Km 612	0,2136	0,0075	3,50	98,82
Umiujaq Vallée	0,1185	0,0045	3,79	54,81
Umiujaq Plateau	0,1455	0,0084	5,77	67,29
Moyenne	0,1542			
Écart type	0,0388			
% CV	25,14			

Résultats d'analyse compilés pour l'analyte 12 des échantillons du lichen <i>S. paschale</i>.				
Km	Moyenne	Écart type	% CV	**Proportion relative (%)
Km 116	0,0165	0,0018	10,92	59,99
Km 125	0,0090	0,0050	54,89	32,78
Km 239	0,0158	0,0024	15,32	57,31
Km 247	0,0150	0,0010	6,52	54,34
Km 386	0,0273	0,0043	15,80	99,11
Km 393	0,0275	0,0023	8,29	100,00
Km 476	0,0234	0,0008	3,63	85,00
Km 488	0,0203	0,0031	15,05	73,87
Km 607	0,0084	0,0034	40,19	30,54
Km 612	0,0056	0,0041	73,04	20,44
Umiujaq Vallée	0,0105	0,0010	9,90	38,31
Umiujaq Plateau	0,0099	0,0013	13,30	35,93
Moyenne	0,0158			
Écart type	0,0075			
% CV	47,42			

Bibliographie

1. Hamelin, L.-E. Le Québécois Nordicité: de la Néologie à la Lexicalisation. *TTR: traduction, terminologie, rédaction* **1995**, 8 (2), 51-65.
2. Hamelin, L.-E. Un Indice Circumpolaire. *Annales de géographie* **1968**, 77 (422), 414-430.
3. Payette, S.; Bouchard, A. Le Contexte Physique et Biogéographique. In *Écologie des tourbières du Québec-Labrador*, 3e tirage ed.; Payette, S.; Line, R., Eds. Les Presses de l'Université Laval: Québec, 2013; pp 9-37.
4. Payette, S. Contexte Géographique. In *Flore Nordique Du Québec Et Du Labrador*, Payette, S.; Garneau, M.; Damboise, K., Eds. PU Laval: Québec, 2013; Vol. 1, pp 47-54.
5. Ropars, P.; Boudreau, S. Shrub Expansion at the Forest-Tundra Ecotone: Spatial Heterogeneity Linked to Local Topography. *Environ. Res. Lett.* **2012**, 7 (1).
6. Morneau, C.; Payette, S. Postfire lichen-spruce woodland recovery at the limit of the boreal forest in northern Quebec. *Canadian Journal of Botany* **1989**, 67 (9), 2770-2782.
7. Savard, J.; Payette, S. Origin and Plant Species Diversity of High-Altitude Tundra Summits Across the Boreal Forest Zone in Eastern Canada. *Ecoscience* **2013**, 20 (3), 283-295.
8. Payette, S.; Filion, L.; Delwaide, A. Spatially Explicit Fire-Climate History of the Boreal Forest-Tundra (Eastern Canada) over the Last 2000 Years. *Phil. Trans. R. Soc. B* **2008**, 363 (1501), 2301-2316.
9. Harper, K. A.; Lavalée, A. A.; Dodonov, P. Patterns of Shrub Abundance and Relationships with Other Plant Types Within the Forest-Tundra Ecotone in Northern Canada. *Arctic Science* **2018**, 4 (4), 691-709.
10. Bhiry, N.; Delwaide, A.; Allard, M.; Bégin, Y.; Filion, L.; Lavoie, M.; Nozais, C.; Payette, S.; Pienitz, R.; Saulnier-Talbot, É. Environmental Change in the Great Whale River Region, Hudson Bay: Five Decades of Multidisciplinary Research by Centre d'Études Nordiques (CEN). *Ecoscience* **2011**, 18 (3), 182-203.
11. Lantz, T. C.; Gergel, S. E.; Kokelj, S. V. Spatial heterogeneity in the shrub tundra ecotone in the Mackenzie Delta region, Northwest Territories: implications for Arctic environmental change. *Ecosystems* **2010**, 13 (2), 194-204.
12. Myers-Smith, I. H.; Forbes, B. C.; Wilmking, M.; Hallinger, M.; Lantz, T.; Blok, D.; Tape, K. D.; Macias-Fauria, M.; Sass-Klaassen, U.; Levesque, E.; Boudreau, S.; Ropars, P.; Hermanutz, L.; Trant, A.; Collier, L. S.; Weijers, S.; Rozema, J.; Rayback, S. A.; Schmidt, N. M.; Schaepman-Strub, G.; Wipf, S.; Rixen, C.; Menard, C. B.; Venn, S.; Goetz, S.; Andreu-Hayles, L.; Elmendorf, S.; Ravolainen, V.; Welker, J.; Grogan, P.; Epstein, H. E.; Hik, D. S. Shrub Expansion in Tundra Ecosystems: Dynamics, Impacts and Research Priorities. *Environ. Res. Lett.* **2011**, 6 (4).
13. Pachauri, R. K.; Allen, M. R.; Barros, V. R.; Broome, J.; Cramer, W.; Christ, R.; Church, J. A.; Clarke, L.; Dahe, Q.; Dasgupta, P.; Dubash, N. K.; Edenhofer, O.; Elgizouli, I.; Field, C. B.; Forster, P.; Friedlingstein, P.; Fuglestedt, J.; Gomez-Echeverri, L.; Hallegatte, S.; Hegerl, G.; Howden, M.; Jiang, K.; Jimenez Cisneros, B.; Kattsov, V.; Lee, H.; Mach, K. J.; Marotzke, J.; Mastrandrea, M. D.; Meyer, L.; Minx, J.; Mulugetta, Y.; O'Brien, K.; Oppenheimer, M.; Pereira, J. J.; Pichs-Madruga, R.; Plattner, G.-K.; Pörtner, H.-O.; Power, S. B.; Preston, B.; Ravindranath, N. H.; Reisinger, A.; Riahi, K.; Rusticucci, M.; Scholes, R.; Seyboth, K.; Sokona, Y.; Stavins, R.; Stocker, T. F.; Tschakert, P.; van Vuuren, D.; van Ypersele, J.-P. *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC: Geneva, Switzerland, 2014; p 151.
14. Pearson, R. G.; Phillips, S. J.; Loranty, M. M.; Beck, P. S.; Damoulas, T.; Knight, S. J.; Goetz, S. J. Shifts in Arctic Vegetation and Associated Feedbacks under Climate Change. *Nat Clim Chang* **2013**, 3 (7), 673.
15. Hinzman, L. D.; Bettez, N. D.; Bolton, W. R.; Chapin, F. S.; Dyrgerov, M. B.; Fastie, C. L.; Griffith, B.; Hollister, R. D.; Hope, A.; Huntington, H. P.; Jensen, A. M.; Jia, G. J.; Jorgenson, T.; Kane, D. L.; Klein, D. R.; Kofinas, G.; Lynch, A. H.; Lloyd, A. H.; McGuire, A. D.; Nelson, F. E.; Oechel, W. C.; Osterkamp, T. E.; Racine, C. H.; Romanovsky, V. E.; Stone, R. S.; Stow, D. A.; Sturm, M.; Tweedie, C. E.; Vourlitis, G. L.; Walker, M. D.; Walker, D. A.; Webber, P. J.; Welker, J. M.; Winker, K. S.; Yoshikawa, K. Evidence and Implications of Recent Climate Change in Northern Alaska and Other Arctic Regions. *Climatic Change* **2005**, 72 (3), 251-298.

16. Tape, K.; Sturm, M.; Racine, C. The Evidence for Shrub Expansion in Northern Alaska and the Pan-Arctic. *Glob Chang Biol* **2006**, *12* (4), 686-702.
17. Elmendorf, S. C.; Henry, G. H.; Hollister, R. D.; Björk, R. G.; Bjorkman, A. D.; Callaghan, T. V.; Collier, L. S.; Cooper, E. J.; Cornelissen, J. H.; Day, T. A. Global Assessment of Experimental Climate Warming on Tundra Vegetation: Heterogeneity over Space and Time. *Ecol. Lett.* **2012**, *15* (2), 164-175.
