

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTE À

L'UNIVERSITE DU QUEBEC À CHICOUTIMI

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN RESSOURCES RENOUVELABLES

PAR

MARTINE LESSARD

B. Sc. BIOCHIMIE

CARACTERISATION DES PRODUITS NATURELS ODORANTS

RETROUVES DANS LES LICHENS DE GENRE *USNEA* ET

*BRYORIA* DE LA REGION DU MONT APICA, QUEBEC

SEPTEMBRE 1990



### Mise en garde/Advice

Afin de rendre accessible au plus grand nombre le résultat des travaux de recherche menés par ses étudiants gradués et dans l'esprit des règles qui régissent le dépôt et la diffusion des mémoires et thèses produits dans cette Institution, **l'Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** est fière de rendre accessible une version complète et gratuite de cette œuvre.

Motivated by a desire to make the results of its graduate students' research accessible to all, and in accordance with the rules governing the acceptance and diffusion of dissertations and theses in this Institution, the **Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)** is proud to make a complete version of this work available at no cost to the reader.

L'auteur conserve néanmoins la propriété du droit d'auteur qui protège ce mémoire ou cette thèse. Ni le mémoire ou la thèse ni des extraits substantiels de ceux-ci ne peuvent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

The author retains ownership of the copyright of this dissertation or thesis. Neither the dissertation or thesis, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

## RESUME

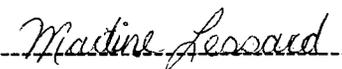
L'analyse des extraits odorants des lichens *Usnea filipendula* (Stirton), *Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik) et *Bryoria furcellata* (Fr.) obtenus par hydrodistillation, hydrodiffusion et par des extractions aux solvants a été effectuée à l'aide des indices de Kovat et par la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire couplée à la spectrométrie de masse.

La caractérisation des huiles essentielles et des essences concrètes révèle la présence de composés monoterpéniques, aldéhydiques, cétoniques, alcooliques, phénoliques, carboxyliques, amidés, de même que des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques. L'analyse qualitative des métabolites secondaires des deux populations de lichens fruticuleux démontre, quant à elle, la prédominance de depsides et depsidones de la série bêta-orcinol.

L'effet de traitements physiques d'humidification effectués sur des matières sèches permet d'accroître la perméabilité des membranes cellulaires et de compenser la difficulté de diffusion de l'huile ou de pénétration par les solvants. En outre, l'étude démontre l'obtention de rendements supérieurs et une meilleure qualité de l'huile extraite.

Sur le plan quantitatif, la composition relative des constituants identifiés dans les huiles essentielles et les essences concrètes assure une différenciation distincte des lichens de genre *Usnea* et *Bryoria*.

L'échantillonnage de la matière première au sein d'une même région permet de constater une modification de la composition et du rendement en huile essentielle suivant la saison pendant laquelle le lichen s'est développé. En effet, l'analyse de la variation saisonnière révèle l'importance de la température comme facteur de contrôle du taux de concentration des constituants des huiles essentielles d'*Usnea* et *Bryoria*.



Martine Lessard



Michel J. Gagnon

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très sincèrement, monsieur Michel J. Gagnon qui, à titre de directeur académique, m'a apporté tout le support logistique et financier pour la réalisation de ce mémoire. Les commentaires et l'entière disponibilité du Dr Gagnon lors de l'identification des composés par spectrométrie de masse ont également été des plus appréciés.

Un remerciement particulier s'adresse au Dr Guy Collin et à son assistante de recherche, France-Ida Jean, pour m'avoir offert leur assistance et leurs connaissances lors de l'élaboration des protocoles d'extraction par entraînement à la vapeur et par hydrodiffusion. Je leur suis également reconnaissante de m'avoir permis d'utiliser leurs systèmes de chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

J'offre également mes remerciements à Claude Roy, technicien en sciences naturelles de l'Herbier Louis-Marie de l'Université Laval pour sa collaboration dans l'identification des lichens, de même qu'à la maison Robertet & Cie de Grasse pour l'évaluation des principes odorants de la matière première et à monsieur Chicita F. Culberson pour la fourniture des contrôles atranorine et acide norstictique utilisés en chromatographie sur couche mince.

Plusieurs personnes m'ont accompagné lors des périodes d'échantillonnages. J'offre donc mes sincères remerciements à Michel J. Gagnon, Jean-Marie Lapierre, Jean Côté, Nathalie Bouchard, Pascal Langlois et mon père Robert Lessard. Enfin, un merci spécial est accordé à Jean Côté et à Rémy Larouche pour leur assistance lors de la réalisation des travaux en laboratoire et leurs précieux conseils.

Des remerciements vont également à la Fondation Asselin et au Programme d'aide institutionnelle à la recherche (PAIR) pour m'avoir fourni un appui financier au cours de l'année 1989-90.

## AVANT-PROPOS

Une partie de ce travail a été présentée au 58<sup>e</sup> congrès annuel de  
l'Association canadienne-française pour l'avancement des sciences,  
Québec, 14-18 mai, 1990.

## TABLE DES MATIERES

	page
RESUME .....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
AVANT-PROPOS .....	iv
TABLE DES MATIERES.....	v
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
ANNEXE .....	x
CHAPITRE I: INTRODUCTION .....	1
1.1 Principes odorants des lichens.....	2
1.2 Objectifs du travail .....	6
CHAPITRE II: MATERIEL ET METHODES .....	9
2.1 Espèces de lichens.....	10
2.2 Echantillonnage.....	15
2.3 Extraction.....	18
2.3.1 Par entraînement à la vapeur.....	18
2.3.2 Par hydrodiffusion .....	22
2.3.3 Par les solvants volatils .....	22
2.4 Techniques analytiques .....	24
2.4.1 Chromatographie en phase gazeuse .....	24
2.4.2 Spectrométrie de masse .....	26
2.4.3 Chromatographie sur couche mince .....	28
2.4.4 Chromatographie liquide à haute performance.....	29
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION .....	32
3.1 Traitements physiques .....	33
3.2 Remarques techniques d'extraction .....	34
3.2.1 Entraînement à la vapeur versus solvants volatils.....	34
3.2.2 Hydrodistillation versus hydrodiffusion.....	34

3.3	Analyse qualitative .....	37
3.3.1	De l'huile essentielle.....	37
3.3.1.1	<i>Usnea filipendula</i> (Stirton) .....	37
3.3.1.2	<i>Bryoria nadvornikiana</i> (Gyelnik) et <i>Bryoria furcellata</i> (Fr.).....	42
3.3.2	Des essences concrètes.....	46
3.3.2.1	<i>Usnea filipendula</i> (Stirton) .....	46
3.3.2.2	<i>Bryoria nadvornikiana</i> (Gyelnik) et <i>Bryoria furcellata</i> (Fr.).....	50
3.3.3	De métabolites secondaires .....	54
3.3.3.1	<i>Usnea filipendula</i> (Stirton) .....	54
3.3.3.2	<i>Bryoria nadvornikiana</i> (Gyelnik) et <i>Bryoria furcellata</i> (Fr.).....	57
3.4	Analyse quantitative.....	61
3.4.1	Composition relative de l'huile essentielle.....	61
3.4.1.1	<i>Usnea filipendula</i> (Stirton) .....	61
3.4.1.2	<i>Bryoria nadvornikiana</i> (Gyelnik) et <i>Bryoria furcellata</i> (Fr.).....	61
3.4.2	Composition relative des essence concrètes .....	67
3.4.2.1	<i>Usnea filipendula</i> (Stirton) .....	67
3.4.2.2	<i>Bryoria nadvornikiana</i> (Gyelnik) et <i>Bryoria furcellata</i> (Fr.).....	70
3.4.3	Variation saisonnière de l'huile essentielle.....	73
3.4.3.1	<i>Usnea filipendula</i> (Stirton) .....	73
3.4.3.2	<i>Bryoria nadvornikiana</i> (Gyelnik) et <i>Bryoria furcellata</i> (Fr.).....	77
CHAPITRE IV:	CONCLUSION .....	81
BIBLIOGRAPHIE.....		84
ANNEXE .....		90

## LISTE DES FIGURES

	page
Figure 1: Structures chimiques générales des depsides et depsidones.....	4
Figure 2: Sentier métabolique probable pour les composés depsidiques.....	5
Figure 3: Principaux constituants présents dans la mousse de chêne et l'odeur éventuelle de ces derniers .....	7
Figure 4: Photo des lichens fruticuleux de genre <i>Usnea filipendula</i> , <i>Bryoria nadvornikiana</i> et <i>Bryoria furcellata</i> échantillonnés.....	11
Figure 5: Schéma d' <i>Usnea filipendula</i> (Stirton).....	12
Figure 6: Schéma de <i>Bryoria nadvornikiana</i> (Gyelnik) et de <i>Bryoria furcellata</i> (Fr.).....	14
Figure 7: Localisation générale du secteur d'échantillonnage.....	16
Figure 8: Localisation des deux sites d'échantillonnage des lichens.....	17
Figure 9: Schéma du protocole d'extraction par entraînement à la vapeur .....	19
Figure 10: Schéma de l'entraînement à la vapeur.....	21
Figure 11: Schéma de l'hydrodiffusion.....	23
Figure 12: Chromatogrammes typiques des extraits d' <i>Usnea filipendula</i> obtenus par hydrodistillation (A) et hydrodiffusion (B).....	35
Figure 13: Chromatogrammes typiques des extraits de <i>Bryoria nadvornikiana</i> et de <i>Bryoria furcellata</i> obtenus par hydrodistillation (A) et hydrodiffusion (B).....	36
Figure 14: Chromatogramme de l'huile essentielle d' <i>Usnea filipendula</i> analysée en CG-Cap .....	38
Figure 15: Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>Bryoria nadvornikiana</i> et <i>Bryoria furcellata</i> analysée en CG-Cap.....	43
Figure 16: Chromatogrammes des essences concrètes d' <i>Usnea filipendula</i> extraites à partir du toluène (A) et de l'éther diéthylique (B) analysées en CG-Cap.....	47

Figure 17: Chromatogrammes des essences concrètes de <i>Bryoria nadvornikiana</i> et <i>Bryoria furcellata</i> extraites à partir du toluène (A) et de l'éther diéthylique (B) analysées en CG-Cap .....	51
Figure 18: Chromatogramme de l'extrait d' <i>Usnea filipendula</i> obtenu par chromatographie liquide à haute performance phase renversée.....	56
Figure 19: Chromatogramme de l'extrait de <i>Bryoria nadvornikiana</i> et <i>Bryoria furcellata</i> obtenu par chromatographie liquide à haute performance phase renversée.....	60
Figure 20: Variation saisonnière de la concentration de divers composants présents dans l'huile essentielle d' <i>Usnea filipendula</i> .....	75
Figure 21: Variation saisonnière de la concentration de divers composants présents dans l'huile essentielle de <i>Bryoria nadvornikiana</i> et <i>Bryoria furcellata</i> .....	78

## LISTE DES TABLEAUX

	page
Tableau I: Conditions d'analyse de la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.....	25
Tableau II: Conditions d'analyse de la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire couplée à la spectrométrie de masse .....	27
Tableau III: Conditions d'analyse de la chromatographie liquide à haute performance phase renversée.....	31
Tableau :IV Composants identifiés dans l'huile essentielle d' <i>Usnea filipendula</i> .....	39
Tableau V: Composants identifiés dans l'huile essentielle de <i>Bryoria nadvornikiana</i> et <i>Bryoria furcellata</i> .....	44
Tableau VI: Composants identifiés dans les essences concrètes d' <i>Usnea filipendula</i> .....	48
Tableau VII: Composants identifiés dans les essences concrètes de <i>Bryoria nadvornikiana</i> et <i>Bryoria furcellata</i> .....	52
Tableau VIII: Composés polyphénoliques identifiés dans <i>Usnea filipendula</i> .....	55
Tableau IX: Composés polyphénoliques identifiés dans <i>Bryoria nadvornikiana</i> et <i>Bryoria furcellata</i> .....	59
Tableau X: Composition relative de l'huile essentielle d' <i>Usnea filipendula</i> .....	62
Tableau XI: Composition relative de l'huile essentielle de <i>Bryoria nadvornikiana</i> et <i>Bryoria furcellata</i> .....	65
Tableau XII: Composition relative des essences concrètes d' <i>Usnea filipendula</i> .....	68
Tableau XIII: Composition relative des essences concrètes de <i>Bryoria nadvornikiana</i> et <i>Bryoria furcellata</i> .....	71
Tableau XIV: Composants quantifiés dans l'huile essentielle d' <i>Usnea filipendula</i> ....	76
Tableau XV: Composants quantifiés dans l'huile essentielle de <i>Bryoria nadvornikiana</i> et <i>Bryoria furcellata</i> .....	79

## ANNEXE

	page
Annexe I: Chromatogramme d'un extrait d'huile essentielle obtenu à partir des deux genres de populations de lichens recueillis .....	90

## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION**

## 1.1 Principes odorants des lichens

L'utilisation des lichens comme matière odorante naturelle remonte aux civilisations anciennes. Les Egyptiens, par exemple, se servaient de la mousse de chêne (*Evernia prunastri*) pour parfumer les objets les plus divers, pour la fabrication du pain et l'embaumement des corps (Seu-Salerno et Blakeway, 1987). Au Moyen Age, cette mousse était employée pour la préparation de poudres odorantes et dans le traitement des voies respiratoires. Son efficacité comme médicament peut s'expliquer par sa teneur en composés phénoliques (Stoll et Scherrer, 1937).

De nos jours, les lichens sont très recherchés dans la parfumerie pour la fabrication d'essences concrètes. Ils possèdent une odeur fraîche de verdure et sont couramment employés dans la composition de parfums genre fougère, chypre et de fantaisie, lesquels sont utilisés dans des produits cosmétiques comme eau de cologne, lotion, savon de toilette, détergent ou encore comme fixatif (Bassiri, 1960; Adachi, 1983; Arctander, 1960; D'Astous, 1989).

Malgré l'usage ancien de la mousse comme matière première, ce n'est qu'au XIX<sup>e</sup> siècle que son essence concrète a fait l'objet de travaux scientifiques (Stoll et Scherrer, 1937). Les lichens, association symbiotique d'algues et de champignons, ont une composition très complexe et contiennent, entre autres substances, des dérivés phénoliques d'acide carboxylique. Lors de l'emmagasinage et du traitement des lichens, les composés phénoliques qu'ils contiennent se dégradent pour donner une odeur chyprée, c'est-à-dire une odeur complexe, riche et subtile ayant en fond une légère odeur de sous-bois. En effet, étant très résistants, les lichens doivent être séchés pendant au moins quatre mois, avant qu'une modification de leur métabolisme ne provoque une dégradation des depsides et / ou depsidones (Seu-Salerno et Blakeway, 1987; Naves, 1974; Racine *et al.*, 1980). Lors du développement des différents principes odorants, les depsides, des molécules possédant au moins deux cycles aromatiques de six atomes de carbone

reliés par un groupe ester sur lesquels sont attachés divers substituants chimiques (très souvent des groupes hydroxyles), sont dissociés notamment en molécules n'ayant qu'un seul cycle aromatique. Les depsidones présentent une structure chimique similaire à celle des depsides, mais en plus du lien ester, ils possèdent une liaison étherée entre les deux unités monocycliques. La figure 1 présente les structures chimiques générales des depsides et depsidones. Ces substances phénoliques joueront avant tout un rôle de fixateurs et donneront aux parfums une note chaude. Au même moment, la dégradation qui résulte selon les cas de l'hydrolyse et de l'alcoolyse produit des composants volatils plus ou moins simples avec des terpènes variés, c'est-à-dire des hydrocarbures de formule brute  $C_{10}H_{16}$  (Seu-Salerno et Blakeway, 1987). Lors de l'extraction de l'essence concrète et d'une humidification, un second développement de la matière première s'effectue. De nouvelles hydrolyses et alcoolyses des ponts depsidiques surviennent en réaction avec les alcools présents (Seu-Salerno et Blakeway, 1987; Stoll et Scherrer, 1937).

Du point de vue quantitatif, les composés depsidiques et les dérivés monoaryliques représentent un très fort pourcentage de la fraction acide, plus de 95% dans les extraits d'*Evernia prunastri* (Tabacchi et Nicollier, 1979). Ces composés depsidiques, qui forment un vaste groupe parmi les métabolites secondaires des lichens, se subdivisent en dérivés de l'orcinol ou du bêta-orcinol (figure 2). Il est en effet généralement admis que ces composés, biosynthétisés par le lichen d'après la voie acétate-polymalonate, donnent lieu, par estérification intermoléculaire de deux ou trois unités identiques ou analogues, aux deux grandes classes de depsides possédant la structure de base d'un benzoate de phényle (Nicollier et Tabacchi, 1976; Elix et al., 1984; Nicollier et al., 1978). Les composés polyphénoliques possèdent des masses moléculaires élevées et ne peuvent donc être responsables de l'odeur des lichens. Cependant, leur décomposition par hydrolyse, alcoolyse et décarboxylation produit des composés monoaryliques légers qui possèdent des propriétés odoriférantes (Tabacchi et Nicollier, 1979; Ter Heide et al., 1975).

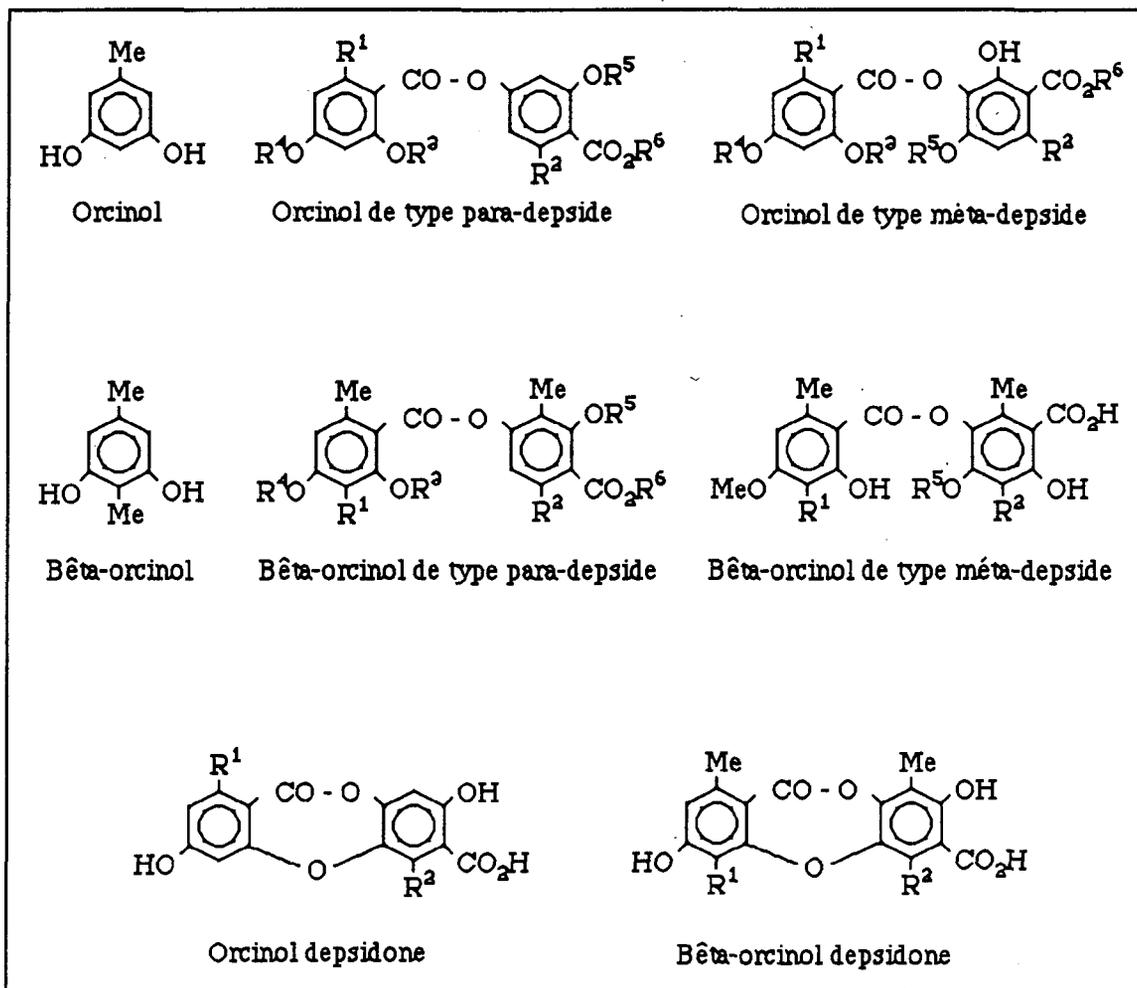


Figure 1: Structures chimiques générales des depsides et depsidones.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Elix, J.A.; Sargent, M.V.; Shimizu, Y.; Taylor, D.A.H.; Whitton, A.A., (1984).