18. Rustad, L.; Campbell, J.; Marion, G.; Norby, R.; Mitchell, M.; Hartley, A.; Cornelissen, J.; Gurevitch, J. A Meta-Analysis of the Response of Soil Respiration, Net Nitrogen Mineralization, and Aboveground Plant Growth to Experimental Ecosystem Warming. *Oecologia* **2001**, *126* (4), 543-562.
19. Post, E.; Pedersen, C. Opposing Plant Community Responses to Warming with and without Herbivores. *PNAS* **2008**, *105* (34), 12353-12358.
20. Walther, G.-R.; Post, E.; Convey, P.; Menzel, A.; Parmesan, C.; Beebee, T. J.; Fromentin, J.-M.; Hoegh-Guldberg, O.; Bairlein, F. Ecological Responses to Recent Climate Change. *Nature* **2002**, *416* (6879), 389-395.
21. Post, E.; Forchhammer, M. C.; Bret-Harte, M. S.; Callaghan, T. V.; Christensen, T. R.; Elberling, B.; Fox, A. D.; Gilg, O.; Hik, D. S.; Høye, T. T.; Ims, R. A.; Jeppesen, E.; Klein, D. R.; Madsen, J.; McGuire, A. D.; Rysgaard, S.; Schindler, D. E.; Stirling, I.; Tamstorf, M. P.; Tyler, N. J. C.; van der Wal, R.; Welker, J.; Wookey, P. A.; Schmidt, N. M.; Aastrup, P. Ecological Dynamics Across the Arctic Associated with Recent Climate Change. *Science* **2009**, *325* (5946), 1355-1358.
22. Ropars, P.; Levesque, E.; Boudreau, S. Shrub Densification Heterogeneity in Subarctic Regions: the Relative Influence of Historical and Topographic Variables. *Ecoscience* **2015**, *22* (2-4), 83-95.
23. Tremblay, B.; Levesque, E.; Boudreau, S. Recent Expansion of Erect Shrubs in the Low Arctic: Evidence from Eastern Nunavik. *Environ. Res. Lett.* **2012**, *7* (3).
24. Plante, S.; Champagne, E.; Ropars, P.; Boudreau, S.; Lévesque, E.; Tremblay, B.; Tremblay, J.-P. Shrub Cover in Northern Nunavik: Can Herbivores Limit Shrub Expansion? *Polar Biol* **2014**, *37* (5), 611-619.
25. Epstein, H. E.; Walker, M. D.; Chapin III, F. S.; Starfield, A. M. A Transient, Nutrient-Based Model of Arctic Plant Community Response to Climatic Warming. *Ecol Appl* **2000**, *10* (3), 824-841.
26. McGuire, A.; Clein, J. S.; Melillo, J.; Kicklighter, D.; Meier, R.; Vorosmarty, C.; Serreze, M. C. Modelling Carbon Responses of Tundra Ecosystems to Historical and Projected Climate: Sensitivity of Pan-Arctic Carbon Storage to Temporal and Spatial Variation in Climate. *Glob Chang Biol* **2000**, *6* (S1), 141-159.
27. Bret-Harte, M. S.; Shaver, G. R.; Zoerner, J. P.; Johnstone, J. F.; Wagner, J. L.; Chavez, A. S.; Gunkelman IV, R. F.; Lippert, S. C.; Laundre, J. A. Developmental Plasticity Allows *Betula Nana* to Dominate Tundra Subjected to an Altered Environment. *Ecology* **2001**, *82* (1), 18-32.
28. Gilbert, H.; Payette, S. Écologie des Populations d'Aulne Vert (*Alnus crispa* (Ait.) Pursh) à la Limite des Forêts, Québec Nordique. *Géographie physique et Quaternaire* **1982**, *36* (1-2), 109-124.
29. Epstein, H. E.; Beringer, J.; Gould, W. A.; Lloyd, A. H.; Thompson, C.; Chapin III, F. S.; Michaelson, G. J.; Ping, C. L.; Rupp, T.; Walker, D. A. The Nature of Spatial Transitions in the Arctic. *J. Biogeogr.* **2004**, *31* (12), 1917-1933.
30. Boudreau, S.; Payette, S. Caribou-Induced Changes in Species Dominance of Lichen Woodlands: an Analysis of Plant Remains. *Am. J. Bot.* **2004**, *91* (3), 422-429.
31. Hermanutz, L. A.; Innes, D. J.; Weis, I. M. Clonal Structure of Arctic Dwarf Birch (*Betula glandulosa*) at its Northern Limit. *Amer. J. Bot.* **1989**, *76* (5), 755-761.
32. Weis, I. M.; Hermanutz, L. A. Pollination Dynamics of Arctic Dwarf Birch (*Betula glandulosa* Betulaceae) and Its Role in the Loss of Seed Production. *Am. J. Bot.* **1993**, *80* (9), 1021-1027.
33. Sturm, M.; Holmgren, J.; McFadden, J. P.; Liston, G. E.; Chapin III, F. S.; Racine, C. H. Snow-Shrub Interactions in Arctic Tundra: a Hypothesis with Climatic Implications. *J. Clim* **2001**, *14* (3), 336-344.
34. Paradis, M.; Levesque, E.; Boudreau, S. Greater Effect of Increasing Shrub Height on Winter Versus Summer Soil Temperature. *Environ. Res. Lett.* **2016**, *11* (8).
35. Liston, G. E.; Mcfadden, J. P.; Sturm, M.; Pielke, R. A. Modelled Changes in Arctic Tundra Snow, Energy and Moisture Fluxes due to Increased Shrubs. *Glob Chang Biol* **2002**, *8* (1), 17-32.
36. Lafleur, P. M.; Humphreys, E. R. Tundra Shrub Effects on Growing Season Energy and Carbon Dioxide Exchange. *Environ. Res. Lett.* **2018**, *13* (5).

37. Chapin, F. S.; Sturm, M.; Serreze, M. C.; McFadden, J. P.; Key, J. R.; Lloyd, A. H.; McGuire, A. D.; Rupp, T. S.; Lynch, A. H.; Schimel, J. P.; Beringer, J.; Chapman, W. L.; Epstein, H. E.; Euskirchen, E. S.; Hinzman, L. D.; Jia, G.; Ping, C.-L.; Tape, K. D.; Thompson, C. D. C.; Walker, D. A.; Welker, J. M. Role of Land-Surface Changes in Arctic Summer Warming. *Science* **2005**, *310* (5748), 657-660.
38. Street, L. E.; Subke, J. A.; Baxter, R.; Dinsmore, K. J.; Knoblauch, C.; Wookey, P. A. Ecosystem Carbon Dynamics Differ Between Tundra Shrub Types in the Western Canadian Arctic. *Environ. Res. Lett.* **2018**, *13* (8).
39. Schuur, E. A. G.; McGuire, A. D.; Schädel, C.; Grosse, G.; Harden, J. W.; Hayes, D. J.; Hugelius, G.; Koven, C. D.; Kuhry, P.; Lawrence, D. M.; Natali, S. M.; Olefeldt, D.; Romanovsky, V. E.; Schaefer, K.; Turetsky, M. R.; Treat, C. C.; Vonk, J. E. Climate Change and the Permafrost Carbon Feedback. *Nature* **2015**, *520* (7546), 171-179.
40. Thompson, D. P.; Barboza, P. S. Nutritional Implications of Increased Shrub Cover for Caribou (*Rangifer tarandus*) in the Arctic. *Can. J. Zool.* **2014**, *92* (4), 339-351.
41. Chapin III, F.; McKendrick, J.; Johnson, D. Seasonal Changes in Carbon Fractions in Alaskan Tundra Plants of Differing Growth form: Implications for Herbivory. *J. Ecol.* **1986**, 707-731.
42. Iturrate-Garcia, M.; Heijmans, M.; Cornelissen, J. H. C.; Schweingruber, F. H.; Niklaus, P. A.; Schaepman-Strub, G. Plant Trait Response of Tundra Shrubs to Permafrost Thaw and Nutrient Addition. *Biogeosciences* **2020**, *17* (20), 4981-4998.
43. McGuire, A. D.; Chapin, F. S.; Walsh, J. E.; Wirth, C. Integrated Regional Changes in Arctic Climate Feedbacks: Implications for the Global Climate System. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **2006**, *31* (1), 61-91.
44. Payette, S. Structure Biogéographique. In *Flore Nordique Du Québec Et Du Labrador*, Payette, S.; Garneau, M.; Damboise, K., Eds. PU Laval: Québec, 2013; Vol. 1, pp 61-91.
45. Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G.; Scheffer, J. J. Factors Affecting Secondary Metabolite Production in Plants: Volatile Components and Essential Oils. *Flavour Fragr J* **2008**, *23* (4), 213-226.
46. Walsh, C. T.; Tang, Y. *Natural Product Biosynthesis*. Royal Society of Chemistry: 2017.
47. Organisation Internationale de Normalisation ISO 9235:2013 Matières Premières Aromatiques Naturelles — Vocabulaire. <https://www.iso.org/fr/about-us.html> (accessed 21-10-2020).
48. Uprety, Y.; Asselin, H.; Dhakal, A.; Julien, N. Traditional Use of Medicinal Plants in the Boreal Forest of Canada: Review and Perspectives. *J Ethnobiol Ethnomed* **2012**, *8*:7, 1-14.
49. Uprety, Y.; Lacasse, A.; Asselin, H. Traditional Uses of Medicinal Plants from the Canadian Boreal Forest for the Management of Chronic Pain Syndromes. *Pain Practice* **2016**, *16* (4), 459-466.
50. Samuelsson, G. *Drugs of Natural Origin : a Textbook of Pharmacognosy*. 4th rev. ed ed.; Swedish Pharmaceutical Press: Stockholm, 1999; p 551 pages.
51. Cragg, G. M.; Newman, D. J. Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *J Ethnopharmacol* **2005**, *100* (1-2), 72-79.
52. Katz, L.; Baltz, R. H. Natural Product Discovery: Past, Present, and Future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *43* (2-3), 155-176.
53. Smith Jr, J. P. Economically Important Plants Arranged Systematically. *Botanical Studies* **2017**.
54. Patridge, E.; Gareiss, P.; Kinch, M. S.; Hoyer, D. An Analysis of FDA-approved Drugs: Natural Products and their Derivatives. *Drug Discov. Today* **2016**, *21* (2), 204-207.
55. Kingston, D. G. Modern Natural Products Drug Discovery and its Relevance to Biodiversity Conservation. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (3), 496-511.
56. Zhang, X.; Organization, W. H.; Medicine, P. o. T. *Traditional Medicine Strategy 2002-2005*. 2002; p 61.
57. Burt, S. Essential Oils: their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods—a Review. *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94* (3), 223-253.
58. Heinrich, M. Ethnobotany and its Role in Drug Development. *Phytother. Res.* **2000**, *14* (7), 479-488.
59. Balunas, M. J.; Kinghorn, A. D. Drug Discovery from Medicinal Plants. *Life sciences* **2005**, *78* (5), 431-441.
60. Van Agtmael, M. Artemisinin Drugs in the Treatment of Malaria: from Medicinal Herb to Registered Medication. *Trends Pharmacol. Sci.* **1999**, *20* (5), 199-205.

61. Heinrich, M.; Lee Teoh, H. Galanthamine from Snowdrop—the Development of a Modern Drug Against Alzheimer's Disease from Local Caucasian Knowledge. *J Ethnopharmacol* **2004**, *92* (2-3), 147-162.
62. Hamilton, A. C. Medicinal Plants, Conservation and Livelihoods. *Biodivers. Conserv.* **2004**, *13* (8), 1477-1517.
63. Borins, M. Native Healing Traditions Must be Protected and Preserved for Future Generations. *Can Med Assoc J* **1995**, *153* (9), 1356-1357.
64. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach: Third Edition*. 3e ed.; John Wiley & Sons: Chichester, 2009; p 1-539.
65. Keefover-Ring, K.; Thompson, J. D.; Linhart, Y. B. Beyond Six Scents: Defining a seventh *Thymus vulgaris* Chemotype New to Southern France by Ethanol Extraction. *Flavour Fragr J* **2009**, *24* (3), 117-122.
66. Kokkini, S.; Vokou, D. *Mentha spicata* (Lamiaceae) Chemotypes Growing Wild in Greece. *Econ. Bot.* **1989**, *43* (2), 192-202.
67. Vokou, D.; Kokkini, S.; Bessiere, J.-M. Geographic Variation of Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) Essential Oils. *Biochem. Syst. Ecol.* **1993**, *21* (2), 287-295.
68. Baser, K. H. C.; Buchbauer, G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. 2e ed.; CRC press: Boca Raton, 2015.
69. Santos, P. A. G.; Barroso, J. G.; Cristina Figueiredo, A.; Pedro, L. G.; Salgueiro, L. R.; Fontinha, S. S.; Deans, S. G.; Scheffer, J. J. C. Chemical Polymorphism of Populations of *Thymus caespitosus* Grown on the Islands Corvo, Flores, São Miguel and Terceira (Azores) and on Madeira, Assessed by Analysis of their Essential Oils. *Plant Science* **2005**, *169* (6), 1112-1117.
70. Fernandez, X.; Chémat, F. *La Chimie des Huiles Essentielles : Tradition et Innovation*. Vuibert: Paris, 2012.
71. Dhifi, W.; Bellili, S.; Jazi, S.; Bahloul, N.; Mnif, W. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of some Biological Activities: a Critical Review. *Medicines* **2016**, *3* (4), 25.
72. Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; Liberto, E.; Cordero, C.; Bicchi, C. Essential Oils and Volatiles: Sample Preparation and Analysis. A Review. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25* (5), 282-290.
73. Moghaddam, M.; Farhadi, N. Influence of Environmental and Genetic Factors on Resin Yield, Essential Oil Content and Chemical Composition of *Ferula assa-foetida* L. Populations. *JARMAP* **2015**, *2* (3), 69-76.
74. Judžientienė, A.; Būdienė, J.; Misiūnas, A.; Butkienė, R. Variation in Essential Oil Composition of *Rhododendron tomentosum* Gathered in Limited Population (in Eastern Lithuania). *CHEMIJA* **2012**, *23* (2).
75. Uprety, Y.; Poudel, R. C.; Asselin, H.; Boon, E. Plant Biodiversity and Ethnobotany Inside the Projected Impact Area of the Upper Seti Hydropower Project, Western Nepal. *Environ. Dev. Sustain.* **2011**, *13* (3), 463-492.
76. Miguel, M. G.; Duarte, J.; Figueiredo, A. C.; Barroso, J. G.; Pedro, L. G. *Thymus carnosus* Boiss.: Effect of Harvesting Period, Collection Site and Type of Plant Material on Essential Oil Composition. *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17* (4), 422-426.
77. McKenzie, M.; Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B. Risks Associated with Overcollection of Medicinal Plants in Natural Habitats. In *Recent Advances in Plant Biotechnology*, Kirakosyan, A.; Kaufman, P. B., Eds. Springer: New York, 2009; pp 363-387.
78. Wetzstein, H. Y.; Porter, J. A.; Janick, J.; Ferreira, J. F. S.; Mutui, T. M. Selection and Clonal Propagation of High Artemisinin Genotypes of *Artemisia annua*. *Front Plant Sci* **2018**, *9*.
79. Antoniotti, S.; Abert Vian, M.; Chemat, F. Les Huiles Essentielles Comme Ingrédients pour une Chimie «Verte». In *La chimie des huiles essentielles : tradition et innovation*, Fernandez, X.; Chémat, F., Eds. Vuibert: Paris, 2012; pp 212-248.