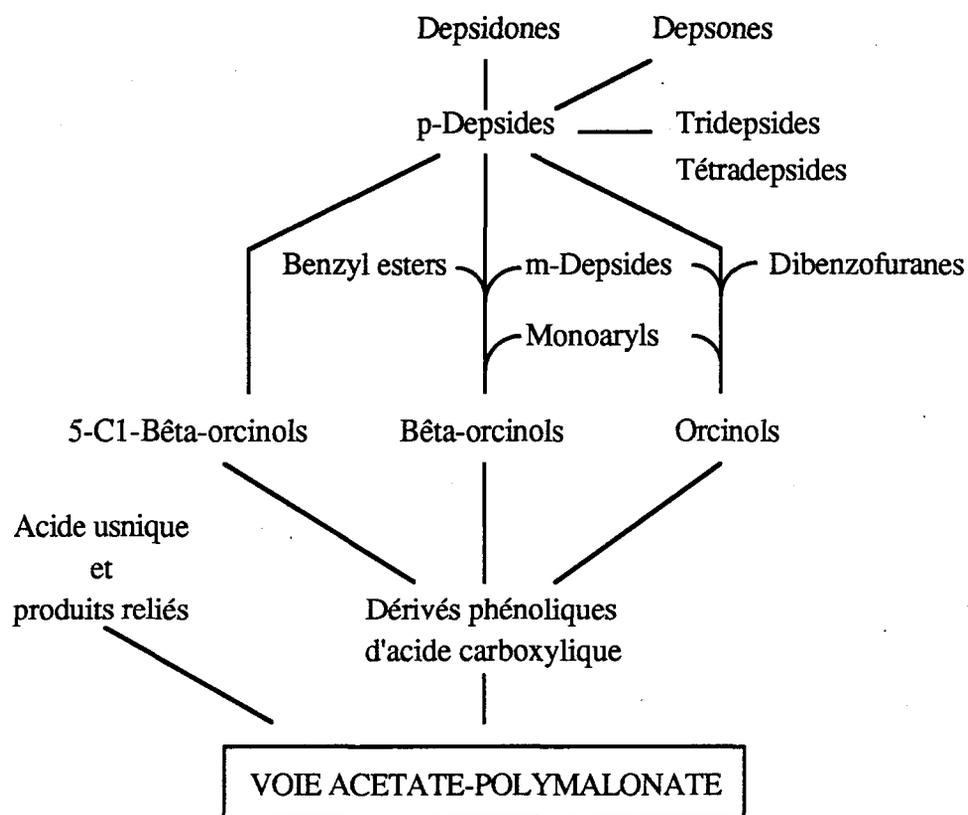


Figure 2: Sentier métabolique probable pour les composés depsidiques.<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Culberson, C.F.; Culberson, W.L.; Jonhson, A., (1977).

En plus des dérivés depsidiques, plusieurs auteurs (Stoll et Scherrer, 1937; Gavin et al., 1978; Seu-Salerno et Blakeway, 1987) ont identifié dans les lichens des substances plus ou moins volatiles soit des monoterpènes, monoterpènes oxygénés, sesquiterpènes, aldéhydes, cétones, hydrocarbures aromatiques et aliphatiques, présents en faible quantité, mais qui contribuent d'une manière importante à la reproduction de l'odeur spécifique des essences concrètes.

L'absolue mousse de chêne constitue un produit de base important en parfumerie moderne, en raison de ses caractères odorants très tenaces et peu volatils (Seu-Salerno et Blakeway, 1987). La spécificité olfactive particulière des extraits de mousse de chêne est reliée à la majeure partie des constituants volatils de l'acide évernique et autres produits de dégradation des depsides contenus dans le lichen *Evernia prunastri* (Seu-Salerno et Blakeway, 1987). La figure 3 présente divers composants identifiés dans la mousse de chêne avec leurs propriétés odorantes.

## 1.2 Objectifs du travail

La composition chimique des extraits de lichens (*Evernia prunastri*) récoltés sur différentes espèces du genre *Quercus* (communément appelé chêne) a fait l'objet de plusieurs travaux. Par contre, la caractérisation des constituants des espèces *Usnea filipendula* (Stirton), *Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik) et *Bryoria furcellata* (Fr.) signalée dans la littérature, ne donne qu'une image très partielle de la complexité de ce produit naturel. En effet, les études sur la composition chimique de ces lichens fruticuleux se limitent à la mise en évidence des composés polyphénoliques lourds (depsides, depsidones). Aucune étude systématique des extraits potentiellement odorants n'a jamais été réalisée pour les populations vivants sur les conifères des forêts du Québec. C'est donc dans l'optique d'une meilleure connaissance des substances naturelles de ces espèces que la présente étude a pris forme.

Monoterpènes oxygénés	Sesquiterpènes
1,8 cinéole (eucalyptus) Alpha thuyone (herbal, épicé) Bêta thuyone (herbal, épicé) Camphre (camphré) Linalol (floral) Alcool fenchylique (floral) Terpinène-4 ol (floral, lilas) Bornéol (camphré) Alpha terpinéol (épicé) Thymol (épicé) Transpinocarvéol (pin) Acétate de bornyle (pas d'odeur) Isophytol (menthe) Carvone (violette) Menthe cerpue (spearment) Alpha et bêta ionone (violette, floral) Dihydrocarvone (menthe)	Bêta élémène Alpha copaène Bêta gurjunène Bêta caryophyllène (boisé, pin) Longifolène (boisé, cèdre) Bêta humulène Alpha murolène Bêta sélinène Farnésane Alpha guaiène (boisé, balsamique)
Monoterpènes	Cétones
Alpha pinène (boisé) Bêta pinène (boisé) Camphène (boisé) Myrcène (boisé) Limonène (hespéridé) Cymène (pin) Gamma terpinène (pin)	Méthyl-6 heptanone-2 (inconnu en parfumerie) Méthyl-6 heptène-5 one-2 (inconnu en parfumerie) Diméthyl-4,6 octanone-3 (inconnu en parfumerie) Cis-2,6 trans-2 alpha-2 irone (floral) Trans-2,6 trans-2 alpha-2 irone (violette) Acétophénone (floral) Paraméthylacétophénone (floral, amande) Valérophénone (floral, fruité)
Aldéhydes	Produits de dégradation des depsides
n-Octanal (gras) n-Nonanal (gras, floral) n-Décanal (orange) n-Undécanal (floral, citron) Benzaldéhyde (amande amère) Diméthyl-2,5 benzaldéhyde Ethyl-1 pyrrole-2 carboxaldéhyde I-Iso amyl pyrrole-2 carboxaldéhyde	Ether monométhylque d'orcino (odeur sèche, boisée, goudronnée, rappelant la noix) Ester méthylque de l'acide orsellinique (forte odeur de mousse) Ester méthylque d'acide éverninique (odeur terreuse, moisie, rappelant la noix et la mousse humide) Ester éthylique d'acide éverninique (odeur boisée, rappelant la noix, caractère terreux, mousseux, avec une odeur sèche particulière)

Figure 3: Principaux constituants présents dans la mousse de chêne et l'odeur éventuelle de ces derniers.<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Seu-Salemo, M.; Blakeway, J., (1987).

Les objectifs de ce travail consistaient:

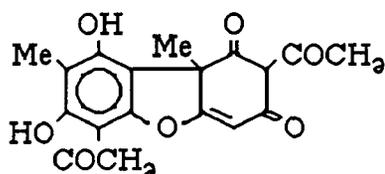
1. à étudier la qualité de l'huile essentielle, c'est-à-dire ses composants et son rendement, lors de traitements physiques tels l'hydratation à la vapeur ou à l'eau tiède.
2. à caractériser les principes odorants, extraits par entraînement à la vapeur, hydrodiffusion ou par les solvants organiques, au moyen de la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire et de la spectrométrie de masse.
3. à identifier le contenu en composés phénoliques lourds par chromatographie sur couche mince et chromatographie liquide à haute performance, phase renversée.
4. à définir la composition relative des composants identifiés dans l'huile essentielle et les essences concrètes.
5. à déterminer la variation de la concentration des constituants majeurs de l'huile essentielle en fonction des saisons au sein d'une même région.

## **CHAPITRE II**

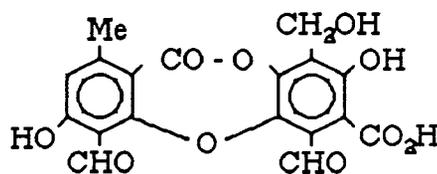
### **MATERIEL ET METHODES**

## 2.1 Espèces de lichens

Les lichens fruticuleux récoltés appartiennent au genre *Usnea* et *Bryoria* (figure 4). Le lichen verdâtre (figure 5) *Usnea filipendula* Stirton (synonyme *Usnea dasypoga* auct.) est très répandu dans les régions montagneuses boréales et croît surtout sur les conifères de forêts ouvertes (Thomson, 1984; Ozenda et Clauzade, 1970). Ce lichen possède une base de fixation courte, noirâtre, d'où partent plusieurs ramifications principales nettement pendantes, parallèles, atteignant de 6 à 30 cm de long, et portant des ramules (de 2e ordre) plus ou moins dirigées à angle droit (Frey, 1970). Les branches principales sont, de façon générale, plus foncées que les ramifications secondaires (Brodo, 1981) et d'une épaisseur de l'ordre de 1 mm (Thomson, 1984; Ozenda et Clauzade, 1970). La surface des rameaux et ramules est très variable, plus ou moins lisse et recouverte de papilles, isidies, soralies ou fibrilles (Frey, 1970). *Usnea filipendula* contient de l'acide usnique et de l'acide salazinique (Hale, 1979; Thomson, 1984).



Acide usnique



Acide salazinique

Le lichen brunâtre appartient à deux espèces. La majorité de la récolte correspond à *Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik) Brodo et D. Hawksw., le reste à *Bryoria furcellata* (Fr.) Brodo et D. Hawksw. La première espèce est distribuée dans les forêts boréales de l'Amérique du Nord. Ce lichen (figure 6) peut croître sur les arbres tels: *Betula*, *Picea*, *Abies*, *Spruce* aussi bien que sur la surface de rochers (Brodo et Hawksworth,



Figure 4: Photo des lichens fruticuleux de genre *Usnea filipendula*, *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata* échantillonnés.

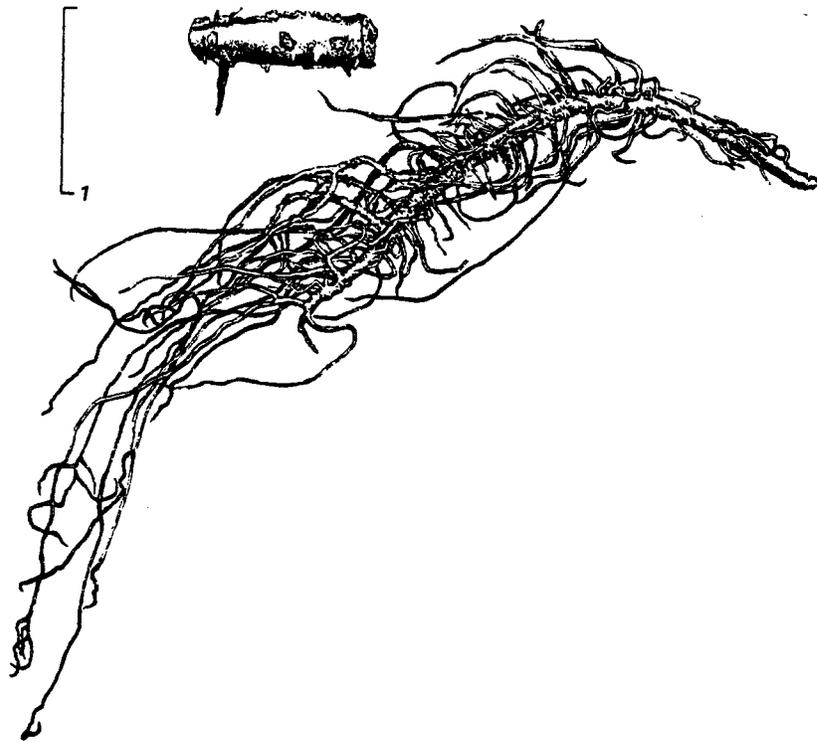
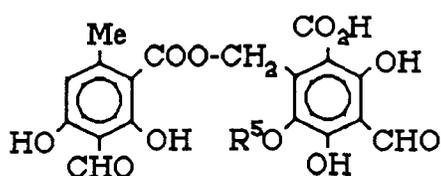


Figure 5: Schéma d'*Usnea filipendula* (Stirton).<sup>4</sup>

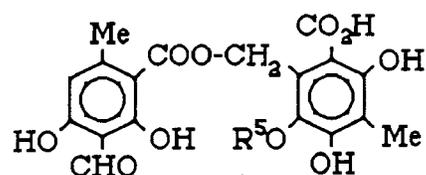
---

<sup>4</sup> Thomson, J.W., (1984).

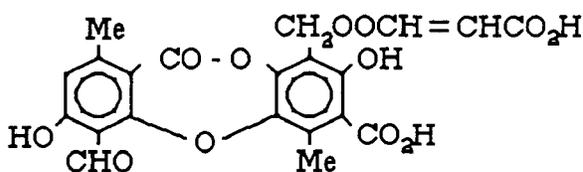
1977; Thomson, 1984). Les thalles pendants, plus ou moins souples et allongés en forme de crinière, atteignent de 4 à 9 cm de longueur. Les rameaux n'ayant pas 1 mm d'épaisseur même à la base sont le plus souvent à peu près parallèles et dépourvus de petites ramifications. Lorsque présentes, ces dernières sont courtes et grêles (Ozenda et Clauzade, 1970). *Bryoria nadvornikiana* contient de l'acide barbatolique, de faibles concentrations d'acide alectorialique et d'acide fumarprotocétrarique et des traces d'atranorine et de chloroatranorine (Thomson, 1984; Brodo et Hawksworth, 1977).



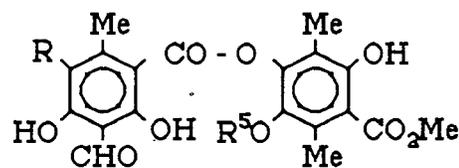
Acide barbatolique



Acide alectorialique



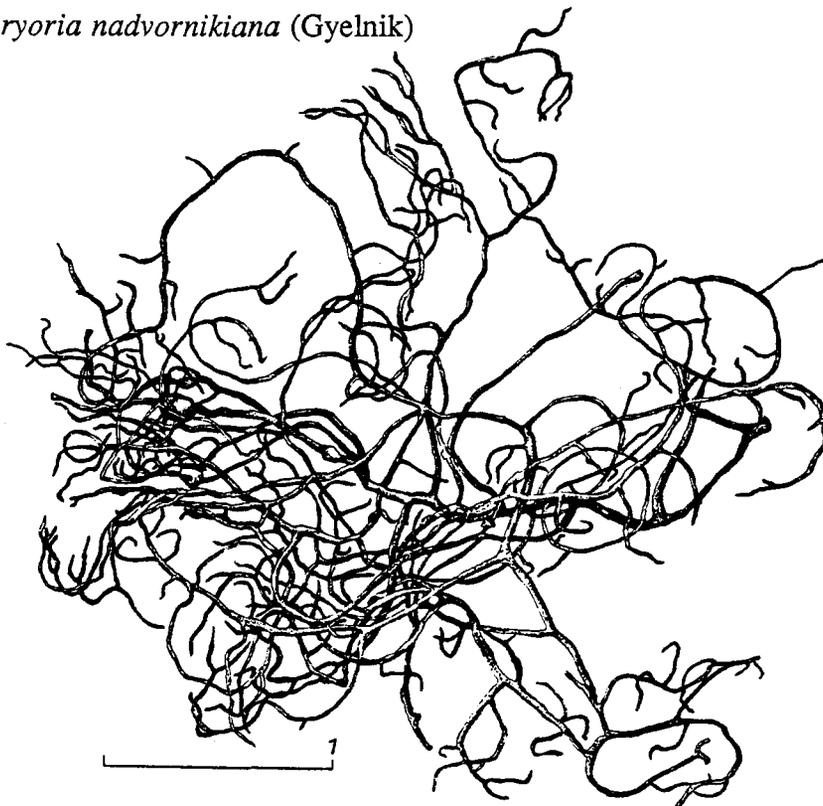
Acide fumarprotocétrarique



R=H Atranorine  
R=Cl Chloroatranorine

*Bryoria furcellata* (figure 6) est une espèce très commune de l'est de l'Amérique du Nord et croît surtout sur les conifères en milieu ouvert (Hale, 1979; Brodo et Hawksworth, 1977). Les thalles buissonnants, de 4 à 10 cm, plutôt durs au toucher, sont irrégulièrement ramifiés et presque aussi larges que longs. Les branches sont recouvertes par endroits de plaques de sorédies elliptiques mêlées d'isidies spinuliformes, c'est-à-dire de spores (Brodo, 1981). Cette espèce contient de l'acide fumarprotocétrarique (Brodo et Hawksworth, 1977).

*Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik)



*Bryoria furcellata* (Fr.)



Figure 6: Schéma de *Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik)<sup>5</sup> et de *Bryoria furcellata* (Fr.).<sup>6</sup>

<sup>5</sup> Thomson, J.W., (1984).

<sup>6</sup> Hale, M.E., (1979).

## 2.2 Échantillonnage

La matière première a été recueillie dans le secteur du lac Bonjour, près du mont Apica, dans la réserve faunique des Laurentides (figure 7). Ce parc, de vaste étendue forestière d'une superficie de 9663 km<sup>2</sup>, sépare le Saguenay-Lac-Saint-Jean de la région de Québec (Fédération québécoise de la montagne, 1979). L'assise rocheuse montagnaise, les dépôts glaciaires et le climat boréal particuliers de ce territoire conditionnent le développement d'une végétation à prédominance résineuse, dans laquelle se retrouvent principalement des forêts d'épinettes noires (*Picea mariana*), d'épinettes blanches (*Picea glauca*) et de sapins baumiers (*Abies balsamea*).

Les deux sites d'échantillonnage sont situés entre 71°26' et 71°30' de longitude ouest et entre 47°56' et 48°01' de latitude nord (figure 8). La strate arborescente peuplant le territoire échantillonné est composée majoritairement d'*Abies balsamea* et de quelques espèces dispersées de *Picea mariana*. Le drainage du terrain était généralement bon à tous les endroits et tout le secteur a été touché par une épidémie de la tordeuse des bourgeons aux alentours des années 1979-80 (Réjean Gagnon, communication personnelle). Les lichens croissent donc en milieu ouvert sur des branches défoliées et sur des troncs morts, souvent allongés au sol.

La cueillette a été effectuée, suivant les périodes saisonnières, de manière aléatoire simple, sur des superficies variant de 900 m<sup>2</sup> à 2000 m<sup>2</sup>, de manière à ce que les échantillons soient représentatifs, qu'ils reflètent les diverses populations de lichen fruticuleux, *Bryoria* en particulier. Les récoltes ont eu lieu, le 21 octobre 1988 et les 12 février, 28 mai, 18 août, 26 novembre 1989. Au moment de la récolte, les lichens ont été

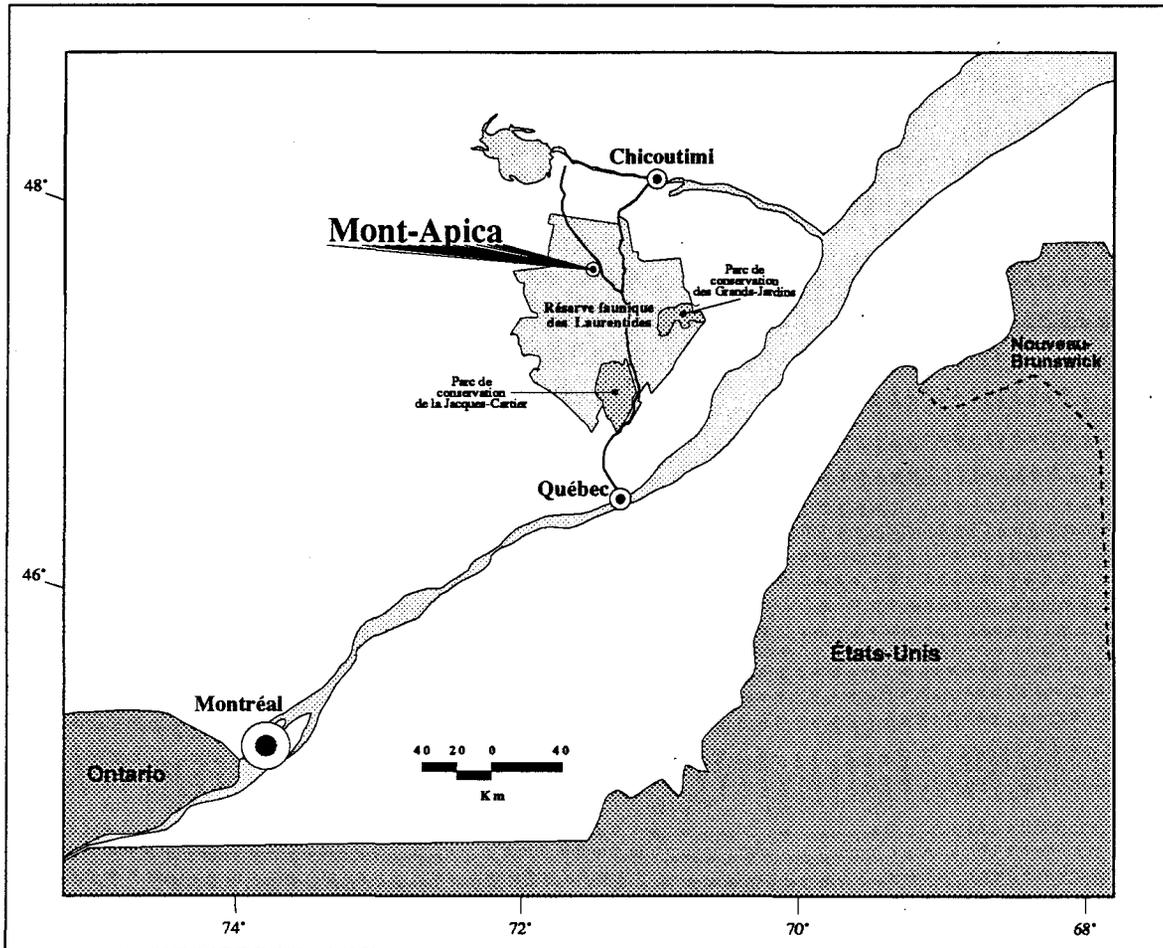


Figure 7: Localisation générale du secteur d'échantillonnage.