80. Kirby, J.; Keasling, J. D. Biosynthesis of Plant Isoprenoids: Perspectives for Microbial Engineering. In *Annual Review of Plant Biology*, 2009; Vol. 60, pp 335-355.
81. Grasse, M.-C. Extraction des Huiles Essentielles à Travers l'Histoire. In *La Chimie des Huiles Essentielles : Tradition et Innovation*, Fernandez, X.; Chémat, F., Eds. Vuibert: Paris, 2012; pp 59-77.
82. Saikia, A. P.; Ryakala, V. K.; Sharma, P.; Goswami, P.; Bora, U. Ethnobotany of Medicinal Plants Used by Assamese People for Various Skin Ailments and Cosmetics. *J Ethnopharmacol* **2006**, *106* (2), 149-157.

83. Levy, P. S.; Lemeshow, S. *Sampling of Populations : Methods and Applications*. 4th ed. ed.; Wiley: Hoboken, N.J., 2008.
84. Bicchi, C.; Joulain, D. Techniques for Preparing Essential Oils and Aromatic Extracts. *Flavour Fragr J* **2018**, 33 (2), 133-134.
85. Köhl, M.; Magnussen, S.; Marchetti, M. *Sampling Methods, Remote Sensing and GIS Multiresource Forest Inventory*. Springer: Berlin ;, 2006.
86. Monin, C. Les Techniques de Distillation des Plantes. In *La Chimie des Huiles Essentielles : Tradition et Innovation*, Fernandez, X.; Chémat, F., Eds. Vuibert: Paris, 2012; pp 78-101.
87. Bicchi, C.; Chaintreau, A.; Joulain, D. Identification of Flavour and Fragrance Constituents. *Flavour Fragr J* **2018**, 33 (3), 201-202.
88. Clevenger, J. F. Apparatus for the Determination of Volatile Oil. *The Journal of the American Pharmaceutical Association* **1928**, 17 (4), 345-349.
89. Begnaud, F.; Chaintreau, A. Good Quantification Practices of Flavours and Fragrances by Mass Spectrometry. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* **2016**, 374 (2016), 20160179.
90. Buttery, R. G.; McFadden, W. H.; Teranishi, R.; Kealy, M. P.; Mon, T. R. Constituents of Hop Oil. *Nature* **1963**, 200 (4905), 435-436.
91. Paris, J.-P.; Fernandez, X. Analyses Chromatographiques. In *La Chimie des Huiles Essentielles : Tradition et Innovation*, Fernandez, X.; Chémat, F., Eds. Vuibert: Paris, 2012; pp 145-173.
92. Mondello, L. *Mass Spectra of Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds*. Wiley Blackwell: 2015.
93. Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. ed. 4.1 ed.; Allured: 2017; p 804.
94. NIST 14. Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH). Technology, N. I. o. S. a., Ed. Gaithersburg, USA, 2014.
95. Kovats, E. Gas Chromatographic Characterization of Organic Compounds. I. Retention Indexes of Aliphatic Halides, Alcohols, Aldehydes, and Ketones. *Helv. Chim. Acta* **1958**, 41, 1915.
96. Van den Dool, H.; Kratz, P. D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J Chromatogr* **1963**, 11, 463-471.
97. Zellner, B. D.; Bicchi, C.; Dugo, P.; Rubiolo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. Linear Retention Indices in Gas Chromatographic Analysis: a Review. *Flavour Fragr J* **2008**, 23 (5), 297-314.
98. Chaintreau, A.; Bicchi, C.; Rubiolo, P. Quantifying the Constituents of Flavours, Fragrances and Essential Oils. *Flavour and Fragrance Journal* **2018**, 33 (5), 337-339.
99. Gauthier, R. Ericaceae. In *Flore Nordique du Québec et du Labrador*, Payette, S.; Garneau, M.; Damboise, K., Eds. Presses de l'Université Laval: Québec, 2018; Vol. 3, pp 225-330.
100. Judd, W. S.; Kron, K. A. Rhododendron groenlandicum (Oeder) Kron & Judd. In: Flora of North America, eds. 1993+. Flora of North America North of Mexico [Online]. 21+ vols. New York and Oxford. Vol. 8. http://beta.floranorthamerica.org/Rhododendron_groenlandicum (accessed 30 octobre 2020).
101. Dampc, A.; Luczkiewicz, M. Labrador Tea - the Aromatic Beverage and Spice: a Review of Origin, Processing and Safety. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, 95 (8), 1577-1583.
102. Collin, G. Aromas from Quebec. IV. Chemical composition of the essential oil of Ledum groenlandicum: A review. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* **2015**, 2 (3), 06-11.
103. Belleau, F.; Collin, G. Composition of the Essential Oil of Ledum Groenlandicum. *Phytochemistry* **1993**, 33 (1), 117-121.
104. Poaty, B.; Lahlah, J.; Porqueres, F.; Bouaff, H. Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Seven Essential Oils from the North American Boreal Forest. *World J Microbiol Biotechnol* **2015**, 31 (6), 907-19.
105. Idaomar, M.; El Hamss, R.; Bakkali, F.; Mezzoug, N.; Zhiri, A.; Baudoux, D.; Muñoz-Serrano, A.; Liemans, V.; Alonso-Moraga, A. Genotoxicity and Antigenotoxicity of Some Essential Oils Evaluated by Wing Spot Test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.* **2002**, 513 (1-2), 61-68.

106. Integrated Taxonomic Information System *Rhododendron tomentosum* Harmaja. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=894434#null (accessed 30 octobre 2020).
107. Judd, W. S.; Kron, K. A. *Rhododendron tomentosum* Harmaja In: Flora of North America, eds. 1993+. Flora of North America North of Mexico [Online]. 21+ vols. New York and Oxford. Vol. 8. [http://beta.floranorthamerica.org/Rhododendron tomentosum](http://beta.floranorthamerica.org/Rhododendron_tomentosum) (accessed 30 octobre 2020).
108. Harmaja, H. Taxonomic Notes on *Rhododendron* Subsection *Ledum* (*Ledum*, Ericaceae), with a Key to its Species. *Ann. Bot. Fenn.* **1991**, 28 (2), 171-173.
109. Karlin, E.; Bliss, L. Germination Ecology of *Ledum groenlandicum* and *Ledum palustre* ssp. *decumbens*. *Arct. Antarct. Alp. Res.* **1983**, 15 (3), 397-404.
110. Black, P.; Saleem, A.; Dunford, A.; Guerrero-Analco, J.; Walshe-Roussel, B.; Haddad, P.; Cuerrier, A.; Arnason, J. T. Seasonal Variation of Phenolic Constituents and Medicinal Activities of Northern Labrador Tea, *Rhododendron tomentosum* ssp. *Subarcticum*, an Inuit and Cree First Nations Traditional Medicine. *Planta med.* **2011**, 77 (14), 1655-1662.
111. Tam, T. W.; Liu, R.; Arnason, J. T.; Krantis, A.; Staines, W. A.; Haddad, P. S.; Foster, B. C. Actions of Ethnobotanically Selected Cree Anti-diabetic Plants on Human Cytochrome P450 Isoforms and Flavin-containing Monooxygenase 3. *J Ethnopharmacol* **2009**, 126 (1), 119-126.
112. Butkienė, R.; Šakočiūtė, V.; Latvėnaitė, D.; Mockutė, D. Composition of Young and Aged Shoot Essential Oils of the Wild *Ledum palustre* L. *Chemija* **2008**, 19 (2).
113. Jin, C.; Strembiski, W.; Kulchytska, Y.; Daneshtalab, R. G. M. M. Flavonoid Glycosides From *Ledum palustre* L. Subsp. *decumbens* (AIT) Hulton. *DARU* **1999**, 7 (4), 5-8.
114. Popescu, R.; Kopp, B. The Genus *Rhododendron*: an Ethnopharmacological and Toxicological Review. *J Ethnopharmacol* **2013**, 147 (1), 42-62.
115. Dampc, A.; Luczkiewicz, M. *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*). A Review of Traditional use Based on Current Research. *Fitoterapia* **2013**, 85, 130-143.