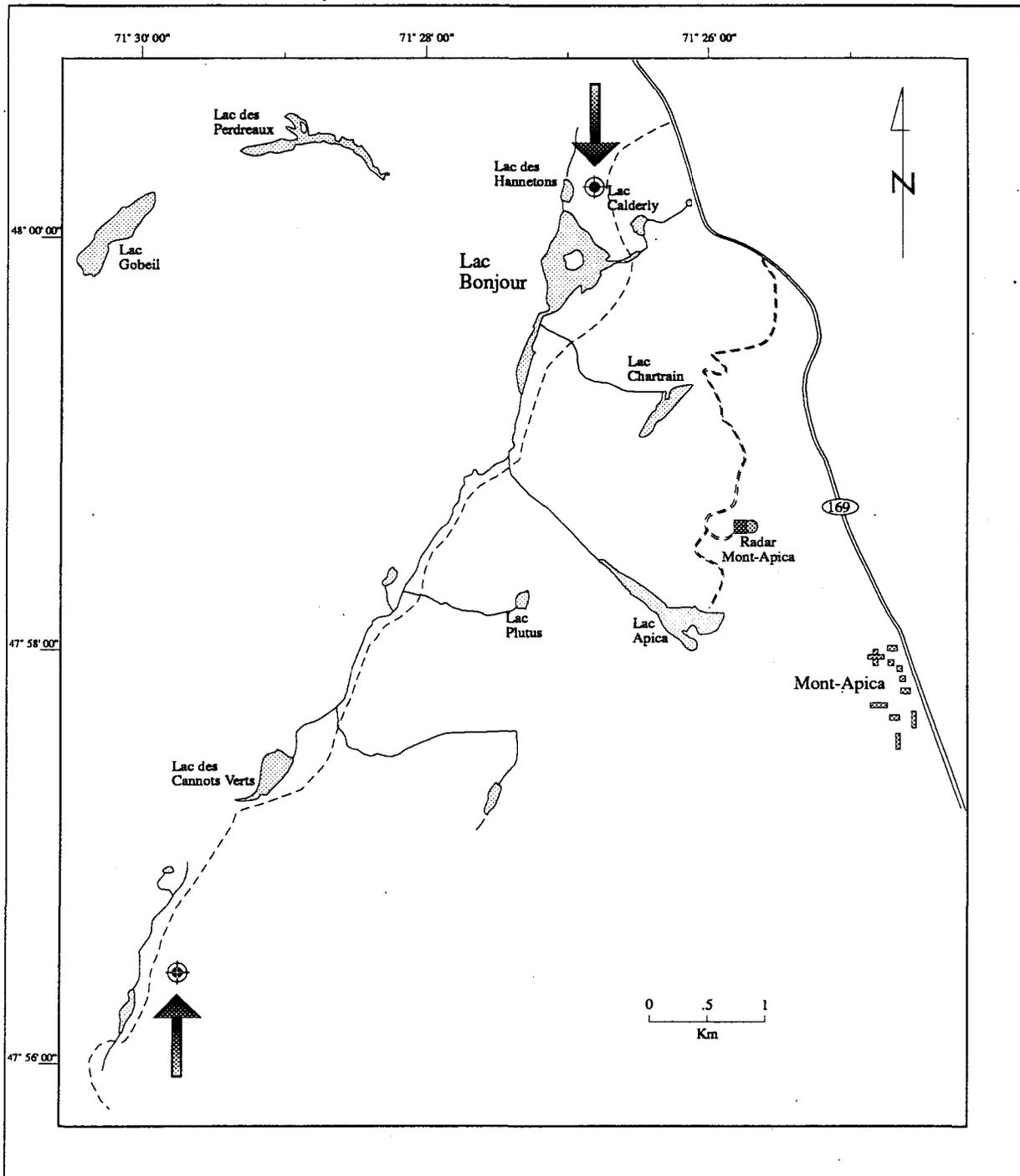


Figure 8: Localisation des deux sites d'échantillonnage des lichens.

placés dans des boîtes de carton et entreposés à température ambiante (20-25 °C) pendant un minimum de 16 semaines.

## 2.3 Extraction

Après la récolte, le lichen débarrassé de divers artéfacts a été trié d'après son genre: *Usnea*, *Bryoria* et coupé en fragment de 2 à 5 mm. Cette dernière étape de fractionnement de la matière à extraire facilite le contact avec la vapeur d'eau ou le solvant, permet d'augmenter la charge de l'extracteur et de réduire le rapport de solvant.

### 2.3.1 Par entraînement à la vapeur

L'huile essentielle a été extraite principalement par entraînement à la vapeur d'eau. Un résumé du protocole d'expérimentation est présenté à la figure 9. Afin d'accroître la perméabilité des membranes cellulaires (Naves, 1974) et d'augmenter encore la quantité de produits odorants par de nouvelles étapes d'hydrolyse et d'alcoolyse (Seu-Salerno et Blakeway, 1987) lors d'extraction de végétaux séchés, divers traitements physiques d'humidification ont été étudiés. Un premier test consistait à immerger les lichens durant 90 minutes avant l'extraction dans un volume de 3 litres d'eau tiède (50 °C) et déminéralisée. Un second traitement, après la charge de matière première dans un ballon de verre à tubulures d'une capacité de 5000 mL, consistait à y injecter de la vapeur, puis à introduire l'eau déminéralisée pour fin de distillation. Finalement, le dernier essai n'impliquait aucun traitement préalable d'humidification. Les conditions expérimentales de distillation sont les suivantes:

- masse de lichens secs (coupés) dans l'alambic 200 g
- volume d'eau (déminéralisée) dans le ballon générateur de vapeur 3000 mL

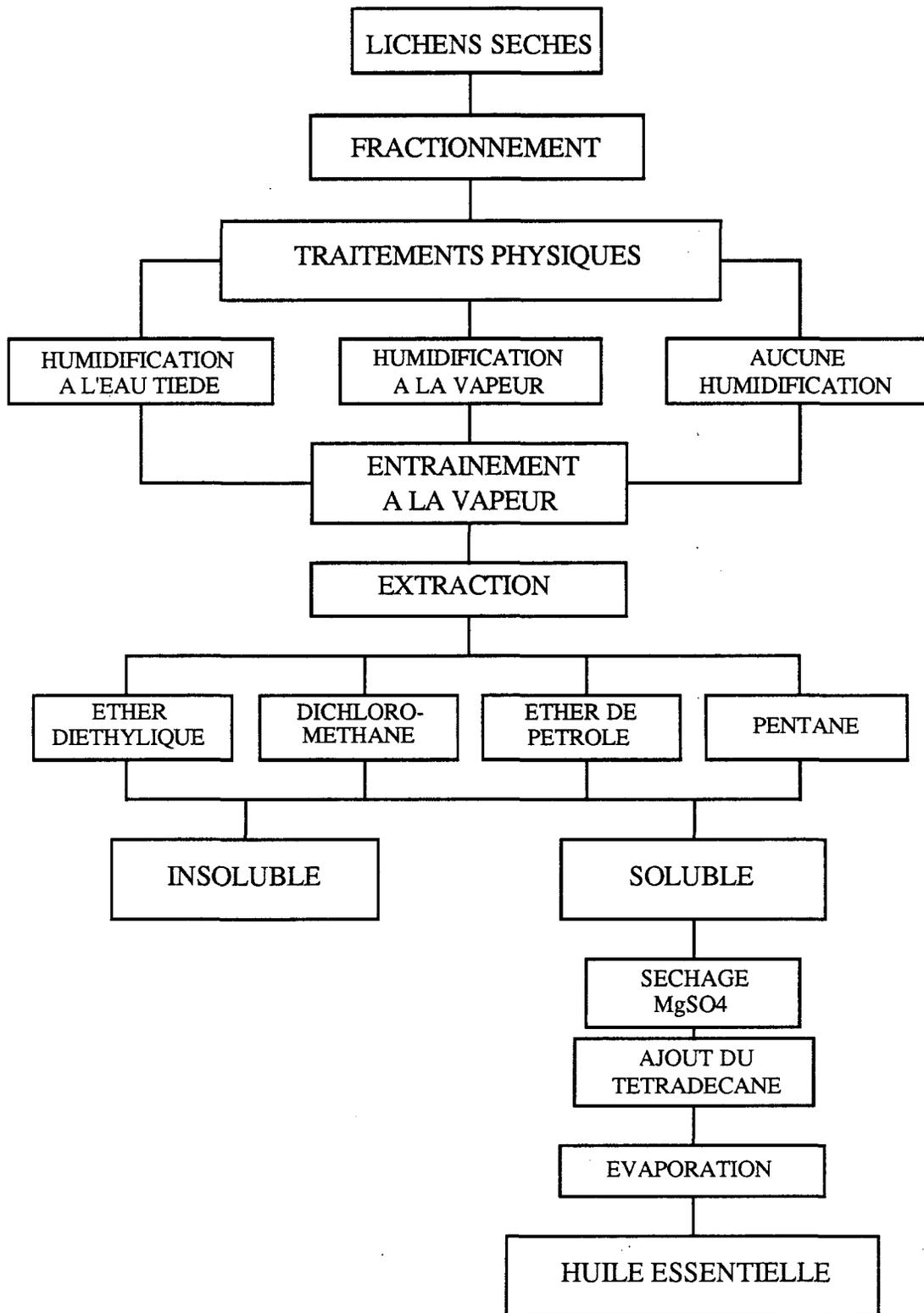


Figure 9: Schéma du protocole d'extraction par entraînement à la vapeur.

• volume d'eau (deminéralisée) dans l'alambic	3000 mL
• volume d'eau (deminéralisée) dans le ballon receveur	200 mL
• volume de solvant dans le ballon receveur	100 mL
• quantité de NaCl dans le ballon receveur	50 g

Les essais de récupération ont été réalisés au moyen de différents solvants organiques: éther diéthylique, dichlorométhane, éther de pétrole et pentane. Chacun des solvants utilisés (Caledon Laboratories Ltd) était de grade analytique distillé sur verre et employé sans autre purification. Chaque distillation durait environ 90 minutes à partir de l'apparition de la première goutte dans le ballon receveur, jusqu'à l'obtention d'un volume final de 2000 mL. Un schéma de l'entraînement à la vapeur d'eau est présenté à la figure 10. Le mélange eau + solvant + huile essentielle est extrait de nouveau avec 40 g de NaCl et trois portions de 50 mL de solvant. La phase organique recueillie est séchée à l'aide de sulfate de magnésium puis filtrée sur laine de verre. Après l'ajout d'un volume constant d'un standard interne (tétradécane, Fluka Co.), l'extrait est ensuite amené à un volume d'environ 10 mL sur un évaporateur rotatif sous pression contrôlée (Büchi), dans un bain de glace, et concentré à sec avec un évaporateur à jet d'azote (Pierce Chemical Co.). Après pesée, l'huile essentielle est diluée dans un volume de 1 mL de solvant puis conservée à l'abri de la lumière et à une température de 4 °C, jusqu'à l'analyse chimique.

Afin d'éliminer les sources de contamination entre chacune des distillations, l'appareil était démonté et soigneusement lavé au détergent puis rincé successivement à grande eau, à l'eau distillée et à l'acétone. Un blanc de la méthode a également été effectué avec de l'éther diéthylique pour vérifier la présence possible de contamination.

L'examen des chromatogrammes, enregistrés à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (CG-Cap), a révélé une faible efficacité d'extraction des

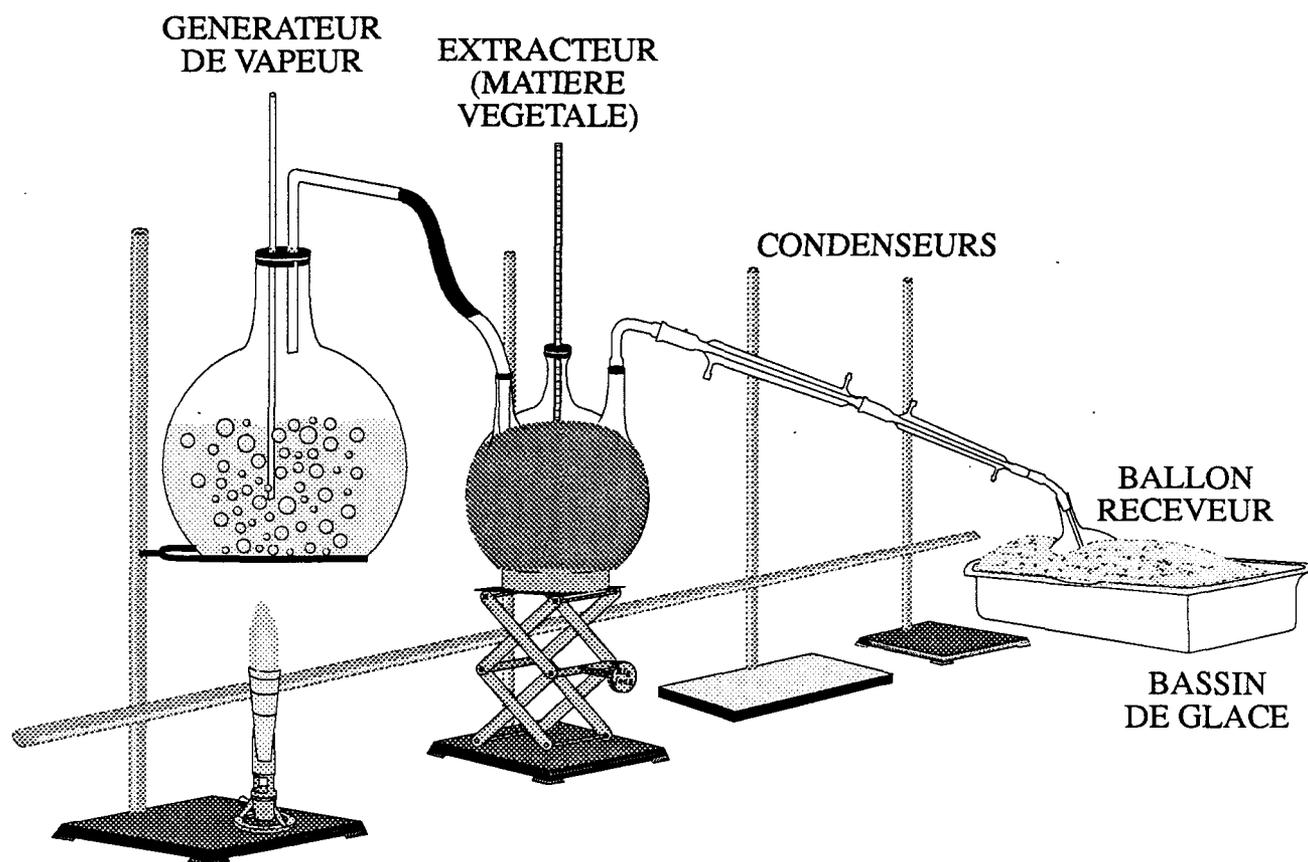


Figure 10: Schéma de l'entraînement à la vapeur.

composants volatils (terpènes) par l'éther diéthylique. On a donc tenté d'accroître la concentration des composants volatils par une distillation vapeur-vapeur de Likens-Nickerson. Les huiles essentielles, diluées avec 1 mL d'éther, ont été extraites pendant 6 heures et recueillies dans un volume de 120 mL de pentane. L'extrait a été réduit par évaporation dans un bain de glace à un volume de 1 mL.

### **2.3.2 Par hydrodiffusion**

Lors d'une hydrodiffusion, les matières premières ne sont plus disposées directement dans l'eau mais sur le fond de téflon d'une colonne de verre, sous lequel est placée l'eau que l'on réchauffe (figure 11). La vapeur, qui diffuse directement à travers les végétaux, emporte encore avec elle les substances volatiles, mais l'avantage est double: l'huile surnage l'eau contenue dans un col gradué, ce qui en permet la cueillette directe, et les composés extraits sont généralement plus lourds. A partir de 300 g de matières sèches coupées, après une extraction de 3 heures, l'huile qui surnage est séparée de l'eau par aspiration à l'aide d'une micropipette. L'huile essentielle est pesée, diluée dans un volume de 1 mL de pentane et conservée à l'obscurité à une température de 4 °C.

### **2.3.3 Par les solvants volatils**

Pour cette extraction, des solvants de polarité différente (pentane, éther de pétrole, toluène, dichlorométhane et éther diéthylique) ont été utilisés successivement pour fins de comparaison. Le principe consistait à faire macérer 30 g de matière séchée, coupée et placée dans un volume de 200 mL de solvant à froid pendant 30 minutes afin d'y faire passer les produits odorants. Les matières végétales étaient ensuite complètement égouttées et filtrées sur un filtre de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  (Fisher scientific Co.). Simultanément, une nouvelle

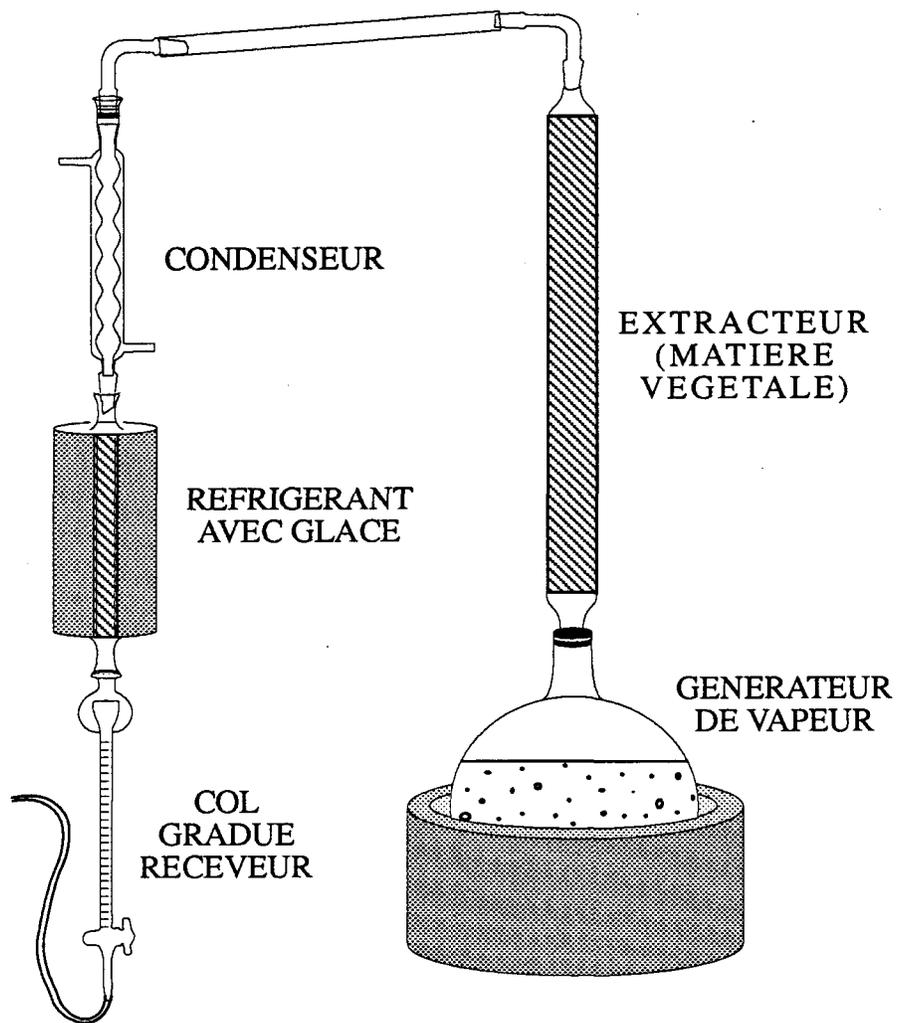


Figure 11: Shéma de l'hydrodiffusion.

portion de solvant était placée sur la matière première et l'opération était répétée jusqu'à cinq fois. Après l'épuisement, la solution parfumée était concentrée au moyen d'un roto-vapeur sous pression réduite dans un volume d'environ 10 mL puis ramenée à 1 mL par un évaporateur sous jet d'azote. Certains échantillons cristallisant, une seconde filtration sur filtre de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ , d'une membrane de 3 mm (Fisher Scientific Co.) était effectuée. Les vials étaient conservés à l'abri de la lumière à 4 °C.

## **2.4 Techniques analytiques**

### **2.4.1 Chromatographie en phase gazeuse**

Tous les échantillons extraits par entraînement à la vapeur, par hydrodiffusion ou par les solvants volatils ont été analysés qualitativement et quantitativement à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard 5890A, équipé d'une colonne capillaire a-polaire DB-5 (J. and W. Scientific Inc), de 30 mètres par 0,32 mm de diamètre intérieur (D.I.), 0,25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur de film, d'un détecteur ionisation à flamme (DIF) et d'un injecteur capillaire avec diviseur (partage). Les analyses étaient d'une durée de 2 heures pour les échantillons prélevés par entraînement à la vapeur ou par les solvants volatils et de 3 heures dans le cas de l'hydrodiffusion. Les conditions de température, de même que d'analyse chromatographique, sont décrites au tableau I. L'enregistrement des chromatogrammes a été réalisé au moyen d'un intégrateur électronique HP 3390A. Les pics chromatographiques ont été identifiés en comparant le temps de rétention relatif à ceux de standards et par indices de Kovat calculés par rapport à ceux des hydrocarbures saturés, suivant la formule (Jennings et Shibamoto, 1980):

**TABLEAU I**  
**Conditions d'analyse de la chromatographie**  
**en phase gazeuse sur colonne capillaire**

---

CHROMATOGRAPHE	Hewlett-Packard
DETECTEUR	DIF
COLONNE	DB-5, 30 mètres
TEMP. INJECTEUR	200 °C
TEMP. DETECTEUR	250 °C
PROG. TEMPERATURE	40 °C (0 min.) 2 °C / min. 210 °C (33 min.)
TYPE D'INJECTION	Partage
VOLUME D'INJECTION	1,0 µL
GAZ PORTEUR	Hélium
DEBIT	1 mL / min
ATTENUATION	3

---

$$I_a = 100N + 100n \frac{\log t'_{R(a)} - \log t'_{R(N)}}{\log t'_{R(N+n)} - \log t'_{R(N)}}$$

- $I_a$ : Indice de Kovat d'une substance (a)  
 $N$ : Nombre de carbone de l'hydrocarbure saturé inférieur à (a)  
 $n$ : Nombre de carbone d'écart entre les deux hydrocarbures saturés  
 $t'_{R(a)}$ : Temps de rétention de la substance (a)  
 $t'_{R(N)}$ : Temps de rétention de l'hydrocarbure saturé inférieur à (a)  
 $t'_{R(N+n)}$ : Temps de rétention de l'hydrocarbure saturé supérieur à (a)

Les calculs de Kovat étaient établis une fois par semaine et ne variaient pas de plus de 1%. Les différents pics ont également été comparés avec ceux obtenus en utilisant une colonne capillaire polaire Supelcowax 10 de 30 mètres (Supelco), 0,25 mm D.I., épaisseur du film liquide 0,25  $\mu\text{m}$  et un injecteur de tête de colonne (on column). L'étude de la composition relative des extraits a été effectuée en utilisant les valeurs d'aire sous les pics chromatographiques calculées par l'intégration électronique. Une analyse semi-quantitative de la variation saisonnière a été réalisée dans le cas de l'entraînement à la vapeur, en comparant le pourcentage de surface des pics chromatographiques avec le pourcentage de l'aire du pic du tétradécane.

#### 2.4.2 Spectrométrie de masse

L'identification qualitative des pics chromatographiques des divers extraits a été confirmée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire couplée à la spectrométrie de masse (CG-Cap-SM), d'après ionisation électronique (IE) ou ionisation chimique (IC). Un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard 5790A couplé à un spectromètre de masse VG 12-250, équipé d'une colonne a-polair DB-5 de 30 mètres (J. and W. Scientific Inc.), d'une épaisseur de film de 0,25  $\mu\text{m}$  a été employé. Les conditions

**TABLEAU II**  
**Conditions d'analyse de la chromatographie**  
**en phase gazeuse sur colonne capillaire**  
**couplée à la spectrométrie de masse**

---

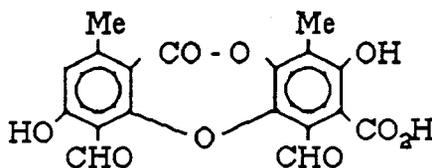
CHROMATOGRAPHE	Hewlett-Packard
SPECTROMETRE DE MASSE	VG Masslab 12-250
COLONNE	DB-5, 30 mètres
VOLT. D'IONISATION	70 éV
TEMP. SOURCE	200 °C
VITESSE SCAN	0,6 sec.(entre masse: 50-450)
PROG. TEMPERATURE	40 °C (0 min.) 2 °C / min. 210 °C (33 min.)
TYPE D'INJECTION	Tête de colonne
VOLUME D'INJECTION	0,5 µL
GAZ PORTEUR	Hélium
DEBIT	1,5 mL / min.

---

chromatographiques sont décrites au tableau II. La caractérisation des substances a été effectuée par comparaison des spectres de masse des produits isolés du lichen: 1<sup>e</sup> avec les spectres des produits purs enregistrés sur la banque de données de l'appareil; 2<sup>e</sup> avec les spectres de la littérature (Chemical Abstract; Ryhage et Sydow, 1963).

### 2.4.3 Chromatographie sur couche mince

La méthode standardisée de chromatographie sur couche mince, décrite par Culberson et Kristinsson (1970), a été appliquée pour l'analyse des produits secondaires lourds (depsides et depsidones). Les chromatogrammes ont été développés sur des plaques de gel de silice 60 F<sub>254</sub> (Merck Co.) d'une épaisseur de 0,25 mm et dont les dimensions étaient de 20 cm sur 12,5 cm. Les composants lourds étaient extraits à trois reprises à l'aide de l'acétone à une température de 50 °C et / ou avec du benzène à température ambiante, à partir de fragments de 1 cm<sup>2</sup> de lichen propre séché ou frais. Les extraits étaient ensuite évaporés sur des lames de microscope et appliqués à 2 cm de la base de la plaque sur une distance de 0,9 cm. Les contrôles de l'atranorine et de l'acide norstictique provenant des



Acide norstictique

deux échantillons *Cladina evansii* et *Parmelia (Parmotrema) perforata* fournis par W.L. Culberson et C.F. Culberson, étaient quant à eux appliqués à des distances de 4,5 cm sur la plaque. L'identification des composés a été déterminée d'après la migration dans trois

systèmes de solvant: A: benzène:dioxane:acide acétique (180:45:5, 230 mL); B: hexane:éther diéthylique:acide formique (120:90:20, 230 mL); C: toluène:acide acétique, (200:30, 230 mL). Les plaques développées dans le système A étaient déposées face à un carton adsorbant de 9,5 cm sur 20 cm imbibé de solvant (Culberson, 1972 A). Les chromatogrammes, séparés dans le solvant B, étaient équilibrés 5 minutes dans une atmosphère de 60% d'acide formique aqueux, avant d'être déposés dans la chambre à développement, alors que dans le cas du solvant C, l'équilibrage des taches s'effectuait à l'acide acétique glacial (Culberson, 1974; Culberson et Ammann, 1979). La migration de 10 cm terminée, les plaques sont séchées, examinées sous lumière ultraviolette puis vaporisées avec une solution aqueuse de 10% d'acide sulfurique et chauffées à 110 °C (15-20 min.) afin de visualiser tous les groupements aromatiques. Les différentes taches étaient assignées d'après les classes de Rf des contrôles (atranorine et acide norstictique) et identifiées à l'aide des substances de référence de la table I de Culberson (1972 A). La mobilité (Rf) des composés a été définie d'après la formule suivante (Touchstone et Dobbins, 1978):

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la substance (centre de la tache)}}{\text{distance parcourue par le solvant (front)}}$$

#### 2.4.4 Chromatographie liquide à haute performance

Plusieurs auteurs (Culberson, 1972 B; Culberson et Culberson, 1978; Vicente et al., 1984; Xavier Filho et al., 1984 et 1985; Garcia-Junceda et al., 1985; Avalos et Vicente, 1987; Schulz et Albroscheit, 1989) ont effectué l'analyse des substances lichéniques par chromatographie liquide. En considérant l'appareillage utilisé et la liste des produits identifiés, l'étude de caractérisation des composés aromatiques secondaires a été réalisée par

la technique de Huovinen et al. (1985, 1986 A et 1986 B). Chacun des échantillons a été préalablement purifié par un passage sur une pré-colonne C18 (Waters Associates) et chromatographié sur une colonne Lichrosorb RP-8 (Ansbec Co.), 5 µm, 250\*4,6 mm D.I.. Un chromatographe liquide Perkin-Elmer série 4, équipé d'un détecteur UV-visible (Perkin-Elmer LC-85) et d'un détecteur à fluorescence (Perkin-Elmer LS 40), tous deux couplés à un système d'acquisition des données (Nelson Analytical, series 900), a été utilisé. Les chromatogrammes ont été enregistrés sur un ordinateur compatible IBM, muni d'un logiciel PC integrator (Copyright P.E. Nelson Systems, 1988). Les conditions chromatographiques apparaissent au tableau III. La matière première (10 mg) était homogénéisée à l'aide d'un mortier et extraite sur une période de 12 heures dans un volume de 2 mL de méthanol (Caledon Laboratories, grade HPLC), tel qu'il a été décrit par Strack et al. (1979). Après centrifugation, le surnageant était filtré sur un filtre de nylon (Fisher Scientific, 3 mm de membrane, 0,45 µm) et injecté directement. L'identification des constituants était basée sur les indices de rétention (I.R.) des substances de référence calculés en relation avec ceux des standards internes de l'acide benzoïque et du phthalate du bis-(éthyl-2 hexyl) (Huovinen et Al., 1985 : table 2) selon la formule;

$$I.R. = \frac{T.r. \text{ du composé} - T.r. \text{ de l'acide benzoïque}}{T.r. \text{ du phthalate du bis-(éthyl-2 hexyl)} - T.r. \text{ de l'acide benzoïque}}$$

**TABLEAU III**  
**Conditions d'analyse de la chromatographie**  
**liquide à haute performance**  
**phase renversée**

---

CHROMATOGRAPHE	Perkin-Elmer
DETECTEURS	•UV-visible (270 nm) •A fluorescence (270 nm : excitation) (345 nm : émission)
PRE-COLONNE	C18
COLONNE	Lichrosorb RP-8
VALVE D'INJECTION	Rhéodyne 7010
VOLUME D'INJECTION	20 µL
GRADIENT D'ELUTION	20% méthanol / eau (7 min.) 1% méthanol / eau / min. 99% méthanol / eau (3 min.)
DEBIT	0,7 mL / min.
TEMPS D'ANALYSE	90 min.

---

## **CHAPITRE III**

### **RESULTATS ET DISCUSSION**

### 3.1 Traitements physiques

Les lichens sont toujours traités après dessiccation afin de permettre le développement des divers principes odorants. Le broyage préalable à l'extraction ne donne aucun avantage marquant. En effet, le rendement en huiles essentielles n'est pas amélioré lorsque les fragments de lichens sont traités dans un broyeur avant hydrodistillation. Par contre, il est avantageux d'humidifier la matière première pour obtenir une extraction plus poussée. L'humidification accroît la perméabilité des membranes cellulaires et permet à l'huile de diffuser plus rapidement. Lorsque les lichens sont humidifiés, un taux moyen d'acidité de 3,8 de l'eau est observé dans le ballon extracteur comparativement à 4,20 sans humidification. De plus, les lichens humidifiés révèlent un rendement moyen en huile de 0,025% du poids sec plutôt que de 0,016% sans traitement physique. Ces observations semblent confirmer l'hypothèse proposée.

L'humidification à la vapeur agresse toutefois plus sévèrement la matière végétale. Lors du traitement, les produits les plus volatils se vaporisent dans l'air, laissant apparaître une odeur agréable. Tous les échantillons prélevés, analysés sur le chromatographe en phase gazeuse équipé d'une colonne DB-5 (a-polaire), permettent de constater une concentration plus faible de certains constituants détectés entre 3 min. et 30 min. de temps de rétention par rapport aux mêmes composés lorsque le lichen est humecté à l'eau tiède. La comparaison des profils chromatographiques permet également de constater que le benzèneacétaldéhyde, le nonène-2 al et les inconnus 15 et 23 (tableau IV et V) sont relativement plus importants quantitativement après un traitement physique d'humidification.

## 3.2 Remarques techniques d'extraction

### 3.2.1 Entraînement à la vapeur versus solvants volatils

Les huiles extraites par distillation à la vapeur d'eau, à l'aide de l'éther de pétrole ou du pentane, possèdent les mêmes caractéristiques qualitatives et quantitatives. Toutefois, d'après une remarque de Naves (1974), le pentane donnerait des extraits moins colorés et plus pauvres en cire que les extraits éthéropétroliques. Le pentane a donc été utilisé pour poursuivre les travaux. L'extraction de la phase aqueuse par l'éther diéthylique ne permet pas d'obtenir les composés légers en quantité suffisante (trace), ces derniers doivent être concentrés par une distillation Likens-Nickerson. Cette seconde extraction vapeur-vapeur de l'huile fournit alors un extrait comparable quantitativement aux solvants précédents. Une extraction de l'huile essentielle par le dichlorométhane permet de constater que le contenu des produits est qualitativement le même que celui obtenu à partir du pentane. Par contre, du point de vue quantitatif, les différences sont plus importantes.

### 3.2.2 Hydrodistillation versus hydrodiffusion

Le profil chromatographique des huiles essentielles d'*Usnea filipendula* (Stirton) extraites par hydrodistillation et hydrodiffusion est présenté à la figure 12. Les chromatogrammes ainsi obtenus pour *Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik) et *Bryoria furcellata* (Fr.) se retrouvent à la figure 13. La séparation des constituants enregistrés par les deux techniques est relativement distincte. Le procédé par entraînement à la vapeur a permis l'extraction des composés légers comparativement à des produits plus lourds pour l'hydrodiffusion. Seule une étude qualitative du profil chromatographique des extraits par distillation à la vapeur a été effectuée en chromatographie en phase gazeuse sur colonne

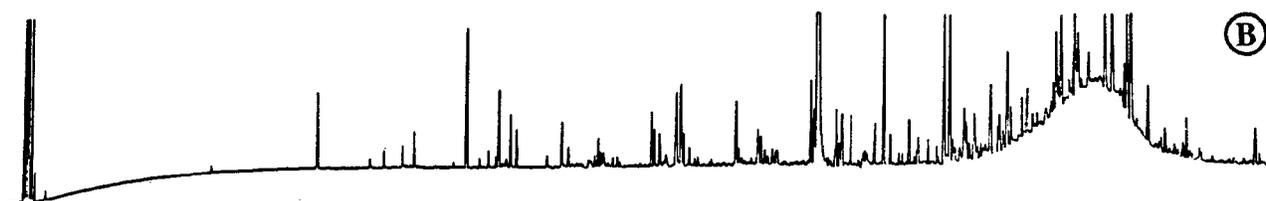
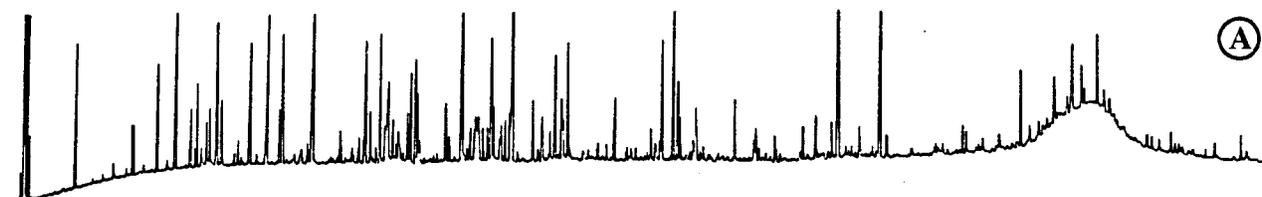


Figure 12: Chromatogrammes typiques des extraits d'*Usnea filipendula* obtenus par hydrodistillation (A) et hydrodiffusion (B).

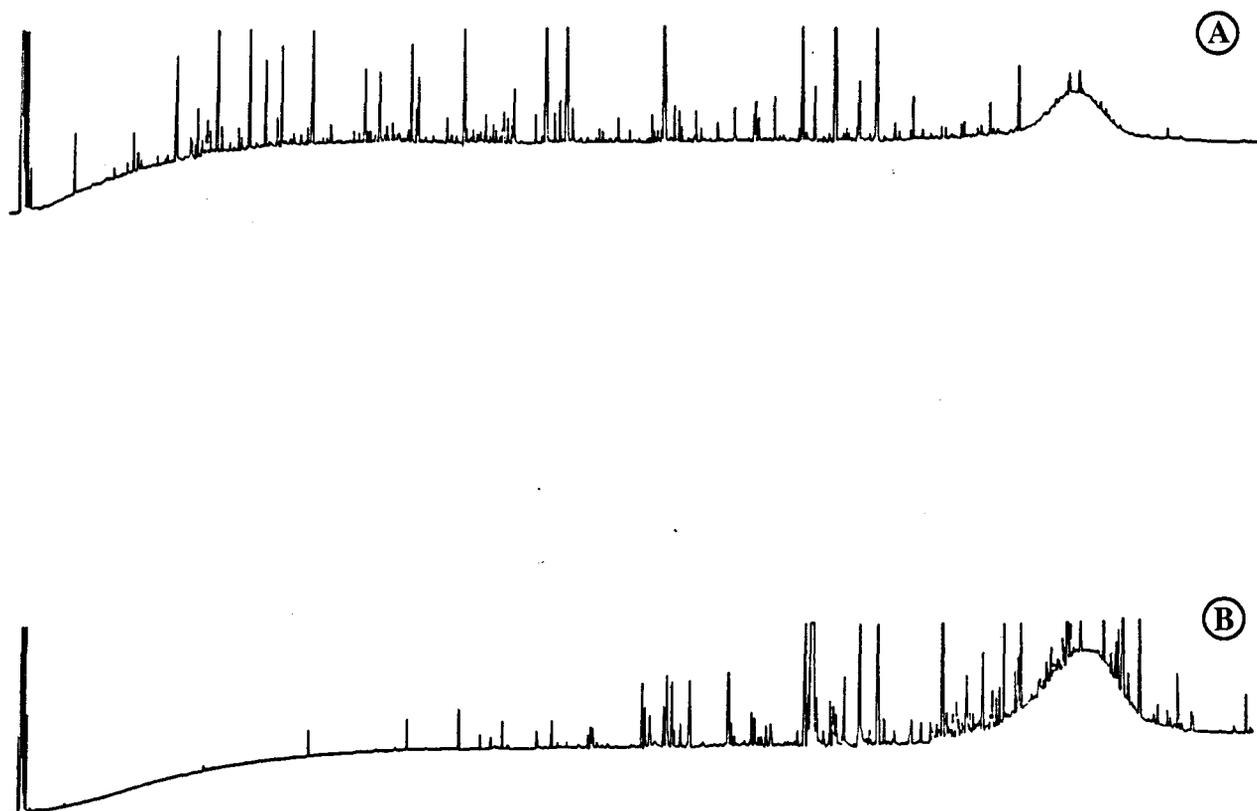


Figure 13: Chromatogrammes typiques des extraits de *Bryoria nadvornikiana* et de *Bryoria furcellata* obtenus par hydrodistillation (A) et hydrodiffusion (B).

capillaire couplée à la spectrométrie de masse. Le patron épaulé des temps de rétention obtenu par hydrodiffusion ne permet pas une analyse précise. Une séparation des pics chromatographiques sur une colonne à distillation fractionnée, composé de plusieurs centaines de plateaux théoriques, serait requise.

Le rendement moyen de 0,016% en huile essentielle chez les lichens de genre *Usnea* et *Bryoria* extrait par la technique d'entraînement à la vapeur est sensiblement supérieur à celui de 0,005% atteint par hydrodiffusion dans les mêmes conditions d'analyse, c'est-à-dire sans traitement physique d'humidification préalable. La faible quantité de produits odoriférants recueillie, confirmée par la maison Robertet & Cie, met en évidence le coût de production trop élevé pour permettre le potentiel d'exploitation de cette ressource renouvelable.

### 3.3 Analyse qualitative

#### 3.3.1 De l'huile essentielle

##### 3.3.1.1 *Usnea filipendula* (Stirton)

La figure 14 présente un chromatogramme d'*Usnea filipendula* extrait par entraînement à la vapeur. Tous les profils chromatographiques obtenus sont similaires à celui du mois d'août 1989. L'identification des constituants de l'huile essentielle a été effectuée, d'une part, avec les indices de Kovat (Jennings et Shibamoto, 1980) et, d'autre part, par comparaison des pics de base, des poids moléculaires et du degré d'ajustement (fit) des spectres de masse isolés avec les spectres enregistrés sur la banque de données. La caractérisation de certains des constituants a été confirmée en comparant les temps de rétention et les indices de Kovat obtenus sur une colonne capillaire Supelcowax (polaire)

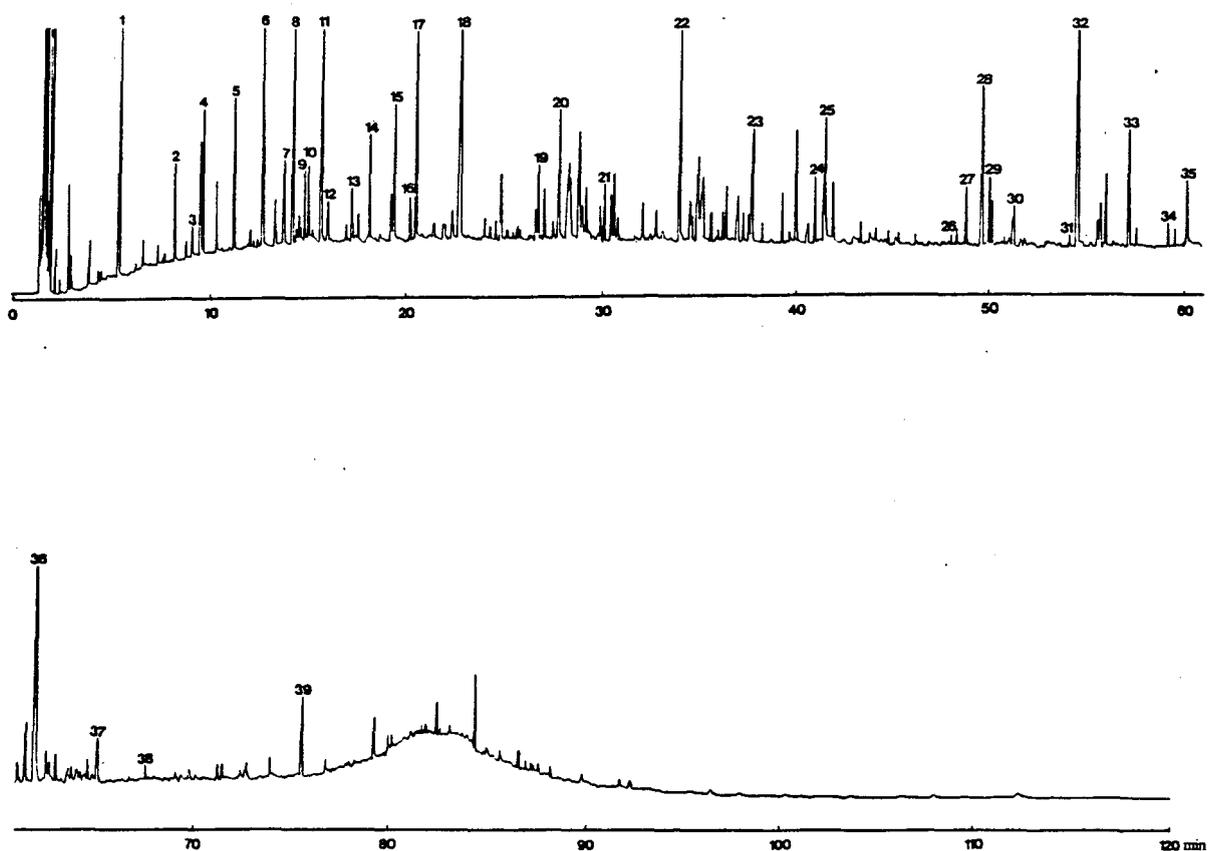


Figure 14: Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Usnea filipendula* analysée en CG-Cap.