116. Egigu, M. C.; Ibrahim, M. A.; Yahya, A.; Holopainen, J. K. *Cordeauxia edulis* and *Rhododendron tomentosum* Extracts Disturb Orientation and Feeding Behavior of *Hylobius abietis* and *Phyllodecta laticollis*. *Entomol. Exp. Appl.* **2011**, 138 (2), 162-174.
117. Sõukand, R.; Kalle, R.; Svanberg, I. Uninvited Guests: Traditional Insect Repellents in Estonia used Against the Clothes Moth *Tineola bisselliella*, Human Flea *Pulex irritans* and Bedbug *Cimex lectularius*. *J. Insect Sci.* **2010**, 10 (150), 1-18.
118. Tulp, M.; Bohlin, L. Unconventional Natural Sources for Future Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2004**, 9 (10), 450-458.
119. Zhao, Q. J.; Ding, Q. Z.; Yuan, G. S.; Xu, F.; Li, B. N.; Wang, J. Z.; Ouyang, J. Comparison of the Essential Oil Composition of Wild *Rhododendron tomentosum* Stems, Leaves, and Flowers in Bloom and Non-bloom Periods from Northeast China. *J ESSENT OIL BEAR PL* **2016**, 19 (5), 1216-1223.
120. Judzentiene, A.; Butkiene, R.; Budiene, J.; Tomi, F.; Casanova, J. Composition of Seed Essential Oils of *Rhododendron tomentosum*. *Nat Prod Commun* **2012**, 7 (2), 227-230.
121. Judzentiene, A.; Budiene, J.; Svediene, J.; Garjonyte, R. Toxic, Radical Scavenging, and Antifungal Activity of *Rhododendron tomentosum* H. Essential Oils. *Molecules* **2020**, 25 (7).
122. Jiang, S.; Ding, Q. Z.; Wu, Y. W.; Zhong, Z. W.; Ouyang, J. Comparison of the Chemical Compounds and Antioxidant Activities of Essential Oil and Ethanol Extract from *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* **2017**, 20 (4), 927-936.
123. Jesionek, A.; Kokotkiewicz, A.; Mikosik-Roczynska, A.; Ciesielska-Figlon, K.; Luczkiewicz, P.; Bucinski, A.; Daca, A.; Witkowski, J. M.; Bryl, E.; Zabiegała, B. Chemical Variability of *Rhododendron tomentosum* (*Ledum palustre*) Essential Oils and their Pro-apoptotic Effect on Lymphocytes and Rheumatoid Arthritis Synoviocytes. *Fitoterapia* **2019**, 139, 104402.
124. Jesionek, A.; Kokotkiewicz, A.; Włodarska, P.; Filipowicz, N.; Bogdan, A.; Ochocka, R.; Szreniawa-Sztajnert, A.; Zabiegała, B.; Bucinski, A.; Luczkiewicz, M. In Vitro Propagation of *Rhododendron tomentosum* – an Endangered Essential Oil Bearing Plant from Peatland. *Acta Biologica Cracoviensia s. Botanica* **2016**, vol. 58 (No 2).

125. Jaenson, T. G. T.; Palsson, K.; Borg-Karlson, A. K. Evaluation of Extracts and Oils of Tick-Repellent Plants from Sweden. *Med. Vet. Entomol.* **2005**, *19* (4), 345-352.
126. Baananou, S.; Bagdonaite, E.; Marongiu, B.; Piras, A.; Porcedda, S.; Falconieri, D.; Boughattas, N. A. Supercritical CO₂ Extract and Essential Oil of Aerial Part of *Ledum palustre* L. - Chemical Composition and Anti-inflammatory Activity. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29* (11), 999-1005.
127. Belousova, N.; Khan, V.; Berezovskaya, T. Intraspecies Chemical Variability of the Essential Oil of *Ledum palustre*. *Chem. Nat. Compd.* **1990**, *26* (4), 398-405.
128. Benelli, G.; Pavela, R.; Cianfaglione, K.; Sender, J.; Danuta, U.; Maślanko, W.; Canale, A.; Barboni, L.; Petrelli, R.; Zeppa, L.; Aguzzi, C.; Maggi, F. Ascaridole-Rich Essential Oil from Marsh Rosemary (*Ledum palustre*) Growing in Poland Exerts Insecticidal Activity on Mosquitoes, Moths and Flies Without Serious Effects on Non-Target Organisms and Human Cells. *Food Chem. Toxicol.* **2020**, *138*, 111184.
129. Gretšušnikova, T.; Järvan, K.; Orav, A.; Koel, M. Comparative Analysis of the Composition of the Essential Oil from the Shoots, Leaves and Stems the Wild *Ledum palustre* L. from Estonia. *Procedia Chemistry* **2010**, *2* (1), 168-173.
130. Kim, D.-M.; Nam, B.-W. Extracts and Essential Oil of *Ledum palustre* L. Leaves and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities. *Prev Nutr Food Sci* **2006**, *11* (2), 100-104.
131. Klokova, M. V.; Khan, V. A.; Dubovenko, Z. V.; Pentegova, V. A.; Berezovskaya, T. P.; Serykh, E. A. Terpenoids of the Essential Oil of *Ledum palustre*. *Chem. Nat. Compd.* **1983**, *19* (3), 278-281.
132. Mikhailova, N.; Rybalko, K.; Sheichenko, V. A Study of the Chemical Composition of the Essential Oil of *Ledum palustre*. *Chem. Nat. Compd.* **1979**, *15* (3), 278-282.
133. Tattje, D.; Bos, R. Composition of Essential Oil of *Ledum palustre*. *Planta Medica* **1981**, *41* (03), 303-307.
134. Ueyama, Y.; Hashimoto, S.; Nii, H.; Furukawa, K. Constituents of the Essential Oil from *Ledum palustre* L. Var *angustum* N. Busch. *Nippon Nogeikagaku Kaishi-Journal of the Japan Society for Bioscience Biotechnology and Agrochemistry* **1989**, *63* (4), 849-851.
135. Saint-Louis, A. Myricaceae. In *Flore Nordique du Québec et du Labrador*, Payette, S.; Garneau, M.; Damboise, K., Eds. Presses de l'Université Laval: Québec, 2015; Vol. 2, pp 465-469.
136. Bornstein, A. J. *Myrica gale* Linnaeus. In: *Flora of North America*, eds. 1993+. *Flora of North America North of Mexico* [Online]. 21+ vols. New York and Oxford. Vol. 3. http://beta.floranorthamerica.org/Myrica_gale (accessed 02 novembre 2020).
137. Hancock, R. D.; Morris, W. L.; Ducreux, L. J. M.; Morris, J. A.; Usman, M.; Verrall, S. R.; Fuller, J.; Simpson, C. G.; Zhang, R. X.; Hedley, P. E.; Taylor, M. A. Physiological, Biochemical and Molecular Responses of the Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plant to Moderately Elevated Temperature. *Plant Cell Environ.* **2014**, *37* (2), 439-450.
138. Simpson, M. J. A.; MacIntosh, D. F.; Cloughley, J. B.; Stuart, A. E. Past, Present and Future Utilisation of *Myrica gale* (Myricaceae). *Econ. Bot.* **1996**, *50* (1), 122-129.
139. Behre, K.-E. The History of Beer Additives in Europe — A Review. *Veget Hist Archaeobot* **1999**, *8* (1-2), 35-48.
140. Popovici, J.; Bertrand, C.; Bagnarol, E.; Fernandez, M. P.; Comte, G. Chemical Composition of Essential Oil and Headspace-solid Microextracts from Fruits of *Myrica gale* L. and Antifungal Activity. *Nat. Prod. Res.* **2008**, *22* (12), 1024-1032.
141. Skene, K. R.; Sprent, J. I.; Raven, J. A.; Herdman, L. *Myrica gale* L. *J. Ecol.* **2000**, *88* (6), 1079-1094.
142. Svoboda, K. P.; Inglis, A.; Hampson, J.; Galambosi, B.; Asakawa, Y. Biomass Production, Essential Oil Yield and Composition of *Myrica gale* L. Harvested from Wild Populations in Scotland and Finland. *Flavour Fragr. J.* **1998**, *13* (6), 367-372.
143. Sokolova, M.; Orav, A.; Koel, M.; Kailas, T.; Muurisepp, M. Composition of the Oil and Supercritical Fluid CO₂ Extract of Sweet Gale (*Myrica gale* L.) Fruits. *J. Essent. Oil Res.* **2005**, *17* (2), 188-191.
144. Carlton, R. R.; Waterman, P. G.; Gray, A. I. Variation of Leaf Gland Volatile Oil Within a Population of Sweet Gale (*Myrica gale*) (Myricaceae). *Chemoecology* **1992**, *3* (1), 45-54.
145. Lawrence, B. M.; Weaver, K. M. Essential Oils and Their Constituents .7. A Comparative Chemical Composition of Essential Oils of *Myrica gale* and *Comptonia peregrina*. *Planta Medica* **1974**, *25* (4), 385-388.

146. Nakata, M.; Myoda, T.; Wakita, Y.; Sato, T.; Tanahashi, I.; Toeda, K.; Fujimori, T.; Nishizawa, M. Volatile Components of Essential Oil from Cultivated *Myrica gale* var. *tomentosa* and Its Antioxidant and Antimicrobial Activities. *J Oleo Sci* **2013**, *62* (9), 755-762.
147. Pickles, S. S. Composition of the Essential Oil of *Myrica gale* L. *J Chem Soc* **1911**, 99, 1764-1768.
148. Popovici, J.; Bertrand, C.; Jacquemoud, D.; Bellvert, F.; Fernandez, M. P.; Comte, G.; Piola, F. An Allelochemical from *Myrica gale* with Strong Phytotoxic Activity against Highly Invasive *Fallopia x bohemica* Taxa. *Molecules* **2011**, *16* (3), 2323-2333.
149. Sylvestre, M.; Legault, J.; Dufour, D.; Pichette, A. Chemical Composition and Anticancer Activity of Leaf Essential Oil of *Myrica gale* L. *Phytomedicine* **2005**, *12* (4), 299-304.
150. Sylvestre, M.; Legault, J.; Lavoie, S.; Pichette, A. Investigation of Leaf Essential Oil of *Myrica gale* L. from Quebec: Purification and Analysis of Oxygenated Fractions. *J. Essent. Oil Res.* **2006**, *18* (1), 38-41.
151. Wawrzynczak, K.; Sadowska, B.; Wieckowska-Szakiel, M.; Kalemba, D. Composition and Antimicrobial Activity of *Myrica gale* L. Leaf and Flower Essential Oils and Hydrolates. *Rec. Nat. Prod.* **2021**, *15* (1), 35-45.
152. Halim, A. F.; Collins, R. P. Essential Oil Analysis of the Myricaceae of the Eastern United States. *Phytochemistry* **1973**, *12* (5), 1077-1083.
153. Smedman, L. Å.; Snajberk, K.; Zavarin, E.; Mon, T. R. Oxygenated Monoterpenoids and Sesquiterpenoid Hydrocarbons of the Cortical Turpentine from Different *Abies* Species. *Phytochemistry* **1969**, *8* (8), 1471-1479.
154. Zavarin, E.; Snajberk, K. Chemotaxonomy of the Genus *Abies* - I. *Phytochemistry* **1965**, *4* (1), 141-148.
155. Heywood, V. H. The Role of Chemistry in Plant Systematics. *Pure Appl. Chem.* **1973**, *34* (3-4), 355-376.
156. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological Effects of Essential Oils-a Review. *Food Chem Toxicol* **2008**, *46* (2), 446-75.
157. Reichardt, P. B.; Bryant, J. P.; Anderson, B. J.; Phillips, D.; Clausen, T. P.; Meyer, M.; Frisby, K. Germacrone Defends Labrador Tea from Browsing by Snowshoe Hares. *J. Chem. Ecol.* **1990**, *16* (6), 1961-1970.
158. Reader, R. Impact of Leaf-Feeding Insects on Three Bog Ericads *Can. J. Bot.* [Online], 1979, p. 2107-2112. WorldCat.org.
159. Keith, L. B.; Cary, J. R.; Rongstad, O. J.; Brittingham, M. C. Demography and Ecology of a Declining Snowshoe Hare Population. *Wildlife Monographs* **1984**, (90), 3-43.
160. Judzentiene, A. Review: Marsh Rosemary (*Rhododendron tomentosum* Harmaja (ex *Ledum palustre* Linn) Growing in Lithuania) Essential Oils and their Properties. *CHEMIJA* **2020**, *31* (4), 269-277.
161. Jaenson, T. G. T.; aring; Isson, K.; Borg-Karlson, A.-K. Evaluation of Extracts and Oils of Mosquito (Diptera: Culicidae) Repellent Plants from Sweden and Guinea-Bissau. *J. Med. Entomol.* **2006**, *43* (1), 113-119.
162. Collin, G.; Gagnon, H. Chemical Composition and Stability of the Hydrosol Obtained During the Production of Essential Oils. III. The Case of *Myrica gale* L., *Comptonia peregrina* (L.) Coulter and *Ledum groenlandicum* Retzius. *Am. J. Essent. Oil. Nat. Prod.* **2016**, *4* (1), 07-19.
163. Carlton, R. R.; Waterman, P. G.; Gray, A. I.; Deans, S. G. The Antifungal Activity of the Leaf Gland Volatile Oil of Sweet Gale (*Myrica Gale*) (Myricaceae). *Chemoecology* **1992**, *3* (1), 55-59.
164. map, G. Localisation des sites de collecte, été 2019, Nunavik, Québec. maps.google.com, 2020.
165. Plainfossé, H.; Trinel, M.; Verger-Dubois, G.; Azoulay, S.; Burger, P.; Fernandez, X. Valorisation of *Ribes nigrum* L. Pomace, an Agri-Food By-Product to Design a New Cosmetic Active. *Cosmetics* **2020**, *7* (3), 56.
166. Zhang, L. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil from Chinese Wild *Ledum palustre* L. on *Vibrio Parahaemolyticus*. *Int J Food Nutr Sci* **2017**, *4* (1), 0-0.
167. Cavalli, J. F.; Tomi, F.; Bernardini, A. F.; Casanova, J. Combined Analysis of the Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR Spectroscopy: Quantitative Determination of Ascaridole, a Heat-sensitive Compound. *Phytochem Anal* **2004**, *15* (5), 275-9.

168. Gbenou, J. D.; Moudachirou, M.; Chalchat, J.-C.; Figuéredo, G. Chemotypes in *Melaleuca quinquenervia* (Cav.) S.T. Blake (Niaouli) from Benin Using Multivariate Statistical Analysis of Their Essential Oils. *J. Essent. Oil Res.* **2007**, *19* (2), 101-104.
169. Agostini, G.; Agostini, F.; Atti-Serafini, L.; Echeverrigaray, S. Essential Oil Variability Within and Among Populations of *Cunila Incisa* Benth. *Biochemical Systematics and Ecology* **2006**, *34* (11), 802-808.
170. Grassi, P.; Nuñez, M. J.; Varmuza, K.; Franz, C. Chemical Polymorphism of Essential Oils of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. *Flavour Fragr J* **2005**, *20* (2), 131-135.
171. Ribeiro, S. M.; Serra, A. C.; Gonsalves, A. Covalently Immobilized Porphyrins as Photooxidation Catalysts. *Tetrahedron* **2007**, *63* (33), 7885-7891.
172. Monzote, L.; Stamberg, W.; Staniek, K.; Gille, L. Toxic Effects of Carvacrol, Caryophyllene Oxide, and Ascaridole from Essential Oil of *Chenopodium ambrosioides* on Mitochondria. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2009**, *240* (3), 337-347.