(Les numéros identifiant les pics sont ceux apparaissant dans le tableau IV.)

**TABLEAU IV**  
**Composants identifiés dans l'huile essentielle**  
**d'*Usnea filipendula***

No	Composants	CG-Cap		CG-Cap-SM		Fit
		T.r. (min)	Indice de Kovat	Pic de base	Masse P.M.	
1	Hexanal <b>a</b>	5,46	800	56	100	976
2	Méthyl-7 octène-1	8,30	872	56	126	909
3	Heptanone-2	9,26	890	58	114	946
4	Inconnu	9,74	899	70	115	
5	Alpha pinène <b>ab</b>	11,43	932	93	136	925
6	Benzaldéhyde <b>b</b>	12,88	956	77	106	967
7	Bêta pinène <b>ab</b>	13,95	973	93	136	882
8	Heptène-1 ol-3	14,47	980	57	114	882
9	Inconnu	15,17	990	81	139	
10	(E,E)-heptadiène-2,4 al	15,41	994	81	110	976
11	Inconnu	15,93	1000	57	129	
12	Inconnu	16,28	1007	81	137	
13	Méthyl-1 octahydro pentalène	17,56	1027	67	124	878
14	Benzèneacétaldéhyde	18,38	1039	91	120	942
15	Inconnu	19,63	1057	55	167	
16	Inconnu	20,51	1069	55	140	
17	Diméthyl-1,5 cyclooctane	20,77	1073	56	140	889
18	(E)-méthyl-6 undécène-3	23,03	1101	57	168	819
19	Nonène-2 al <b>ab</b>	26,70	1158	55	140	923
20	Inconnu	27,98	1172	55	150	
21	(Méthyl-1 propyl)-1 (méthyl-2 butyl)-1 cyclopropane	30,34	1202	57	168	813
22	Trans décène-2 al <b>ab</b>	34,19	1263	55	154	959

**TABLEAU IV (SUITE)**  
**Composants identifiés dans l'huile essentielle**  
**d'*Usnea filipendula***

No	Composants	CG-Cap		CG-Cap-SM		
		T.r. (min)	Indice de Kovat	Pic de base	Masse P.M.	Fit
23	Inconnu	37,91	1311	81	193	
24	Undécène-2 al <sup>b</sup>	41,21	1361	70	168	960
25	Inconnu	41,70	1368	56	217	
26	Acénaphthène (HAP)	48,18	1469	153	154	944
27	Inconnu	48,89	1480	185	193	
28	Inconnu	49,83	1492	168	167	
29	Biphényl-1,1' ol-2	50,16	1497	170	170	904
30	Inconnu	51,38	1518	55	181	
31	9-H-fluorène (HAP)	54,19	1565	166	166	932
32	N,N-diéthyl méthyl-3 benzamide	54,43	1572	119	191	950
33	Benzophénone	57,25	1616	105	182	893
34	Méthyl-6 dihydroxy-2,4 formyl-3 benzoate de méthyle	59,36	1653	150	210	835
35	Cyclodécanol	60,36	1670	55	156	952
36	Diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle	62,05	1698	136	196	902
37	Anthracène (HAP)	65,22	1756	178	178	937
38	Benzènedicarboxylate-1,2 du bis (méthoxy-2 éthyl) (phthalate)	67,67	1801	149	282	932
39	Benzènedicarboxylate-1,2 du butyl méthyl-2 propyle (phthalate)	75,69	1956	149	278	979

**a:** L'identification des composés a été confirmée à l'aide de standards.

**b:** Constituants identifiés dans la mousse de chêne (*Evernia prunastri*).

d'après ceux des composés purs correspondants. Le tableau IV donne l'analyse des constituants identifiés dans l'huile essentielle d'*Usnea filipendula* en spécifiant ceux dont l'identification a été confirmée par des standards.

Parmi les composés monoterpéniques, aldéhydiques, cétoniques, alcooliques, phénoliques, amidés, carboxyliques, sans oublier les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques identifiés, certains contribuent sûrement de façon certaine à l'odeur très caractéristique de terre humide et de moisissure de l'huile du lichen verdâtre. A l'exception de l'alpha pinène, du bêta pinène, du benzaldéhyde, du nonène-2 al, du trans décène-2 al et du undécène-2 al, déjà répertoriés par les auteurs (Seu-Salerno et Blakeway, 1987; Gavin et Tabacchi, 1975; Gavin et al., 1978), les composés observés n'étaient pas caractérisés dans la mousse de chêne *Evernia prunastri*.

La présence de l'alpha pinène et du bêta pinène comme constituants de l'huile s'explique possiblement par l'influence directe de l'hôte parasité par le lichen. Sachant que ces deux terpènes représentent les produits majeurs de l'huile essentielle extraite de l'espèce *Abies balsamea* (Hunt et Von Rudloff, 1974), la relation avec l'hôte présente certainement une grande importance sur l'odeur du lichen. En 1979, les auteurs Nicollier et al. ont démontré qu'il existait une relation étroite entre la composition chimique d'*Evernia prunastri* et le bois, de même que les feuilles du genre *Quercus*. Les auteurs Gavin et al. (1978) mentionnent que la présence d'hydrocarbures aliphatiques est reliée à celle des acides gras. Par contre, ils s'expliquent plus difficilement la présence de certains hydrocarbures aromatiques.

Parmi les composés identifiés, relevons la présence surprenante du N,N-diéthyl méthyl-3 benzamide apparaissant uniquement pendant la saison estivale. La vérification

positive de ce dernier composé dans plusieurs extraits par entraînement à la vapeur des échantillons du mois d'août confirme que la qualité de l'huile essentielle du lichen et son odeur varient suivant la saison pendant laquelle il a été récolté. A notre connaissance, la présence d'un tel composé amidé n'a jamais été retrouvée auparavant dans un lichen.

Une contamination significative de l'huile essentielle par des phthalates et des contaminants du système a été détectée dans le blanc de la méthode et confirmée par l'examen en chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire couplée à la spectrométrie de masse. La source première d'un phthalate, dont le temps de rétention est connu à 112,78 min. (indice de kovat: 2535), a été éliminée par l'utilisation d'un tube de caoutchouc et non de tygon au niveau du générateur de vapeur. La source des autres impuretés provient probablement à l'étape de concentration de l'huile sur roto-vapeur et jet d'azote. Le lavage au détergent et à l'acétone des joints de connexion des appareils aurait dû être effectué à l'acide nitreux afin d'éliminer tous les phthalates et les HAP déjà présents dans les appareils. Il convient cependant de souligner que l'analyse effectuée en laboratoire a permis d'identifier tous les contaminants identifiés sur les chromatogrammes.

Malgré le nombre de constituants identifiés, les chromatogrammes de l'huile jaunâtre étudiée montrent encore des dizaines de pics et un fort bruit de fond, signes de la présence de composés traces, dont la structure n'a pu être précisée.

#### 3.3.1.2 *Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik) et *Bryoria furcellata* (Fr.)

Le profil chromatographique typique des constituants de l'huile essentielle de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata* est présenté à la figure 15. L'identification des divers

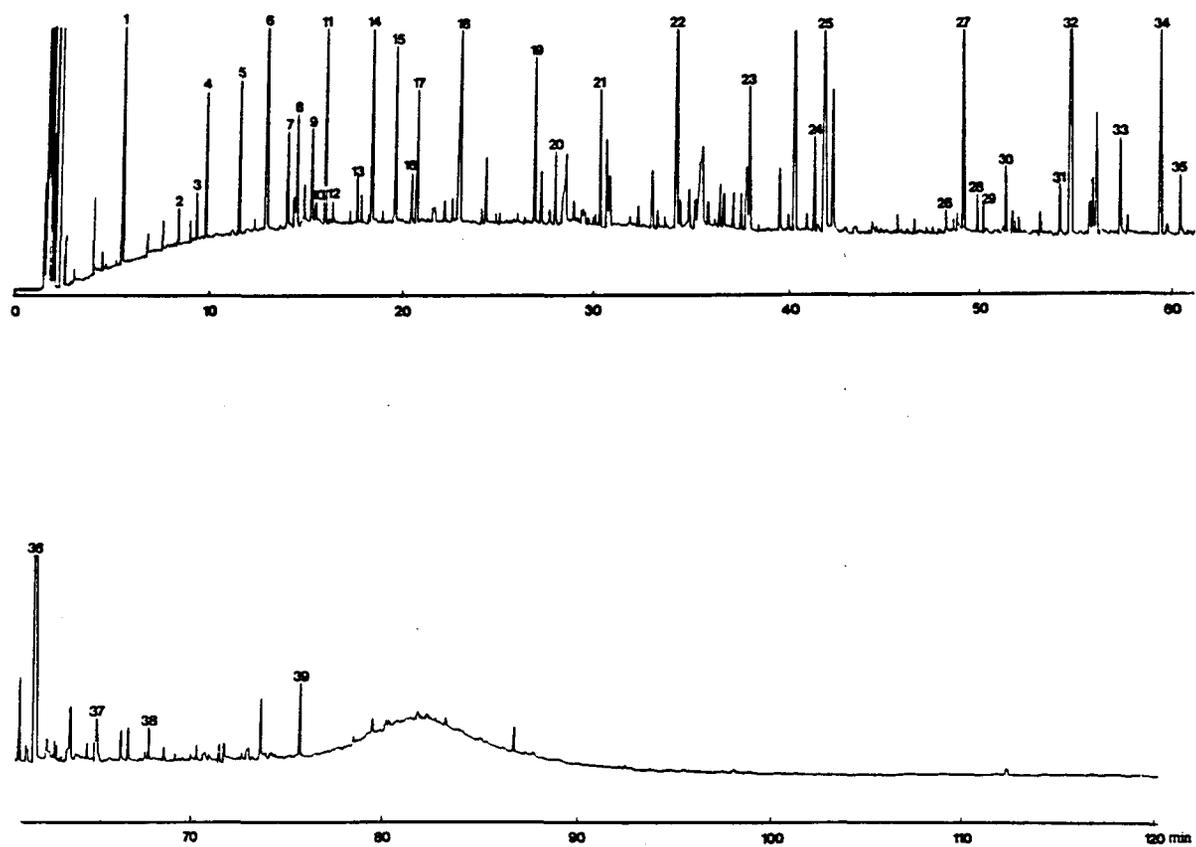


Figure 15: Chromatogramme de l'huile essentielle de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata* analysée en CG-Cap.

(Les numéros identifiant les pics sont ceux apparaissant dans le tableau V.)

**TABLEAU V**  
**Composants identifiés dans l'huile essentielle**  
**de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata***

No	Composants	CG-Cap		CG-Cap-SM		
		T.r. (min)	Indice de Kovat	Pic de base	Masse P.M.	Fit
1	Hexanal <b>a</b>	5,44	799	56	100	976
2	Méthyl-7 octène-1	8,28	871	56	126	909
3	Heptanone-2	9,27	890	58	114	946
4	Inconnu	9,76	899	70	115	
5	Alpha pinène <b>ab</b>	11,46	935	93	136	925
6	benzaldéhyde <b>b</b>	12,89	956	77	106	967
7	Bêta pinène <b>ab</b>	13,94	972	93	136	882
8	Heptène-1 ol-3	14,49	980	57	114	882
9	Inconnu	15,20	991	81	139	
10	(E,E)-heptadiène-2,4 al	15,43	994	81	110	976
11	Inconnu	15,94	1000	57	129	
12	Inconnu	16,26	1007	81	137	
13	Méthyl-1 octahydro pentalène	17,58	1027	67	124	878
14	Benzèneacétaldéhyde	18,38	1039	91	120	942
15	Inconnu	19,64	1057	55	167	
16	Inconnu	20,51	1069	55	140	
17	Diméthyl-1,5 cyclooctane	20,78	1073	56	140	889
18	(E)-méthyl-6 undécène-3	23,04	1101	57	168	819
19	Nonène-2 al <b>ab</b>	26,71	1158	55	140	923
20	Inconnu	27,98	1172	55	150	
21	(Méthyl-1 propyl)-1 (méthyl-2 butyl)-1 cyclopropane	30,35	1202	57	168	813
22	Trans décène-2 al <b>ab</b>	34,20	1262	55	154	959

**TABLEAU V (SUITE)**  
**Composants identifiés dans l'huile essentielle**  
**de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata***

No	Composants	CG-Cap		CG-Cap-SM		
		T.r. (min)	Indice de Kovat	Pic de base	Masse P.M.	Fit
23	Inconnu	37,91	1311	81	193	
24	Undécène-2 al <sup>b</sup>	41,21	1361	70	168	960
25	Inconnu	41,71	1369	56	217	
26	Acénaphthène (HAP)	48,15	1467	153	154	944
27	Inconnu	48,90	1481	185	193	
28	Inconnu	49,82	1492	168	167	
29	Biphényl-1,1' ol-2	50,15	1496	170	170	904
30	Inconnu	51,40	1518	55	181	
31	9-H-fluorène (HAP)	54,19	1565	166	166	932
32	N,N-diéthyl méthyl-3 benzamide	54,45	1572	119	191	950
33	Benzophénone	57,25	1615	105	182	893
34	Méthyl-6 dihydroxy-2,4 formyl-3 benzoate de méthyle	59,36	1653	150	210	835
35	Cyclodécanol	60,36	1670	55	156	952
36	Diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle	62,08	1699	136	196	902
37	Anthracène (HAP)	65,22	1756	178	178	937
38	Benzènedicarboxylate-1,2 du bis (méthoxy-2 éthyle) (phthalate)	67,67	1803	149	282	932
39	Benzènedicarboxylate-1,2 du butyl méthyl-2 propyle (phthalate)	75,69	1956	149	278	979

**a:** L'identification des composés a été confirmée à l'aide de standards.

**b:** Constituants identifiés dans la mousse de chêne (*Evernia prunastri*).

composés a été réalisée conjointement à ceux d'*Usnea filipendula*, suivant les mêmes techniques d'analyse. Le tableau V résume la recherche des produits effectuée par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire couplée à la spectrométrie de masse, en spécifiant les constituants dont la confirmation a été établie par l'indice de Kovat de standards sur la colonne polaire de Supelcowax. Ajoutons que la plus grande concentration et pureté de certains composés dans *Bryoria* a facilité l'interprétation de certains pics chromatographiques d'*Usnea*.

Même si les lichens verdâtres et brunâtres appartiennent à des genres différents, la comparaison des chromatogrammes permet de constater qu'ils sont relativement identiques qualitativement. Un extrait mixte des deux populations de lichens récoltés en février (Annexe 1) le confirme. Cependant, des variations importantes de concentration de certains constituants permettent de les différencier quantitativement (voir tableau X et XI). En outre, l'huile de *Bryoria* possède une teinte jaune brûlée par rapport à jaunâtre pour l'huile d'*Usnea*. Dans les deux cas, les huiles présentent une forte odeur de moisissure.

### 3.3.2 Des essences concrètes

#### 3.3.2.1 *Usnea filipendula* (Stirton)

La figure 16 présente le profil chromatographique de l'essence concrète d'*Usnea filipendula* extraite au toluène et celle extraite à l'éther diéthylique. La deuxième méthode de séparation utilisée a permis l'isolement de certains composés cétoniques, carboxyliques, phénoliques sans oublier les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques. Parmi les composés identifiés qui figurent au tableau VI, seuls l'alpha pinène, le bêta pinène, le benzaldéhyde et le diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle ont été rencontrés lors

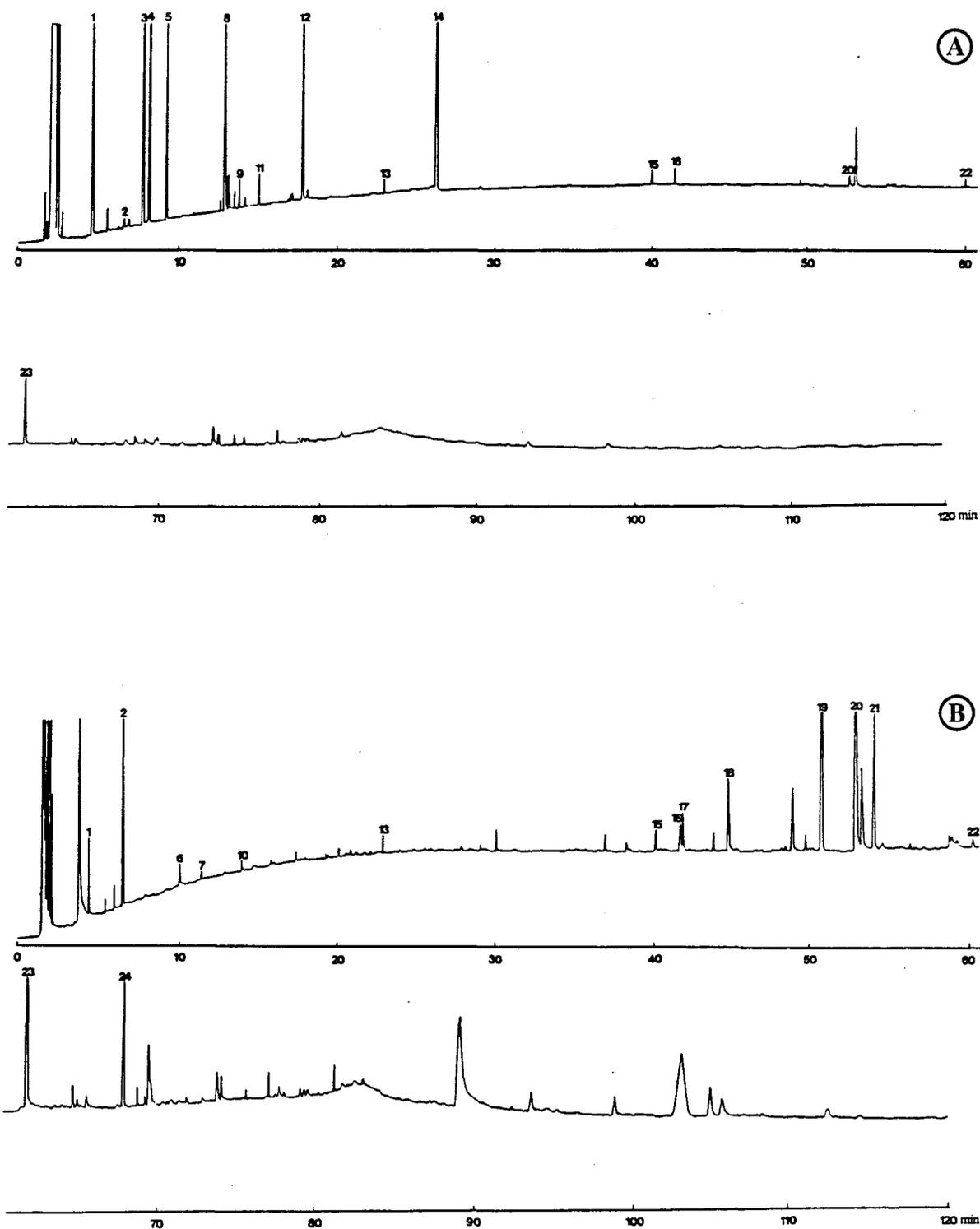


Figure 16: Chromatogrammes des essences concrètes d'*Usnea filipendula* extraites à partir du toluène (A) et de l'éther diéthylique (B) analysées en CG-Cap.

(Les numéros identifiant les pics sont ceux apparaissant dans le tableau VI.)

**TABLEAU VI**  
**Composants identifiés dans les essences concrètes**  
*d'Usnea filipendula*

No	Composants	CG-Cap		CG-Cap-SM		
		T.r. (min)	Indice de Kovat	Pic de base	Masse P.M.	Fit
1	Benzène méthyle	4,49		91	92	991
2	Méthyl-4 pentène-3 al	6,54	832	69	98	929
3	Ethyl benzène <sup>a</sup>	7,75	859	91	106	905
4	Diméthyl-1,3 benzène <sup>a</sup>	8,11	868	91	106	954
5	Diméthyl-1,2 benzène <sup>a</sup>	9,18	890	91	106	998
6	Butoxy-2 éthanol	10,03	905	57	118	992
7	Alpha pinène	11,43	931	93	136	925
8	Benzaldéhyde <sup>a</sup>	12,80	956	77	106	967
9	Méthyl-2 octanone-4 <sup>a</sup>	13,76	971	57	142	970
10	Bêta pinène	13,94	972	93	136	976
11	Triméthyl-1,2,3 benzène <sup>a</sup>	15,02	989	105	120	987
12	Benzèneméthanol <sup>a</sup>	17,74	1031	79	108	964
13	Tétraméthyl-2,2,3,4 pentane	22,95	1100	57	128	959
14	Méthoxy phénol <sup>a</sup>	26,27	1151	108	124	
15	(Hydroxy-2 méthyl-1 éthyl)-1 diméthyl-2,2 méthyl-2 propanoate de propyle	40,07	1345	71	216	968
16	Triméthyl-2,4,4 hydroxy-3 méthyl-2 propanoate de pentyle	41,60	1367	57	216	961
17	Méthyl-3 tridécane	41,74	1369	57	198	952
18	Triméthyl-2,7,10 dodécane	44,78	1414	57	212	953

<sup>a</sup>: Les composés ont été caractérisés uniquement dans la fraction toluïque.