173. Viljoen, A.; Van Vuuren, S.; Ernst, E.; Klepser, M.; Demirci, B.; Başer, H.; Van Wyk, B.-E. *Osmitopsis asteriscoides* (Asteraceae)-the Antimicrobial Activity and Essential Oil Composition of a Cape-Dutch Remedy. *J Ethnopharmacol* **2003**, *88* (2-3), 137-143.
174. Pavela, R. Acute, Synergistic and Antagonistic Effects of some Aromatic Compounds on the *Spodoptera littoralis* Bois. (Lep., Noctuidae) Larvae. *Ind Crops Prod* **2014**, *60*, 247-258.
175. Pavela Roman, R. Acute Toxicity and Synergistic and Antagonistic Effects of the Aromatic Compounds of some Essential Oils against *Culex quinquefasciatus* Say Larvae. *Parasitol. Res.* **2015**, *114* (10), 3835-53.
176. Pastor, J.; Garcia, M.; Steinbauer, S.; Setzer, W. N.; Scull, R.; Gille, L.; Monzote, L. Combinations of Ascaridole, Carvacrol, and Caryophyllene Oxide Against *Leishmania*. *Acta Tropica* **2015**, *145*, 31-38.
177. Burger, P.; Landreau, A.; Azoulay, S.; Michel, T.; Fernandez, X. Skin Whitening Cosmetics: Feedback and Challenges in the Development of Natural Skin Lighteners. *Cosmetics* **2016**, *3* (4), 36.
178. Debelle, L.; Tamburro, A. M. Elastin: Molecular Description and Function. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1999**, *31* (2), 261-272.
179. Wittenauer, J.; Mäcke, S.; Sußmann, D.; Schweiggert-Weisz, U.; Carle, R. Inhibitory Effects of Polyphenols from Grape Pomace Extract on Collagenase and Elastase Activity. *Fitoterapia* **2015**, *101*, 179-187.
180. Lu, W.; Zhao, X.; Xu, Z.; Dong, N.; Zou, S.; Shen, X.; Huang, J. Development of a New Colorimetric Assay for Lipoyxygenase Activity. *Anal. Biochem.* **2013**, *441* (2), 162-168.
181. Chittiboyina, A. G.; Avonto, C.; Khan, I. A. What Happens after Activation of Ascaridole? Reactive Compounds and Their Implications for Skin Sensitization. *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29* (9), 1488-1492.
182. Hausen, B. M.; Reichling, J.; Harkenthal, M. Degradation Products of Monoterpenes are the Sensitizing Agents in Tea Tree Oil. *Am. J. Contact Dermatitis* **1999**, *10* (2), 68-77.
183. Bakker, C.; Blomeke, B.; Coenraads, P. J.; Schuttelaar, M. L. Ascaridole, a Sensitizing Component of Tea Tree Oil, Patch Tested at 1% and 5% in Two Series of Patients. *Contact Dermatitis* **2011**, *65* (4), 240-241.
184. Christoffers, W. A.; Blömeke, B.; Coenraads, P.-J.; Schuttelaar, M.-L. A. Co-sensitization to Ascaridole and Tea Tree Oil. In *Hand Eczema: Intervention and Contact Allergies*, Christoffers, W. A., Ed. Groningen, Pays-Bas, 2014; Vol. 69, pp 191-196.
185. Christoffers, W. A.; Blömeke, B.; Coenraads, P. J.; Schuttelaar, M. L. A. The Optimal Patch Test Concentration for Ascaridole as a Sensitizing Component of Tea Tree Oil. *Contact dermatitis* **2014**, *71* (3), 129-137.
186. Krutz, N. L.; Hennen, J.; Korb, C.; Schellenberger, M. T.; Gerberick, G. F.; Blömeke, B. Activation of the Endoperoxide Ascaridole Modulates its Sensitizing Capacity. *TOXICOL SCI* **2015**, *147* (2), 515-523.
187. Garneau, M. *Betulaceae*. In *Flore Nordique du Québec et du Labrador*, Payette, S.; Garneau, M.; Damboise, K., Eds. Presses de l'Université Laval: Québec, 2015; Vol. 2, pp 429-463.
188. DeGroot, W. J.; Thomas, P. A.; Wein, R. W. *Betula nana* L and *Betula glandulosa* Michx. *J. Ecol.* **1997**, *85* (2), 241-264.
189. Rastogi, S.; Pandey, M. M.; Rawat, A. K. S. Medicinal Plants of the Genus *Betula*—Traditional Uses and a Phytochemical—Pharmacological Review. *J Ethnopharmacol* **2015**, *159*, 62-83.
190. Williams, D. E.; Sinclair, A. R. E.; Andersen, R. J. Triterpene Constituents of the Dwarf Birch, *Betula glandulosa*. *Phytochemistry* **1992**, *31* (7), 2321-2324.

191. Manseau, M.; Huot, J.; Crête, M. Effects of Summer Grazing by Caribou on Composition and Productivity of Vegetation: Community and Landscape Level. *J. Ecol.* **1996**, *84* (4), 503-513.
192. Baser, B. H. C.; Demirci, B. Studies on Betula Essential Oils. *ARKIVOC* **2007**, *vii*, 335-348.
193. Baser, K. H. C. Aromatic Biodiversity Among the Flowering Plant Taxa of Turkey. *Pure and Appl. Chem.* **2002**, *74* (4), 527-545.
194. Orav, A.; Arak, E.; Boikova, T.; Raal, A. Essential oil in Betula spp. Leaves Naturally Growing in Estonia. *Biochem. Syst. Ecol.* **2011**, *39* (4-6), 744-748.
195. Pollien, P.; Chaintreau, A. Simultaneous Distillation-Extraction: Theoretical Model and Development of a Preparative Unit. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (16), 3285-3292.
196. Likens, S. T.; Nickerson, G. B. Detection of Certain Hop Oil Constituents in Brewing Products. *A. S. B. C. PROCEEDINGS* **1964**, *22* (1), 5-13.
197. Godefroot, M.; Sandra, P.; Verzele, M. New Method for Quantitative Essential Oil Analysis. *J Chromatogr* **1981**, *203*, 325-335.
198. Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology* **2004**, *135* (4), 1893-1902.
199. Golebiowski, J.; Fernandez, X. Chimie des Substances Odorantes. In *La Chimie des Huiles Essentielles : Tradition et Innovation*, Fernandez, X.; Chémat, F., Eds. Vuibert: Paris, 2012; pp 9-21.
200. Eckardt, N. A. Oxylipin Signaling in Plant Stress Responses. *The Plant Cell* **2008**, *20* (3), 495-497.
201. Matsui, K. Green Leaf Volatiles: Hydroperoxide Lyase Pathway of Oxylipin Metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9* (3), 274-280.
202. Rose, U.; Manukian, A.; Heath, R. R.; Tumlinson, J. H. Volatile Semiochemicals Released from Undamaged Cotton Leaves (A Systemic Response of Living Plants to Caterpillar Damage). *Plant Physiol.* **1996**, *111* (2), 487-495.
203. Vempati, H.; Vaitilingom, M.; Zhang, Z.; Liyana-Arachchi, T. P.; Stevens, C. S.; Hung, F. R.; Valsaraj, K. T. Physico-chemical Properties of Green Leaf Volatiles (GLV) for Ascertaining Atmospheric Fate and Transport in Fog. *Adv. Ecol. Res.* **2018**, *7* (2), 139-159.
204. Demirci, B.; Baser, K. H. C.; Ozek, T.; Demirci, F. Betulenols from Betula species. *Planta Medica* **2000**, *66* (5), 490-493.
205. CNALH Cladonia stellaris (Opiz) Pouzar & Vězda. <https://lichenportal.org/cnalh/taxa/index.php?taxon=cladonia+stellaris&formsubmit=Search+Terms> (accessed 30 novembre 2020).
206. GBIF Secretariat Cladonia stellaris (Opiz) Pouzar & Vezda. <https://www.gbif.org/species/2607712> (accessed 30 novembre 2020).