**TABLEAU VI (SUITE)**  
**Composants identifiés dans les essences concrètes**  
*d'Usnea filipendula*

No	Composants	CG-Cap		CG-Cap-SM		
		T.r. (min)	Indice de Kovat	Pic de base	Masse P.M.	Fit
19	Méthyl-6 tridécane	50,75	1507	57	198	931
20	Méthyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol	52,87	1544	205	220	910
21	Ethyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol	54,05	1563	219	234	907
22	Cyclodécanol	60,25	1670	55	156	907
23	Diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle	61,94	1697	136	196	856
24	Benzènedicarboxylate-1,2 du bis (méthoxy-2 éthyl) (phthalate)	67,91	1804	149	282	932

de l'analyse de l'huile essentielle. Les constituants caractérisés dans les fractions extraites à l'éther de pétrole, au pentane, au dichlorométhane et à l'éther diéthylique sont sensiblement identiques. Cependant, le dernier solvant se distingue avantagement du point de vue quantitatif, en présentant en général un pourcentage plus élevé de produits. Il est important de noter que, bien que la concrète toluïque soit plus riche en composés volatils que la concrète éthérodiiéthylique, le toluène ne permet pas d'extraire toute la gamme des hydrocarbures observée par le procédé à l'éther diéthylique. Le toluène semble toutefois plus indiqué pour l'isolement des composés volatils peu abondants.

#### 3.3.2.2 *Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik) et *Bryoria furcellata* (Fr.)

Les profils chromatographiques obtenus à partir du protocole d'extraction par les solvants toluïque et éthérodiiéthylique enregistrés pour le lichen verdâtre de même que pour les lichens brunâtres présentent des résultats relativement similaires qualitativement (figure 17). Toutefois, relevons que le pic du bêta pinène n'a pas été détecté. L'absence de ce produit volatil est probablement associée à l'étape de concentration de l'essence concrète sur roto-vapeur et jet d'azote. Tel que spécifié précédemment, quatre solvants utilisés (pentane, éther de pétrole, dichlorométhane et éther diéthylique) révèlent des fractions comparables alors que le toluène isole mieux certains constituants volatils. De façon globale, l'importance relative de la composition des résinoïdes décrite au tableau VII démontre quelques variations (voir tableau XII et XIII) dont un inconnu de temps de rétention de 6,02 (indice de kovat: 817) observé en plus grande abondance dans l'extrait éthérodiiéthylique. Ajoutons que la fraction extraite à l'éther diéthylique semble plus contaminée par la présence de phthalates et HPA. La présence significative du benzèneméthanol et de cinq importants hydrocarbures aromatiques laisse penser qu'une dégradation des métabolites secondaires

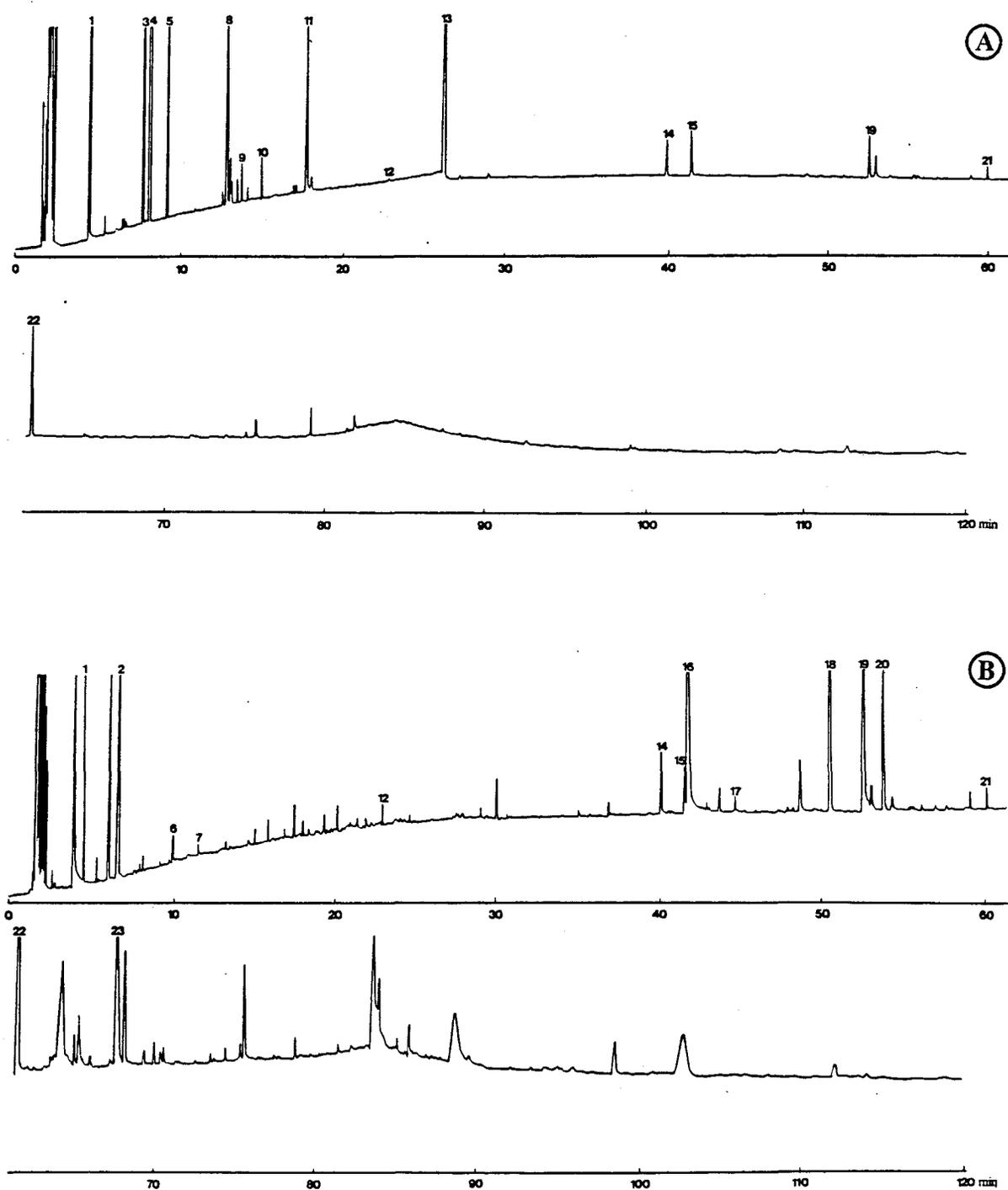


Figure 17: Chromatogrammes des essences concrètes de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata* extraites à partir du toluène (A) et de l'éther diéthylique (B) analysées en CG-Cap.

(Les numéros identifiant les pics sont ceux apparaissant dans le tableau VII.)

**TABLEAU VII**  
**Composants identifiés dans les essences concrètes**  
**de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata***

No	Composants	CG-Cap		CG-Cap-SM		
		T.r. (min)	Indice de Kovat	Pic de base	Masse P.M.	Fit
1	Méthyl benzène	4,49		91	92	991
2	Méthyl-4 pentène-3 al	6,53	831	69	98	929
3	Ethyl benzène <sup>a</sup>	7,75	860	91	106	905
4	Diméthyl-1,3 benzène a	8,12	868	91	106	954
5	Diméthyl-1,2 benzène <sup>a</sup>	9,18	890	91	106	998
6	Butoxy-2 méthanol	10,06	909	57	118	992
7	Alpha pinène	11,45	932	93	136	925
8	Benzaldéhyde <sup>a</sup>	12,80	956	77	106	967
9	Méthyl-2 octanone-4 <sup>a</sup>	13,77	971	57	142	970
10	Triméthyl-1,2,3 benzène <sup>a</sup>	15,02	989	105	120	987
11	Benzèneméthanol <sup>a</sup>	17,75	1032	79	108	964
12	Tétraméthyl-2,2,3,4 pentane	22,95	1101	57	128	959
13	Méthoxy phénol <sup>a</sup>	26,32	1152	108	124	
14	(Hydroxy-2 méthyl-1 éthyl)-1 diméthyl-2,2 méthyl-2 propanoate de propyle	40,07	1346	71	216	968
15	Triméthyl-2,4,4 hydroxy-3 méthyl-2 propanoate de pentyle	41,60	1369	57	216	961
16	Méthyl-3 tridécane	41,75	1371	57	198	952
17	Triméthyl-2,7,10 dodécane	44,79	1415	57	212	953

<sup>a</sup>: Les composés ont été caractérisés uniquement dans la fraction toluïque.

**TABLEAU VII (SUITE)**  
**Composants identifiés dans les essences concrètes**  
**de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata***

No	Composants	CG-Cap		CG-Cap-SM		
		T.r. (min)	Indice de Kovat	Pic de base	Masse P.M.	Fit
18	Méthyl-6 tridécane	50,75	1509	57	198	931
19	Méthyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol	52,84	1546	205	220	910
20	Ethyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol	54,05	1565	219	234	907
21	Cyclodécanol	60,26	1670	55	156	980
22	Diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle	61,96	1699	136	196	856
23	Benzènedicarboxylate-1,2 du bis (méthoxy-2 éthyl) (phthalate)	67,92	1805	149	282	932

par hydrolyse et alcoolyse s'est bel et bien produite. L'humidification préalable des lichens et l'extraction de longue durée des divers principes odorants à l'aide d'un appareil soxhlet permettrait de récupérer probablement une plus grande portion d'essences concrètes.

### 3.3.3 De métabolites secondaires

#### 3.3.3.1 *Usnea filipendula* (Stirton)

L'analyse des composés polyphénoliques effectuée par chromatographie sur couche mince est résumée au tableau VIII. Par l'importance et la coloration très prononcée de la tache identifiée à l'acide usnique, cet acide constitue probablement le principal métabolite secondaire chez les thalles d'*Usnea filipendula*. L'acide usnique, caractéristique à plusieurs espèces de lichens, est formé par oxydation d'une unité méthylphloroacétophénone en opposition à l'estérification ou oxydation d'unités orcinol ou bêta-orcinol des composés depsidiques (Culberson, 1970; Gonzalez et al., 1984). L'abondance de ce produit pourrait peut-être justifier l'exploitation des lichens *Usnea filipendula* dans la synthèse de produits chimiothérapeutiques utilisant comme base l'acide usnique (Reyes et al., 1981).

La technique d'analyse par chromatographie liquide détectée en ultraviolet / visible (figure 18) donne une résolution trop faible du pic de l'acide usnique pour confirmer sa présence avec certitude. On a identifié au cours des différents essais une reproductibilité du pic à l'indice de rétention 0,76 alors qu'on aurait dû le retrouver à l'indice 0,74 selon Huovinen et al. (1985). La faible séparation de ce constituant est probablement liée au fait que le débit maximum utilisé était de 0,7 mL / min. En théorie, cette technique exige un débit de 1 mL / minute. A noter que les auteurs Legaz et al. (1986) mentionnent un problème similaire. Ils devaient augmenter de 1,0 à 1,5 mL / min. leur débit afin de contrer le pic

**TABLEAU VIII**  
**Composés polyphénoliques identifiés dans**  
*Usnea filipendula*

Classe de Rf			Composés	Rf : 100 * valeurs <sup>a</sup>			Coloration (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
A	B	C		A	B	C	
2	2	2	Acide salazinique	12/41,78	7/28,77	5/31,82	Jaune
6	6	6	Acide usnique	72/41,77	69/28,77	73/32,82	Jaune

**a:** Les deux nombres suivant l'oblique (/) correspondent aux valeurs des Rf de l'acide norstique et de l'atranorine.

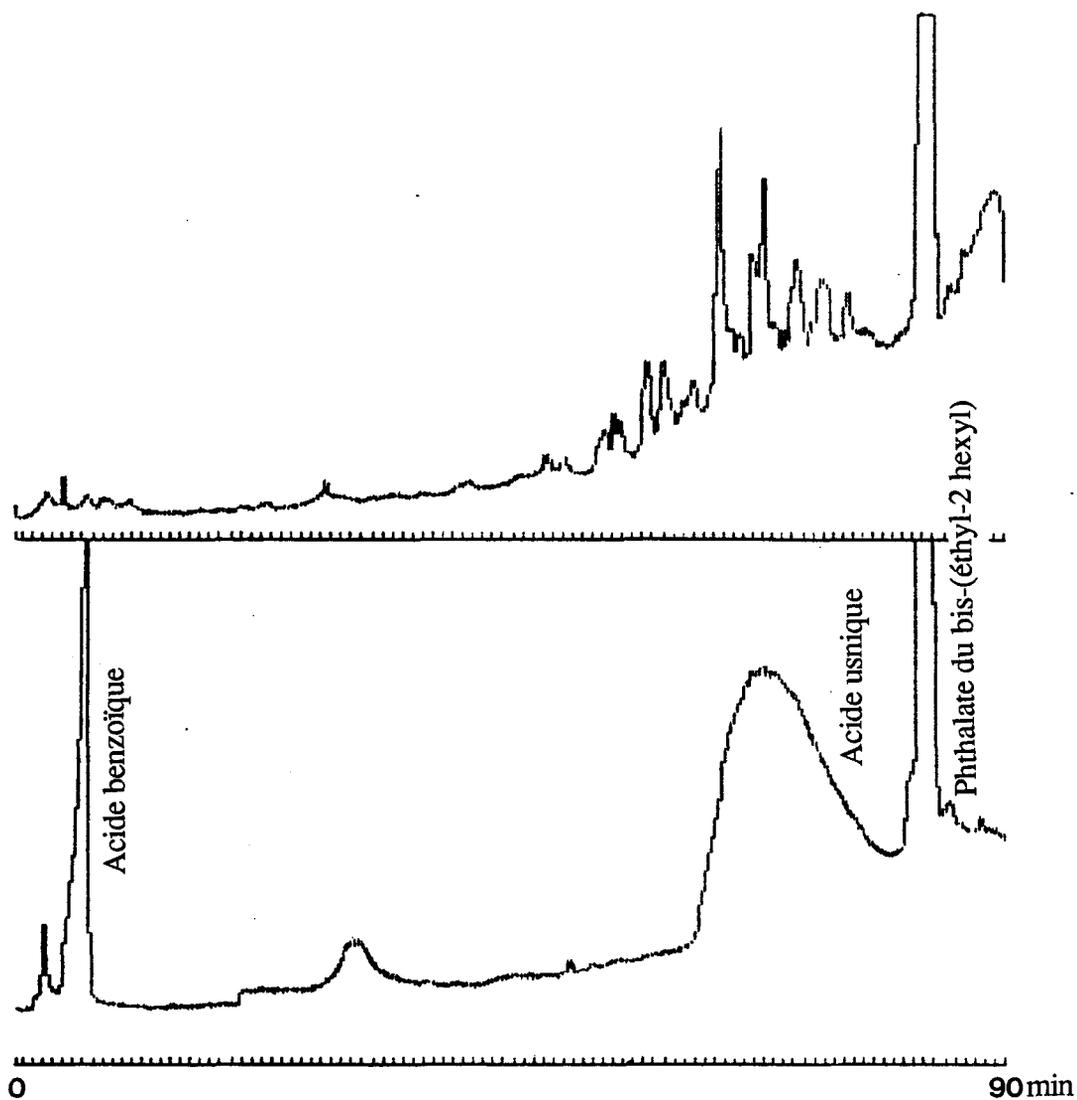


Figure 18: Chromatogramme de l'extrait d'*Usnea filipendula* obtenu par chromatographie liquide à haute performance phase inversée.

large et irrégulier de l'acide usnique en pic Gaussien. A titre de comparaison, les extraits ont été excités et suivis par leur émission de fluorescence (tableau III). Le résultat revêt certainement une grande importance puisque les composés depsidiques démontrent une meilleure sensibilité. La détermination de conditions maximums de détection permettrait certainement une analyse qualitative et quantitative supérieure des composés polyphénoliques lourds. La caractérisation de l'acide salazinique (en corrélation avec les valeurs de Rf de l'acide norstictique et de l'atranorine) a été assurée uniquement à l'aide de la technique d'adsorption sur gel de silice. L'absence de détection de ce constituant acide en chromatographie liquide à haute performance peut être expliquée par divers facteurs dont la faible concentration initiale du produit, le faible volume de 20 µl injecté et le diamètre interne de 4,6 mm de la colonne par opposition à 175 µl et 4 mm, respectivement. L'acide salazinique, qui constitue un produit largement répandu chez les populations de lichens, a été observé dès 1936 ( voir Schindler dans Culberson 1969; Skult, 1984).

La coloration verdâtre et jaune brun, développée par l'acide sulfurique reliée à la structure chimique des divers composés, a facilité l'identification du dérivé benzofuranne et du depsidone de type bêta-orcinol. Par contre, la distinction de quatre taches jaunâtres sur chacun des chromatogrammes développés dans les trois systèmes de solvant et la double extraction de l'échantillon avec le benzène et l'acétone n'ont pu permettre la caractérisation de ces quatre taches.

### 3.3.3.2 *Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik) et *Bryoria furcellata* (Fr.)

Parmi les composés identifiés chez *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata* (tableau IX), seul le chloroatranorine n'a pu être confirmé d'après les données décrites dans

la littérature. Sa valeur de Rf très similaire à celle de l'atranorine, les deux para-depsides de série bêta-orcinol doivent être confondus. L'analyse en chromatographie liquide à haute performance phase renversée (figure 19) démontre la présence en trace de l'atranorine. Par contre, la présence du chloroatranorine, de même que celle des méta-depsides de type bêta-orcinol, de l'acide alectorialique et de l'acide barbatolique, ne peut être confirmée puisque les temps de rétention de ces derniers composés n'ont pas été déterminés par Huovinen et al. (1985). Pour sa part, l'acide fumarprotocétrarique présente un temps de rétention de 0,51 comparativement à 0,50. Ce dernier depsidone de série bêta-orcinol constitue une substance amère et possède des fonctions antiherbivores de répulsion (Reutimann et Scheidegger, 1987). L'effet nuisible des composés polyphénoliques lourds des lichens sur leurs hôtes est communément accepté, bien qu'il n'y ait aucun énoncé explicite de leur action. Les auteurs Avalos et al. (1986) estiment qu'une translocation des composés depsidiques dans le xylème des branches de chêne arrête la production de biomasse.

Malgré le nombre de composés phénoliques caractérisés, les chromatogrammes de l'extrait étudié montrent encore une demi-douzaine de taches à identifier. Les valeurs de Rf pour chacun des trois systèmes de solvant ont été déterminées pour deux d'entre elles.

**TABLEAU IX**  
**Composés polyphénoliques identifiés dans**  
*Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata*

Classe de Rf			Composés	Rf : 100 * valeurs <sup>a</sup>			Coloration (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
A	B	C		A	B	C	
1-2	3	2	Acide fumarproto- cétrarique	24/2,77	24/28,77	9/31,81	Gris-brun
2	5	3	Acide barbatolique	8/42,78	50/31,77	23/31,82	Jaune
3	3	2	Inconnu	26/42,78	29/31,77	9/31,82	Bleuâtre
3	5	3	Acide alectorialique	38/41,78	46/29,77	32/32,82	Brunâtre
5	5	5-6	Inconnu	57/42,77	53/31,77	57/31,83	Orangé
7	7	7	Atranorine	77/42,77	77/28,77	82/31,82	Verdâtre

<sup>a</sup>: Les deux nombres suivant l'oblique (/) correspondent aux valeurs des Rf de l'acide norstique et de l'atranorine.

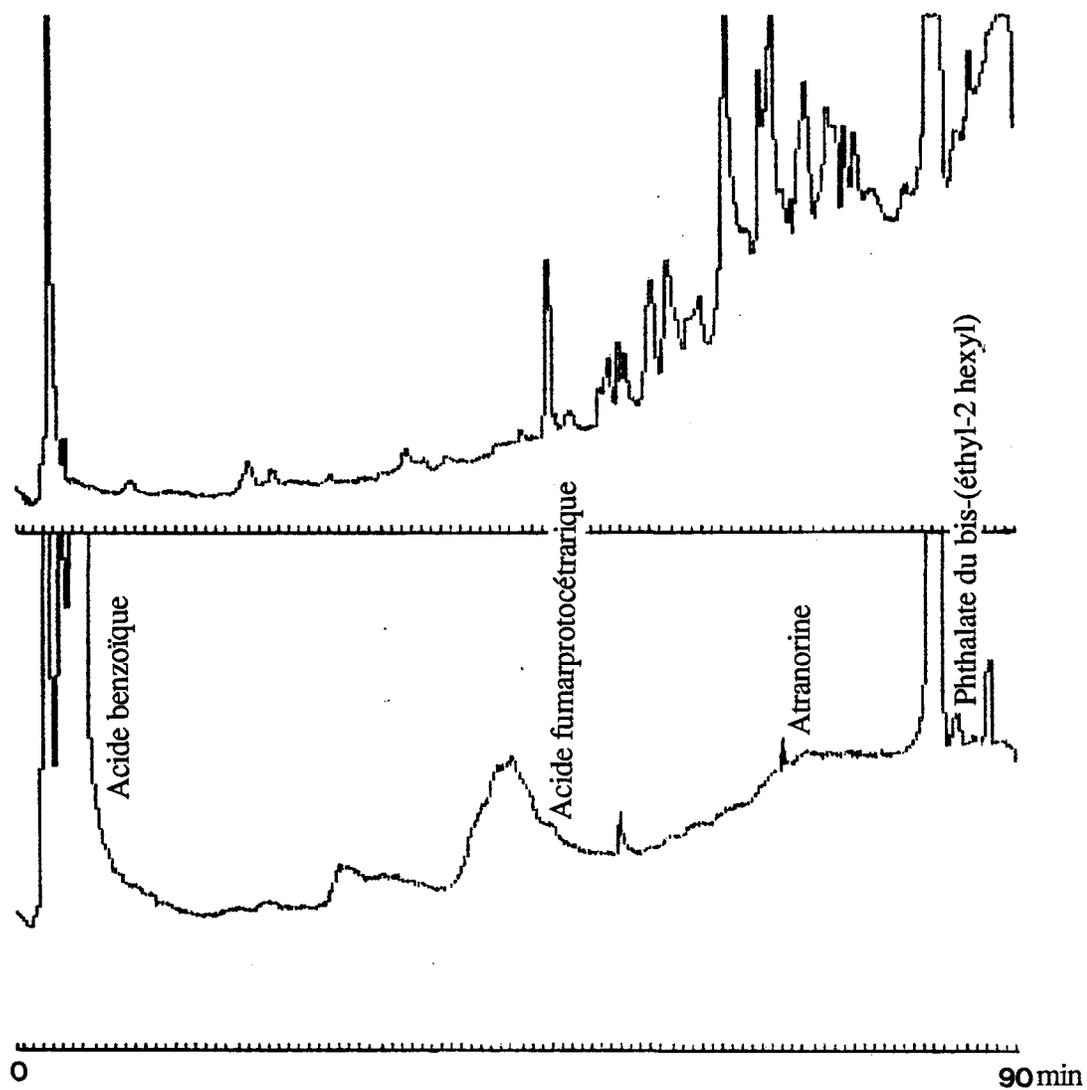


Figure 19: Chromatogramme de l'extrait de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata* obtenu par chromatographie liquide à haute performance phase inversée.

### 3.4 Analyse quantitative

#### 3.4.1 Composition relative de l'huile essentielle

##### 3.4.1.1 *Usnea filipendula* (Stirton)

L'analyse de la composition relative des constituants de l'huile essentielle d'*Usnea filipendula*, recueillie par hydrodistillation et n'ayant subi aucun traitement préalable d'humidification, a été effectuée à partir de la récolte du mois d'août. La quantification a été exprimée en pourcentage d'aire sous les pics chromatographiques par rapport à la somme des aires des composants apparaissant dans le tableau X. L'erreur expérimentale sur le pourcentage relatif des aires des pics a été calculée en fonction de l'écart type obtenu par la moyenne de deux essais. Ces valeurs sont également présentées au tableau X. Parmi les composés caractérisés, l'heptanone-2, le méthyl-6 dihydroxy-2,4 formyl-3 benzoate de méthyle et l'inconnu 12 constituent des produits mineurs. Par contre, le N,N-diéthyl méthyl-3 benzamide est retrouvé majoritairement en cette période de l'année, suivi de l'hexanal, du diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle et du (E)-méthyl-6 undécène-3. Ajoutons que le benzaldéhyde, l'heptène-1 ol-3, l'inconnu 11, le diméthyl-1,5 cyclooctane, le trans décène-2 al et l'inconnu 28 représentent un fort pourcentage dans la composition de l'huile essentielle.

##### 3.4.1.2 *Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik) et *Bryoria furcellata* (Fr.)

La quantification (pourcentage relatif des aires des pics) des composants de l'huile essentielle de genre *Bryoria* a également été réalisée en utilisant les valeurs d'aire sous les

**TABLEAU X**  
**Composition relative de l'huile essentielle**  
**d'*Usnea filipendula***

No	Constituants	Pourcentage relatif des aires des pics (%)	Erreur (%)
1	Hexanal	7,99 - 8,13	1,2
2	Méthyl-7 octène-1	1,16 - 1,36	11,2
3	Heptanone-2	0,43 - 0,49	9,1
4	Inconnu	2,07 - 2,11	1,3
5	Alpha pinène	2,32 - 3,65	31,5
6	benzaldéhyde	3,90 - 4,17	4,7
7	Bêta pinène	1,77 - 1,87	3,9
8	Heptène-1 ol-3	3,46 - 3,91	8,6
9	Inconnu	1,23 - 1,29	3,3
10	(E,E)-heptadiène-2,4 al	1,38 - 1,40	1,0
11	Inconnu	3,73 - 4,06	6,0
12	Inconnu	0,51 - 1,13	53,4
13	Méthyl-1 octahydro pentalène	1,00 - 1,11	7,4
14	Benzèneacétaldéhyde	2,28 - 2,31	0,9
15	Inconnu	2,74 - 3,17	10,3
16	Inconnu	1,12 - 1,27	8,9
17	Diméthyl-1,5 cyclooctane	3,76 - 4,27	9,0
18	(E)-méthyl-6 undécène-3	6,60 - 6,75	1,6
19	Nonène-2 al	1,55 - 1,71	6,9
20	Inconnu	2,77 - 3,74	21,1
21	(Méthyl-1 propyl)-1 (méthyl-2 butyl)-1 cyclopropane	1,24 - 1,77	24,9
22	Trans décène-2 al	4,52 - 4,88	5,4

**TABLEAU X (SUITE)**  
**Composition relative de l'huile essentielle**  
**d'*Usnea filipendula***

No	Constituants	Pourcentage relatif des aires des pics (%)	Erreur (%)
23	Inconnu	2,48 - 2,77	7,8
24	Undécène-2 al	1,43 - 1,64	9,6
25	Inconnu	3,15 - 3,36	4,5
27	Inconnu	1,58 - 1,81	9,6
28	Inconnu	3,73 - 3,77	0,7
29	Biphényl-1,1' ol-2	2,09 - 2,46	11,5
30	Inconnu	0,97 - 1,48	29,5
32	N,N-diéthyl méthyl-3 benzamide	8,60 - 11,44	20,0
33	Benzophénone	2,97 - 3,83	17,9
34	Méthyl-6 dihydroxy-2,4 formyl-3 benzoate de méthyle	0,53 - 0,60	8,7
35	Cyclodécanol	1,56 - 1,82	10,9
36	Diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle	6,69 - 7,16	4,8

Les numéros identifiant les constituants sont ceux apparaissant à la figure 14.

pics chromatographiques par rapport à la somme des trente-quatre composés identifiés (tableau XI). Les lichens (récolte d'août) ont été soumis au protocole usuel d'extraction par entraînement à la vapeur. Cependant, l'un des deux essais étudiés a été humidifié à l'eau tiède. La reproductibilité du pourcentage des aires des pics, calculée à partir de l'écart type des deux chromatogrammes analysés, est sensiblement faible. Cette variation est principalement associée à l'étape préalable d'humidification, bien que l'hydrodistillation et le mode d'injection manuelle de partage ne doivent pas être sous-estimés. Du point de vue quantitatif, le biphényl-1,1' ol-2, le (E,E)-heptadiène-2,4 al, l'inconnu 12, l'inconnu 28, l'heptanone-2 et le méthyl-1 octahydro pentalène ne représentent qu'une très faible proportion de l'extrait recueilli. Le diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle, l'inconnu 27 et le N,N-diéthyl méthyl-3 benzamide apparaissent parmi les composés majeurs. Finalement, l'hexanal, le benzaldéhyde, l'inconnu 11, le benzèneacétaldéhyde, le (E)-méthyl-6 undécène-3, le trans décène-2 al et le méthyl-6 dihydroxy-2,4 formyl-3 benzoate de méthyle enregistrent des valeurs d'aire relativement élevées sous les pics chromatographiques.

Tel que mentionné précédemment, la comparaison de la composition relative des huiles essentielles des lichens de genre *Usnea* et *Bryoria* (voir figure 14 et 15) permet de les différencier quantitativement. A titre d'exemple, l'inconnu 27 et le méthyl-6 dihydroxy-2,4 formyl-3 benzoate de méthyle montrent une forte teneur dans les extraits de *Bryoria* en été, alors qu'un très faible pourcentage est retrouvé chez *Usnea* pour la même période. Par contre, l'inconnu 28, un constituant mineur dans les lichens brunâtres, figure comme composant abondant dans la composition des lichens verdâtres. Ajoutons que la quantité de diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle récoltée chez les thalles de *Bryoria* est plus considérable.

**TABLEAU XI**  
**Composition relative de l'huile essentielle**  
**de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata***

No	Constituants	Pourcentage relatif des aires des pics (%)	Erreur (%)
1	Hexanal	3,21 - 6,35	46,4
2	Méthyl-7 octène-1	0,96 - 1,34	23,4
3	Heptanone-2	0,30 - 0,45	28,3
4	Inconnu	0,72 - 1,12	30,8
5	Alpha pinène	0,69 - 1,33	44,9
6	benzaldéhyde	1,59 - 3,60	54,8
7	Bêta pinène	0,53 - 1,18	53,8
8	Heptène-1 ol-3	1,02 - 2,00	45,9
9	Inconnu	0,56 - 0,90	32,9
10	(E,E)-heptadiène-2,4 al	0,14 - 0,22	31,7
11	Inconnu	3,00 - 4,06	21,2
12	Inconnu	0,30 - 0,37	14,6
13	Méthyl-1 octahydro pentalène	0,35 - 0,49	23,6
14	Benzèneacétaldéhyde	3,34 - 3,47	2,7
15	Inconnu	1,22 - 1,89	30,5
16	Inconnu	0,69 - 1,25	40,8
17	Diméthyl-1,5 cyclooctane	1,36 - 2,05	28,6
18	(E)-méthyl-6 undécène-3	4,48 - 5,32	12,1
19	Nonène-2 al	1,16 - 1,87	33,1
20	Inconnu	1,67 - 2,89	37,9
21	(Méthyl-1 propyl)-1 (méthyl-2 butyl)-1 cyclopropane	1,55 - 1,62	3,1
22	Trans décène-2 al	3,43 - 4,58	20,3

**TABLEAU XI (SUITE)**  
**Composition relative de l'huile essentielle**  
**de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata***

No	Constituants	Pourcentage relatif des aires des pics (%)	Erreur (%)
23	Inconnu	1,75 - 2,60	27,6
24	Undécène-2 al	0,86 - 1,12	18,6
25	Inconnu	2,04 - 4,15	48,2
27	Inconnu	12,78 - 18,36	25,3
28	Inconnu	0,31 - 0,43	23,0
29	Biphényl-1,1' ol-2	0,07 - 0,12	36,8
30	Inconnu	0,36 - 1,01	67,2
32	N,N-diéthyl méthyl-3 benzamide	8,90 - 10,17	9,4
33	Benzophénone	0,78 - 1,20	30,0
34	Méthyl-6 dihydroxy-2,4 formyl-3 benzoate de méthyle	3,38 - 3,98	11,5
35	Cyclodécanol	0,86 - 1,26	26,7
36	Diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle	19,52 - 23,37	12,7

Les numéros identifiant les constituants sont ceux apparaissant à la figure 15.

### 3.4.2 Composition relative des essences concrètes

#### 3.4.2.1 *Usnea filipendula* (Stirton)

Les constituants des essences concrètes d'*Usnea filipendula* caractérisés dans les fractions extraites au toluène et à l'éther diéthylique ont été quantifiés en fonction du pourcentage relatif des aires des pics chromatographiques obtenu à partir de la sommation respective des composants identifiés dans chacune des deux fractions. La composition relative des résinoïdes est présentée au tableau XII. Sur le plan quantitatif, la concentration du méthyl-4 pentène-3 al, du méthyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol, du diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle retrouvée dans la concrète toluïque est très faible en comparaison de celle de la concrète éthérodéthylque. Toutefois, la surface de l'aire sous le pic du méthyl benzène relevée sur le chromatogramme de l'extrait au toluène est plus grande que celle enregistrée par l'extrait à l'éther diéthylique. Mentionnons que le méthyl-6 tridécane, le méthyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol et le diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle constituent les composants majeurs de la fraction éthérodéthylque. Notons également que le méthyl-4 pentène-3 al et l'éthyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol représentent un fort pourcentage de l'extrait. Parmi les produits les plus abondants de la concrète toluïque, soulignons l'importance particulière du méthyl benzène, suivi du diméthyl-1,3 benzène, de l'éthyl benzène, du benzaldéhyde, du méthoxy phénol, du benzèneméthanol et du diméthyl-1,2 benzène.

**TABLEAU XII**  
**Composition relative des essences concrètes**  
**d'*Usnea filipendula***

No	Constituants	Pourcentage relatif des aires des pics (%)	
		Concrète Éthérodiiéthylique	Concrète Toluique
1	Méthyl benzène	0,76	73,39
2	Méthyl-4 pentène-3 al	4,45	0,02
3	Ethyl benzène		9,45
4	Diméthyl-1,3 benzène		10,62
5	Diméthyl-1,2 benzène		0,55
6	Butoxy-2 éthanol	0,55	
7	Alpha pinène	0,22	
8	Benzaldéhyde		2,38
9	Méthyl-2 octanone-4		0,06
10	Bêta pinène	0,10	
11	Triméthyl-1,2,3 benzène		0,07
12	Benzèneméthanol		0,68
13	Tétraméthyl-2,2,3,4 pentane	0,39	0,05
14	Méthoxy phénol		2,38
15	(Hydroxy-2 méthyl-1 éthyl)-1 diméthyl-2,2 méthyl-2 propanoate de propyle	0,62	0,04
16	Triméthyl-2,4,4 hydroxy-3 méthyl-2 propanoate de pentyle	0,78	0,05
17	Méthyl-3 tridécane	1,23	
18	Triméthyl-2,7,10 dodécane	1,98	

**TABLEAU XII (SUITE)**  
**Composition relative des essences concrètes**  
**d'*Usnea filipendula***

No	Constituants	Pourcentage relatif des aires des pics (%)	
		Concrète Éthérodiéthylique	Concrète Toluïque
19	Méthyl-6 tridécane	45,14	
20	Méthyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol	21,46	0,04
21	Ethyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol	3,83	
22	Cyclodécanol	0,25	0,03
23	Diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle	18,24	0,19

Les numéros identifiant les constituants sont ceux apparaissant à la figure 16.

### 3.4.2.2 *Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik) et *Bryoria furcellata* (Fr.)

L'analyse de la composition relative des essences concrètes des thalles *Bryoria*, extraits au toluène et à l'éther diéthylique, a également été décrite par le pourcentage relatif des aires des pics calculées par rapport à la somme des composés caractérisés pour chacune des fractions (tableau XIII). La forte teneur du méthyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol et du diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle démontre le caractère sélectif et particulier d'extraction de l'éther diéthylique, en raison de la faible quantité recueillie dans l'extrait au toluène. Par contre, le méthyl benzène révèle une concentration plus élevée dans la concrète toluïque que dans celle éthérodéthylique. Ce dernier composé est d'ailleurs majoritairement présent dans la fraction de toluène. Toutefois, les produits éthyl benzène, diméthyl-1,3 benzène, benzaldéhyde et méthoxy phénol montrent également une teneur significative. Le méthyl-6 tridécane correspond à la surface d'aire sous le pic chromatographique la plus élevée dans la fraction extraite à l'éther diéthylique, suivi principalement par le méthyl-3 tridécane, le méthyl-4 pentène-3 al, le diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle, le méthyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol, le méthyl benzène et l'éthyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol.

L'analyse du pourcentage relatif des aires des constituants décrit dans les résinoïdes des lichens *Usnea* et *Bryoria* (voir figure 16 et 17), présente quelques variations. La concentration du méthyl benzène, du méthyl-4 pentène-3 al et du méthyl-3 tridécane est plus élevée dans l'essence concrète éthérodéthylique des lichens brunâtres par opposition aux faibles teneurs relevées chez les lichens verdâtres. Notons également que la proportion du méthyl-6 tridécane, du méthyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol et du diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle est plus importante dans les thalles *Usnea*. La

**TABLEAU XIII**  
**Composition relative des essences concrètes**  
**de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata***

No	Constituants	Pourcentage relatif des aires des pics (%)	
		Concrète Ethérodiiéthylique	Concrète Toluïque
1	Méthyl benzène	3,68	70,33
2	Méthyl-4 pentène-3 al	14,58	
3	Ethyl benzène		9,41
4	Diméthyl-1,3 benzène		10,61
5	Diméthyl-1,2 benzène		0,56
6	Butoxy-2 éthanol	0,35	
7	Alpha pinène	0,15	
8	Benzaldéhyde		3,04
9	Méthyl-2 octanone-4		0,07
10	Triméthyl-1,2,3 benzène		0,08
11	Benzèneméthanol		0,59
12	Tétraméthyl-2,2,3,4 pentane	0,27	0,01
13	Méthoxy phénol		4,68
14	(Hydroxy-2 méthyl-1 éthyl)-1 diméthyl-2,2 méthyl-2 propanoate de propyle	1,07	0,09
15	Triméthyl-2,4,4 hydroxy-3 méthyl-2 propanoate de pentyle	0,26	0,11
16	Méthyl-3 tridécane	15,52	
17	Triméthyl-2,7,10 dodécane	0,28	

**TABLEAU XIII (SUITE)**  
**Composition relative des essences concrètes**  
**de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata***

No	Constituants	Pourcentage relatif des aires des pics (%)	
		Concrète Ethérodiéthylique	Concrète Toluique
18	Méthyl-6 tridécane	38,47	
19	Méthyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol	10,23	0,10
20	Ethyl-4 (diméthyl-1,1 éthyl) bis-2,6 phénol	3,28	
21	Cyclodécanol	0,40	0,04
22	Diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle	11,46	0,28

Les numéros identifiant les constituants sont ceux apparaissant à la figure 17.

composition des concrètes toluïques des genres *Usnea* et *Bryoria* est relativement similaire, bien que la teneur du benzaldéhyde et du méthoxy phénol retrouvée dans *Usnea* soit sensiblement plus faible.

### 3.4.3 Variation saisonnière de l'huile essentielle

#### 3.4.3.1 *Usnea filipendula* (Stirton)

La qualité et la reproductivité des essences odoriférantes constituent des éléments essentiels afin de reproduire avec fidélité les mélanges élaborés de parfums. Or, un problème important de l'industrie de la parfumerie est celui de la qualité, rarement constante, des matières premières livrées. L'environnement où se développent les végétaux détermine leur contenu chimique. Parmi les facteurs qui influencent la variation des constituants chimiques chez les populations de lichens, divers auteurs décrivent l'intensité lumineuse, le taux d'humidité, l'âge des thalles, la région échantillonnée et la température (Vicente et Avalos, 1986; Mirando et Fahselt, 1978; Stepanenko *et al.*, 1985; Legaz *et al.*, 1986; Ramaut et Corvisier, 1971; Hamada, 1983).

Le climat québécois étant très particulier, une étude saisonnière de l'évolution de la composition chimique de l'huile essentielle d'*Usnea filipendula* a été réalisée par entraînement à la vapeur d'eau à partir de lichens séchés. D'après la recherche bibliographique effectuée, très peu d'informations concernant l'effet de température de l'habitat sur la concentration des substances volatiles ont été publiées alors que plusieurs articles traitent de la variation annuelle de composés phénoliques lourds. Seuls les constituants de l'huile dont un degré d'ajustement des spectres était assuré par un fit de 900 ou plus d'après la banque de données du CG-Cap-SM, ou encore dont l'identité a été

confirmée à l'aide de standards, ont été quantifiés en comparant l'aire sous les pics chromatographiques avec l'aire du pic du standard interne (tétradécane). Pour chacune des périodes climatiques de l'année, l'expérience a été réalisée en duplicata. La figure 20 présente les variations de concentrations des constituants de l'huile essentielle d'*Usnea filipendula* en fonction des saisons. Le pourcentage d'erreur des concentrations saisonnières, calculé à partir de l'écart type des deux essais, varie de 0,0% à un maximum de 66,0% pour obtenir une erreur moyenne annuelle de 16,3%. La reproductivité des résultats relativement significative permet d'estimer que les conditions d'expérimentation sont satisfaisantes. Toutefois, un mode d'injection automatique de tête de colonne (on column) éliminerait les erreurs attribuables à la manipulation.

De façon globale, les résultats confirment la présomption des auteurs Legaz et al. (1986) sur l'importance de la température comme facteur de contrôle des activités métaboliques des lichens. En période hivernale, le diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle présente la teneur la plus forte des constituants de l'huile essentielle et le N,N-diéthyl méthyl-3 benzamide montre la teneur la plus faible. Ajoutons que les composés trans décène-2 al et benzaldéhyde révèlent des concentrations relativement élevées comparativement à l'alpha pinène, au bêta pinène, à l'heptanone -2 et au (E,E)-heptadiène-2,4 al présents à l'état de traces. En période printanière, le benzaldéhyde enregistre la concentration la plus élevée, tout en offrant une teneur plus faible en été et en automne qu'en hiver. En comparant les valeurs de la concentration du trans décène-2 al et du nonène-2 al, le même profil de variation est noté. Lors de la même période (printemps), une augmentation importante de la proportion d'hexanal est enregistrée avant d'atteindre en automne le plus haut pourcentage annuel des divers constituants. En période estivale, la concentration des produits terpéniques augmente considérablement alors que le biphenyl-1,1' ol-2 montre une chute majeure. D'autre part, l'importante apparition du N-N-diéthyl

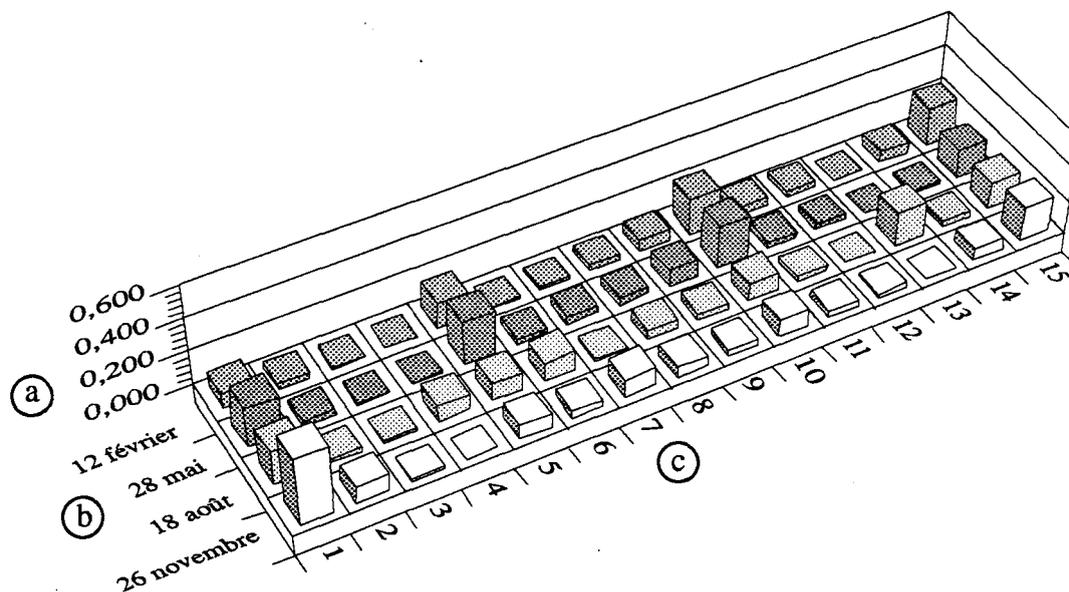


Figure 20: Variation saisonnière de la concentration de divers composants présents dans l'huile essentielle d'*Usnea filipendula*.