207. Stenroos, S.; Hyvönen, J.; Myllys, L.; Thell, A.; Ahti, T. Phylogeny of the Genus Cladonia s. lat. (Cladoniaceae, Ascomycetes) Inferred from Molecular, Morphological, and Chemical Data. *Cladistics* **2002**, *18* (3), 237-278.
208. Brodo, I. M.; Ahti, T. Lichens and Lichenicolous Fungi of the Queen Charlotte Islands, British Columbia, Canada. 2. The Cladoniaceae. *Can. J. Bot.* **1996**, *74* (7), 1147-1180.
209. CNALH Stereocaulon paschale (L.) Hoffm. <https://lichenportal.org/cnalh/taxa/index.php?taxon=55617> (accessed 30 novembre 2020).
210. Rankovic, B.; Kosanic, M.; Stanojkovic, T. Stereocaulon paschale Lichen as Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Agent. *Farmacia* **2014**, *62* (2), 306-317.
211. GBIF Secretariat Stereocaulon paschale (L.) Hoffm. <https://www.gbif.org/species/5261384> (accessed 30 novembre 2020).
212. Boudreau, S.; Payette, S. Growth Performance of Cladonia Stellaris Following Caribou Disturbance in Subarctic Québec. *Écoscience* **2004**, *11* (3), 347-355.
213. Kershaw, K. A. The Role of Lichens in Boreal Tundra Transition Areas. *The Bryologist* **1978**, *81* (2), 294-306.
214. Kytoviita, M. M.; Crittenden, P. D. Growth and Nitrogen Relations in the Mat-forming Lichens Stereocaulon paschale and Cladonia stellaris. *Annals of Botany* **2007**, *100* (7), 1537-1545.

215. Pegau, R. E. Growth Rates of Important Reindeer Forage Lichens on the Seward Peninsula, Alaska. *Arctic* **1968**, 255-259.
216. Shukla, V.; Pant Joshi, G.; Rawat, M. S. M. Lichens as a Potential Natural Source of Bioactive Compounds: a Review. *PHYTOCHEM REV* **2010**, 9, 303-314.
217. Musharraf, S. G.; Siddiqi, F.; Ali, A.; Thadhani, V. M. Sensitive Analysis of Bioactive Secondary Metabolites in Lichen Species Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **2017**, 146, 279-284.
218. Smeds, A. I.; KYTÖVIITA, M.-M. Determination of Usnic and Perlatolic Acids and Identification of Olivetoric Acids in Northern Reindeer Lichen (*Cladonia stellaris*) Extracts. *Lichenologist (Lond.)* **2010**, 42 (6), 739-749.
219. Huovinen, K.; Ahti, T. The Composition and Contents of Aromatic Lichen Substances in the Genus *Cladina*. *Ann. Bot. Fenn.* **1986**, 23 (2), 93-106.
220. Falk, A.; Green, T. K.; Barboza, P. Quantitative Determination of Secondary Metabolites in *Cladina stellaris* and other Lichens by Micellar Electrokinetic Chromatography. *J Chromatogr A* **2008**, 1182 (1), 141-144.
221. Carpentier, C. Investigations Phytochimiques de Lichens Soumis au Stress de la Nordicité. Laval University, 2016.
222. Carpentier, C.; Barbeau, X.; Azelmat, J.; Vaillancourt, K.; Grenier, D.; Lague, P.; Voyer, N. Lobaric Acid and Pseudodepsidones Inhibit NF-kappa B Signaling Pathway by Activation of PPAR-gamma. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, 26 (22), 5845-5851.
223. Carpentier, C.; Queiroz, E. F.; Marcourt, L.; Wolfender, J. L.; Azelmat, J.; Grenier, D.; Boudreau, S.; Voyer, N. Dibenzofurans and Pseudodepsidones from the Lichen *Stereocaulon paschale* Collected in Northern Quebec. *J Nat Prod* **2017**, 80 (1), 210-214.
224. Vu, T. H. Étude des Acides Gras du Genre *Stereocaulon* et Étude Phytochimique du Lichen *S. evolutum* *graewe*. Université Rennes 1, France, 2014.
225. Ismed, F. Phytochimie de Lichens du Genre *Stereocaulon*: Étude Particulière de *S. Halei* Lamb et *S. montagneanum* Lamb, Deux Lichens Recoltés en Indonésie. Université Rennes 1, France, 2012.
226. Nguyen, K.-H.; Chollet-Krugler, M.; Gouault, N.; Tomasi, S. UV-protectant metabolites from lichens and their symbiotic partners. *Natural product reports* **2013**, 30 (12), 1490-1508.
227. Lohézic-Le Dévéhat, F.; Legouin, B.; Couteau, C.; Boustie, J.; Coiffard, L. Lichenic Extracts and Metabolites as UV Filters. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2013**, 120, 17-28.
228. Molnár, K.; Farkas, E. Current Results on Biological Activities of Lichen Secondary Metabolites: a Review. *Z. Naturforsch., C* **2010**, 65 (3-4), 157-173.
229. Kosanic, M.; Rankovic, B.; Stanojkovic, T.; Rancic, A.; Manojlovic, N. *Cladonia* Lichens and their Major Metabolites as Possible Natural Antioxidant, Antimicrobial and Anticancer Agents. *LWT-FOOD SCI TECHNOL* **2014**, 59 (1), 518-525.
230. Boustie, J.; Tomasi, S.; Grube, M. Bioactive Lichen Metabolites: Alpine Habitats as an Untapped Source. *PHYTOCHEM REV* **2011**, 10 (3), 287-307.
231. Asplund, J.; Siegenthaler, A.; Gauslaa, Y. Simulated Global Warming Increases Usnic Acid but Reduces Perlatolic Acid in the Mat-Forming Terricolous Lichen *Cladonia Stellaris*. *The Lichenologist* **2017**, 49 (3), 269-274.
232. Nybakken, L.; Julkunen-Tiitto, R. UV-B Induces Usnic Acid in Reindeer Lichens. *Lichenologist (Lond.)* **2006**, 38 (5), 477-485.
233. Bjerke, J. W.; Gwynn-Jones, D.; Callaghan, T. V. Effects of Enhanced UV-B Radiation in the Field on the Concentration of Phenolics and Chlorophyll Fluorescence in Two Boreal and Arctic-Alpine Lichens. *Environ. Exp. Bot.* **2005**, 53 (2), 139-149.
234. Sveshnikova, N.; Yuan, T.; Warren, J. M.; Piercey-Normore, M. D. Development and Validation of a Reliable LC-MS/MS Method for Quantitative Analysis of Usnic Acid in *Cladonia uncialis*. *BMC Res Notes* **2019**, 12 (1), 1-6.
235. Pelletier, M.; Allard, M.; Levesque, E. Ecosystem Changes Across a Gradient of Permafrost Degradation in Subarctic Québec (Tasiapik Valley, Nunavik, Canada). *Arctic Science* **2018**, 5 (1), 1-26.
236. Dixon, W. Processing Data for Outliers. *Biometrics* **1953**, 9 (1), 74-89.

237. International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 1994. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines> (accessed 11 décembre 2020).
238. Thomson, M.; Ellison, S.; Wood, R. Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem* **2002**, 74 (5), 835.
239. European Commission Directorate-general for Health and Food Safety. Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. *SANTE/12682/2019* **2020**.
240. Skoog, D. A. H., F. J.; Crouch S. R. *Principles of Instrumental Analysis*. 6th ed.; Thomson Brooks/Cole: Belmont, 2007.
241. Bombuwela, K.; Kathirgamanathar, S.; Thadhani, V.; Jayalal, R.; Adikaram, N.; Wijesundara, D.; Andersen, R.; Wolseley, P.; Karunaratne, V. Chemistry of *Heterodermia microphylla*, a lichen new to Sri Lanka. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* **2008**, 36 (3).
242. Wong, C.; Ballegooyen, K.; Ignace, L.; Johnson, M. J.; Swanson, H.; Boran, I. Towards Reconciliation: 10 Calls to Action to Natural Scientists Working in Canada. *FACETS* **2020**, 5 (1), 769-783.