- a: Concentration exprimée en mg/200g de poids sec
- b: Dates de collecte des échantillons
- c: Les numéros identifiant les colonnes sont ceux apparaissant dans le tableau XIV

**TABLEAU XIV**  
**Composants quantifiés dans l'huile essentielle**  
**d'*Usnea filipendula***

No	Composants
1	Hexanal
2	Méthyl-7 octène-1
3	Heptanone-2
4	Alpha pinène
5	Benzaldéhyde
6	Bêta pinène
7	(E,E)-heptadiène-2,4 al
8	Benzèneacétaldéhyde
9	Nonène-2 al
10	Trans décène-2 al
11	Undécène-2 al
12	Biphényl-1,1' ol-2
13	N,N-diéthyl méthyl-3 benzamide
14	Cyclodécanol
15	Diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle

méthyl-3 benzamide, en cette saison, représente probablement la réserve principale d'azote des lichens. Bien que la biosynthèse d'un tel composé amidé puisse être réalisable par ces végétaux, il faudrait, pour expliquer sa présence en août, connaître exactement la composition chimique de l'écorce et des épines du sapin baumier (*Abies balsamea*) de même que les besoins métaboliques des lichens. La concentration maximum du méthyl-7 octène-1, du (E,E)-heptadiène-2,4 al et du cyclodécanol est atteinte pendant la période automnale. La comparaison entre les différentes périodes saisonnières ne démontre guère de variations nettes de concentration en benzèneacétaldéhyde et en undécène-2 al bien qu'il existe une petite diminution et augmentation respectives de la teneur de ces composés en hiver.

#### 3.4.3.2 *Bryoria nadvornikiana* (Gyelnik) et *Bryoria furcellata* (Fr.)

La relation métabolique postulée entre la variation de concentration des constituants lichéniques et le phénomène de fluctuation saisonnière des températures est également reproduite chez les thalles de *Bryoria*. Les résultats sont résumés à la figure 21. Mentionnons que le taux d'erreur, associé à la reproductivité de la concentration des deux essais, varie de 2,9% à 70,7% pour donner une moyenne de 24,2%. L'accumulation importante du diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle se retrouve tout au long de l'année. Ce dernier composé atteint une teneur minimum de 0,56 mg / gramme de lichen sec au printemps et montre la teneur la plus élevée de 1,18 mg / gramme de lichen sec en automne. En période estivale, l'apparition majeure du N,N-diéthyl méthyl-3 benzamide, de même que les concentrations élevées de l'alpha pinène et du bêta pinène pour chacune des espèces de lichens étudiées, révèle l'importance particulière des températures chaudes. En période hivernale, le nonène-2 al et le trans décène-2 al accusent des taux élevés tout en présentant une chute en mai et août pour enregistrer un minimum en automne. Ajoutons que

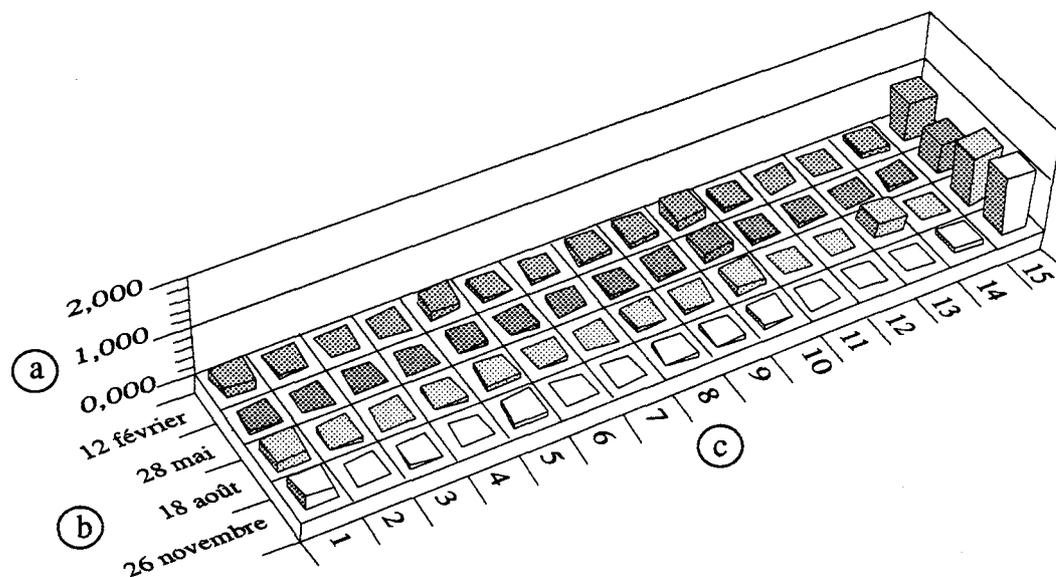


Figure 21: Variation saisonnière de la concentration de divers composants présents dans l'huile essentielle de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata*.

- a: Concentration exprimée en mg/200g de poids sec
- b: Dates de collecte des échantillons
- c: Les numéros identifiant les colonnes sont ceux apparaissant dans le tableau XV

**TABLEAU XV**  
**Composants quantifiés dans l'huile essentielle**  
**de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata***

No	Composants
1	Hexanal
2	Méthyl-7 octène-1
3	Heptanone-2
4	Alpha pinène
5	Benzaldéhyde
6	Bêta pinène
7	(E,E)-heptadiène-2,4 al
8	Benzèneacétaldéhyde
9	Nonène-2 al
10	Trans décène-2 al
11	Undécène-2 al
12	Biphényl-1,1' ol-2
13	N,N-diéthyl méthyl-3 benzamide
14	Cyclodécanol
15	Diméthyl-3,6 dihydroxy-2,4 benzoate de méthyle

la comparaison entre les différents constituants des huiles essentielles des lichens brunâtres permet de signaler la nette prédominance de produits aldéhydiques en saison froide. Le benzaldéhyde, le (E,E)-heptadiène-2,4-al, le benzèneacétaldéhyde, et le undécène-2 al présentent tous des profils de variations similaires, en offrant de plus faibles pourcentages de concentration en novembre qu'en février. Par contre, les composés hexanal, méthyl-7 octène-1 et heptanone-2 montrent une diminution progressive des concentrations en février et en mai pour ensuite augmenter en été et atteindre un maximum en novembre. En mai, le cyclodécanol présente la teneur la plus faible alors que le biphényl-1,1' ol-2 accuse la teneur la plus forte pour ensuite apparaître en traces le reste de l'année.

**CHAPITRE IV**

**CONCLUSION**

L'analyse des huiles essentielles des thalles d'*Usnea filipendula*, de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata* a permis d'établir qu'effectivement les pratiques de séchage et d'humidification des matières lichéniques assurent un meilleur développement des produits odoriférants de même qu'une extraction plus rapide et plus poussée. La comparaison entre différents solvants, en fonction du caractère sélectif d'extraction des huiles obtenues par entraînement à la vapeur, révèle la meilleure efficacité du pentane et de l'éther de pétrole. Par contre, les solvants éther diéthylique et toluène permettent une sélectivité distincte et plus importante des composés de l'essence concrète.

Les techniques d'extraction par hydrodistillation, par hydrodiffusion et par les solvants organiques ont permis l'isolement sélectif de différentes fractions odoriférantes des lichens fruticuleux recueillis. Au total, plus de 80 composés neutres volatils séparés sur colonne apolaire DB-5 ont été identifiés ou encore suggérés par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire couplée à la spectrométrie de masse et par comparaison avec les spectres des composés purs. Mentionnons que l'alpha pinène, le bêta pinène, le benzaldéhyde, le nonène-2 al, le trans décène-2 al et le undécène-2 al ont également été caractérisés dans l'espèce *Evernia prunastri*. Les techniques de chromatographie liquide à haute performance, phase renversée et d'adsorption sur couche mince de gel de silice, ont assuré, quant à elles, l'identification des composés polyphénoliques lourds (depsides, depsidones) présents avant le développement des différents principes odorants.

L'étude du pourcentage relatif des aires des pics chromatographiques des constituants identifiés dans les huiles essentielles et les résinoïdes des lichens *Usnea* et *Bryoria* démontre des variations importantes dans la composition des extraits. Relevons principalement la forte teneur de l'inconnu 27 et du méthyl-6 dihydroxy-2,4 formyl-3 benzoate de méthyle dans les

huiles des lichens brunâtres en comparaison des très faibles concentrations enregistrés pour les lichens verdâtres. Notons particulièrement que le méthyl benzène, le méthyl-4 pentène-3 al et le méthyl-3 tridécane revêtent une grande importance quantitative dans l'essence concrète éthérodietiethylique des thalles *Bryoria*, alors qu'un très faible pourcentage en est retrouvé chez *Usnea*.

L'étude saisonnière des huiles essentielles jaunâtres extraites d'*Usnea filipendula*, de même que des huiles jaune brûlé extraites de *Bryoria nadvornikiana* et *Bryoria furcellata* démontre des variations importantes dans les concentrations des constituants chimiques en fonction des variations de température. Conséquemment, la période de récolte revêt une grande importance sur la fidélité et la reproductivité d'une huile car elle permet de profiter d'une augmentation ou d'une baisse naturelle de la teneur de certains composants.

Malgré le faible rendement et le pouvoir odorant non exploitable de cette ressource renouvelable, cette étude contribue à une meilleure connaissance du contenu en substances naturelles odorantes présentes chez ces populations de lichens vivant sur les conifères de nos forêts. La complexité de ces huiles essentielles soulève encore plusieurs interrogations. La poursuite d'une étude qualitative et quantitative des extraits obtenus par hydrodiffusion est encouragée. De plus, il serait intéressant d'analyser le rendement en acide usnique des thalles d'*Usnea filipendula* pour leur valeur possible dans la synthèse de produits chimiothérapeutiques.

## BIBLIOGRAPHIE

- Adachi, K., 1983. Synthesis of orcinol monomethyl ether. *Memoirs of the Osaka Institute of Technology, Series A, Science and Technology*, 28 (1) : 33-42.
- Arctander, S., 1960. *Perfume and flavor materials of natural origin*. N.J. (U.S.A.), Elizabeth, p.1-46, 445-456.
- Avalos, A.; Legaz, M.E.; Vicente, C., 1986. The occurrence of lichen phenolics in the xylem sap of *Quercus pyrenaica*, their translocation to leaves and biological significance. *Biochem. Syst. Ecol.*, 14 (4) : 381-384.
- Avalos, A.; Vicente, C., 1987. The occurrence of lichen phenolics in the photobiont cells of *Evernia prunastri*. *Plant Cell Rep.*, 6 (1) : 74-76.
- Bassiri, T., 1960. *Introduction à l'étude des parfums : matières premières aromatiques d'origine naturelle et de synthèse*. Paris, Masson et Cie, 278 p.
- Brodo, I.M.; Hawksworth, D., 1977. An international monograph series : *Alectoria* and allied genera in North America. *Opera botanica* 42, Publications in botany, no 6. National Museum of natural Sciences, National Museums of Canada, p. 103-106, 122-125.
- Brodo, I.M., 1981. *Lichens de la région d'Ottawa*. Traduit de l'anglais par Sylvie Lemieux. Syllogous n° 29, Musée national des sciences naturelles, Musées nationaux du Canada, p. 120-122.
- Culberson, C.F., 1970. Supplement to chemical and botanical guide to lichen products. *The Bryologist*, 73 (1) : 1-28.
- Culberson, C.F.; Kristinsson, H., 1970. A standardized method for the identification of lichen products. *J. Chromatogr.*, 46 : 85-93.

- Culberson, C.F., 1972 A. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thin-layer chromatographic method. *J. Chromatogr.*, 72 : 113-125.
- Culberson, C.F., 1972 B. High-speed liquid chromatography of lichen extracts. *The Bryologist*, 75 (1) : 54-62.
- Culberson, C.F., 1974. Conditions for the use of Merck silica gel 60 F<sub>254</sub> plates in the standardized thin-layer chromatographic technique for lichen products. *J. Chromatogr.*, 97 : 107-108.
- Culberson, C.F.; Culberson, W.L.; Johnson, A., 1977. Second supplement to chemical and botanical guide to lichen products. American bryological and lichennological society, p.2, 14-93, 345.
- Culberson, C.F.; Culberson, W.L., 1978. Beta-orcinol derivatives in lichens : biogenetic evidence from *Oropogon loxensis*. *Exp. Mycol.*, 2 (3) : 245-257.
- Culberson, C.F.; Ammann, K., 1979. Standardmethode zur Dünnschichtchromatographie von Flechtensubstanzen. *Herzogia*, 5 : 1-24.
- D'Astous, C., 1989. A la découverte des parfums. Québec, Éditions Québec / Amérique, 187 p.
- Elix, J.A.; Sargent, M.V.; Shimizu, Y.; Taylor, D.A.H.; Whitton, A.A., 1984. Fortschritte / Progress in the chemistry of organic natural products. New York, Springer-Verlag Wien, p.143-207.
- Frey, E., 1970. Les lichens. Petit atlas Payot Lausanne n° 62. Editions Payot Lausanne, p.18.
- Fédération québécoise de la montagne, 1979. Le parc des Laurentides. Mémoire présenté au ministère du tourisme, chasse et pêche. Audiences publiques 14-15-16 juin, Québec.
- Garcia-Junceda, E.; Gonzalez, A.; Vicente, C., 1985. Phenolics content of *Pseudevernia furfuracea*. Purification of the depsidone, physodic acid. *Phyton (Buenos Aires)*, 45 (2) : 153-158.

- Gavin, J.; Tabacchi, R., 1975. Isolation et identification de composés phénoliques et mono-terpéniques de la mousse de chêne (*Evernia prunastri* (L.) Ach.) 1ère communication. *Helv. Chim. Acta*, 58 (1) : 190-194.
- Gavin, J.; Nicollier, G.; Tabacchi, R., 1978. Composants volatils de la mousse de chêne (*Evernia prunastri* (L.) Ach.) 3e communication. *Helv. Chim. Acta*, 61 (1) : 352-357.
- Gonzalez, A.; Vicente, C.; Legaz, M.E., 1984. A simple assay demonstrating the effect of rehydration on the orsellinate depside hydrolase activity of *Evernia prunastri*. *J. Plant Physiol.*, 116 (3) : 219-224.
- Hale, M.E., 1979. How to know the lichens. Second Edition. USA, The Pictured Key Nature Series, p. 171-172.
- Hamada, N., 1983. The effect of temperature on lichen substances in *Ramalina subbreviscula* (lichens). *Bot. Mag.*, 96 (1042) : 121-126.
- Hunt, R.S.; Von Rudloff, E. 1974. Chemosystematic studies in the genus *Abies*. I. Leaf and twig oil analysis of alpine and balsam firs. *Can. J. Bot.*, 52 : 477-487.
- Huovinen, K.; Hiltunen, R.; Von Schantz, M., 1985. A high performance liquid chromatographic method for the analysis of lichen compounds from the genera *Cladina* and *Cladonia*. *Acta Pharm. Fenn.*, 94 (3) : 99-112.
- Huovinen, K.; Ahti, T., 1986 A. The composition and contents of aromatic lichen substances in the genus *Cladina*. *Ann. Bot. Fenn.*, 23 (2) : 93-106.
- Huovinen, K.; Ahti, T., 1986 B. The composition and contents of aromatic lichen substances in *Cladonia*, section *Unciales*. *Ann. Bot. Fenn.*, 23 (3) : 173-188.
- Jennings, W.; Shibamoto, T., 1980. Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. New York, Academic Press, 472 p.
- Legaz, M.E.; Avalos, A.; De torres, M.; Escribana, M.I.; Gonzalez, A.; Martin-Falquina, A.; Perezurria, E.; Vicente, C., 1986. Annual variations in arginine metabolism and phenolic content of *Evernia prunastri*. *Environ. Exp. Bot.*, 26 (4) : 385-396.

- Mirando, M.; Fahselt, D., 1978. The effect of thallus age and drying procedure on extractable lichen substances. *Can. J. Bot.*, 56 (13) : 1499-1504.
- Naves, Y.-R., 1974. Technologie et chimie des parfums naturels : essences concrètes, résinoïdes, huiles et pommades aux fleurs. Paris, Masson & Cie, 326 p.
- Nicollier, G.; Tabacchi, R., 1976. Isolement et identification de l'évernine dans la mousse de chêne (*Evernia prunastri* (L.) Ach.). Part 2. *Helv. Chim. Acta*, 59 (8) : 2979-2983.
- Nicollier, G.; Rebetez, M.; Tabacchi, R.; Gerlach, H.; Thalmann, A., 1978. Synthèse de l'évernine. *Helv. Chim. Acta*, 61 (8) : 2899-2904.
- Nicollier, G.; Tabacchi, R.; Gavin, J.; Breton, J.L.; Gonzalez, A.G., 1979. Triterpènes de la mousse de chêne (*Evernia prunastri* (L.) Ach.) 5e communication. *Helv. Chim. Acta*, 62 (3): 807-810.
- Ozenda, P.; Clauzade, G., 1970. Les lichens : Etude biologique et flore illustrée. Paris, Masson et Cie, p.653-654, 670-671.
- Racine, Ph.; Hartmann, V.E.; Tollard D'Audiffret, Y., 1980. Antioxidant properties of wax from Yugoslavian oakmoss (*Evernia prunastri*). *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2 (6) : 305-313.
- Ramaut, J.L.; Corvisier, M., 1971. Dosage spectrophotométrique de l'acide évernique chez *Evernia prunastri* (L.) Ach. *Bull. Soc. Roy. Sci. Liege*, 40 (5-8) : 385-388.
- Reutimann, P.; Scheidegger, C., 1987. Importance of lichen secondary products in food choice of two oribatid mites (*Acari*) in an alpine meadow ecosystem. *J. Chem. Ecol.*, 13 (2) : 363-369.
- Reyes Q., A.; Vicuna L., P.; Almonacid V., J., 1981. Usnic acid and atranorin in some regional lichens. *Rev. Latinoam. Quim.*, 12 (3-4) : 130-131.
- Ryhage, R.; Sydow, E., 1963. Mass spectrometry of terpenes I. Monoterpene Hydrocarbons. *Acta Chem. Scan.*, 17 : 2025-2035.

- Schulz, H.; Albroscheit, G., 1989. Characterization of oakmoss products used in perfumery by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 466 : 301-306.
- Seu-Salerno, M.; Blakeway, J., 1987. La mousse de chêne, une base de la parfumerie. *Pour la Science*, mai : 82-92.
- Skult, H., 1984. The *Parmelia omphalodes* (Ascomycetes) complex in Eastern Fennoscandia. Chemical and morphological variation. *Ann. Bot. Fenn.*, 21 (2) : 117-142.
- Stepanenko, L.S.; Krivoshchekova, O.; Mishchenko, N. P., 1985. Chemical variation of *Asahiena chrysantha*. *Phytochemistry*, 24 (2) : 354-355.
- Stoll, M.; Scherrer, W., 1937. Sur l'essence concrète de la mousse de chêne. *Comm. 17e Congr. Chimie Ind. Paris*, 17(29) : 205-212.
- Strack, D.; Feige, G.B.; Kroll, R., 1979. Screening of aromatic secondary lichen substances by high performance liquid chromatography. *Z. Naturforsch., C.: Biosci.*, 34 C (9-10) : 695-698.
- Tabacchi, R.; Nicollier, G., 1979. Contribution to the knowledge of the chemical composition of oakmoss (*Evernia prunastri* (L.) Ach.). *Int. Congr. Essent. Oils, (Pap.)*, 7th, Meeting Date 1977, volume 7 : 384-387.
- Ter Heide, R.; Provotoroff, N.; Traas, P.C.; De Valois, P.J.; Van der Plasse, N.; Wobben, H.J.; Timmer, R., 1975. Qualitative analysis of the odoriferous fraction of oakmoss (*Evernia prunastri*). *J. Agric. Food Chem.*, 23 (5) : 950-957.
- Thomson, J.W., 1984. *American Arctic lichens I. The macrolichens*. New York, Columbia University Press, p.60, 462-465.
- Touchstone, J.C.; Dobbins, M.F., 1978. *Practice of thin layer chromatography*. New York, John Wiley & Sons Inc., p.11.

- Vicente, C.; Legaz, M.E.; Paulo, M de Q.; Xavier Filho, L., 1984. Chemical differences between two ecotypes of *Parmelia tinctorum*. *Phyton* (Buenos Aires), 44 (2) : 121-124.
- Vicente, C.; Avalos, A., 1986. Light mediates accumulation of lichen phenolics in the *Evernia prunastri* thallus. *Symbiosis*, 1 (3) : 251-258.
- Xavier Filho, L.; Arruda, E.C.; Paulo, M.Q.; Legaz, M.E.; Vicente, C., 1984. Chemotaxonomical study on *Cladonia verticillaris* (Raddi.) Fr. and *Cladonia calycantha* (Del.) Nyl. *Phyton* (Buenos Aires), 44 (2) : 115-119.
- Xavier Filho, L.; Paulo, M.Q.; Pereira, E.C.; Vicente, C., 1985. Phenolics from tea fungus analyzed by high performance liquid chromatography. *Phyton* (Buenos Aires), 45 (2) : 187-191.

**ANNEXE I:**

Chromatogramme d'un extrait d'huile essentielle obtenu à partir des deux genres de populations de lichens recueillis.

