

2.6 Acknowledgements	55
2.7 References	56
2.8 Table List	58
2.9 Figure list	59
CHAPITRE III. ANALYSE DE L'IMPACT DE LA TORDEUSE DES BOURGEONS DE L'ÉPINETTE	
(<i>CHORISTONEURA FUMIFERANA CLEM.</i>) SUR LA CROISSANCE ET LA COMPOSITION	
CHIMIQUE DE SAPINS BAUMIERS (<i>ABIES BALSAMEA (L.) MILL</i>) EN MILIEU NATUREL..	
3.1 Résumé.....	65
3.2 Introduction	66
3.3 Méthodologie	69
3.3.1 Aire d'étude	69
3.3.1.1. Sites d'échantillonnages	69
3.3.1.2 Température et précipitations journalières	70
3.3.2 Méthodes d'échantillonnage	70
3.3.3 Récolte et conservation des échantillons	71
3.3.3.1 Aiguilles	71
3.3.3.2 Branches	71
3.3.3.3 Micro-carottes	72
3.3.3.4 Macro-carottes	72
3.3.4 Analyse des échantillons	72
3.3.4.1 Cerne de croissance	72
3.3.4.2 Terpènes	73
3.3.4.3 Analyse des sucres solubles totaux dans les aiguilles et le	
bois	73
3.3.4.4 Amidon dans les aiguilles et le bois	74
3.3.5 Analyses statistiques	75
3.4 Résultats	77
3.4.1. Contenu relatif en eau (CRE).....	77
3.4.2.2 Échantillons de bois	78

3.4.2.1 Échantillons d'aiguilles	78
3.4.2 Quantification des sucres solubles totaux dans les échantillons d'aiguilles et de bois	78
3.4.3 Quantifications de l'amidon dans les échantillons d'aiguilles et de bois	79
3.4.3.1 Échantillons d'aiguilles	79
3.4.3.2 Échantillons de bois	80
3.4.4 Formation du cerne de croissance	81
3.4.5 Mesure des cernes de croissance sur cinq années	83
3.4.6 Qualification des terpènes présents dans les échantillons d'aiguilles	84
3.4.6.1 Chromatogramme HS-GC et identification des composés	84
3.4.6.2 Variance des différents composés dans les échantillons	85
3.4.7 Quantification des monoterpènes sélectionnés dans les échantillons d'aiguilles	86
3.4.7.1 Premier composé analysé : δ -3-carène	86
3.4.7.2 Deuxième composé analysé : β -phellandrène	87
3.4.8 Discussion	88
3.4.8.1 Impact de la défoliation sur les composés de défense du sapin Baumier	88
3.4.8.1.1 Influence des glucides sur la synthèse des composés de défenses	88
3.4.8.1.2 Variation dans la synthèse du nombre de composés de défense en fonction de la défoliation	90
3.4.8.1.3 Synthèse des monoterpènes en réaction à la TBE	91
3.4.8.2 Impact de la défoliation sur la croissance intra-annuelle	92
3.4.8.2.1 Croissance en lien avec l'amidon et le SST	92
3.4.8.2.2 Autres facteurs	94

3.4.8.2.3 Mesure de croissance des cernes	94
3.4.9 Conclusion	95
3.4.10 Références	96
3.4.11 Liste des tableaux	99
3.4.12 Liste des figures	102
CHAPITRE IV. CONCLUSION GÉNÉRALE	114
4.1 Lien entre les concepts et les résultats	115
4.2 Références	118

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE II

2.1 Diameter (DBH 1.3m) and average height of the trees in the control site (C) and defoliated site (D).	58
--	----

CHAPITRE III

3.1 Représentation des principales caractéristiques des sites d'échantillonnage	100
3.2 Représentation des valeurs de probabilité obtenues par analyse ANOVA qui ont démontré une différence significative ($p < 0,05$) entre les dates d'échantillonnages pour sucres solubles totaux et l'amidon dans les aiguilles. NS : non significatif	100
3.3 Représentation des valeurs de probabilité obtenues par analyse ANOVA qui a démontré une différence significative ($p < 0,05$) entre les dates d'échantillonnages pour les analyses de sucres solubles totaux et d'amidon dans le bois. NS : non significatif ...	100
3.4 Représentation des différentes valeurs obtenues par analyse Gauss-Newton pour la croissance interannuelle des arbres à l'étude pour les trois sites.	101
3.5 Représentation des molécules visibles sur le chromatogramme HS-GC retrouvées dans les échantillons d'aiguilles des trois sites à l'étude	101

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I

1.1 La voie de synthèse des métabolites secondaires chez les végétaux (Waksmundzka-Hajnos M. et al. 2008).....	25
1.2 Représentation de la composition de l'huile essentielle du sapin baumier (Pichette A. et al. 2006). Les composés majoritaires présents dans cette huile sont le β -pinène et le δ -3-carène.....	26
1.3 Formule pour calculer l'indice de Kovats utilisée pour caractériser les composés organiques	27
1.4 Unité isoprène	28
1.5 Représentation des molécules servant à la synthèse des terpènes	29
1.6 Synthèse de IPP et du DMAPP à partir de l'acide mévanolique	29
1.7 Représentation de la synthèse de monoterpènes (droite) et de sesquiterpènes (gauche) (Bohlmann et al. 1998)	30
1.8 Représentation de la synthèse de quelques diterpènes (Bohlmann et al. 1998)	31
1.9 Voie de synthèse des différentes familles de terpènes (Bohlmann et al. 1998).....	31

CHAPITRE II

2.1 Traditional GC-MS chromatogram of essential oils from Balsam fir foliage: (1) Santene; (2) Tricyclene; (3) α -thujene; (4) α -pinene; (5) Camphene; (6) β -pinene; (7) β -myrcene; (8) δ -3-carene; (9) β -phellandrene; (10) Fenchone; (11) Terpinolene; (12) α -thujone; (13) Isopinocarveol; (14) Camphre; (15) Borneol; (16) Terpin-1-en-4-ol; (17) α -terpineol; (18) Piperitone; (19) Bornyl acetate; (20) Longifolene; (21) β -caryophyllene; (22) α -humulene; (23) α -bisabolene 60

2.2 HS-GC chromatogram of balsam fir foliage powder : (1) Tricyclene (2) α -pinene; (3) Camphene; (4) β -pinene; (5) β -myrcene; (6) δ -3-carene; (7) β -phellandrene; (8) Terpinolene; (9) Maltol; (10) Camphre; (11) Borneol; (12) Myrtenal; (13) Piperitone; (14) Geraniol standard; (15) Bornyl acetate; (16) Longifolene; (17) α -longipinene; (18) β -caryophyllene; (19) α -humulene; (20) α -bisabolene..... 61

2.3 Percentage of β -phellandrene (g/g) from foliage of balsam fir during 2011 growing season in samples analyzed for the control site and defoliated site on all selected trees. The grey section on the graph represents the period of defoliation 62

CHAPITRE III

3.4.12 Liste des figures

- 3.1 En haut : Représentation des sites d'échantillonnage situés à environ 30km de Chicoutimi (Saguenay) (I. Simard, Morin, & Lavoie, 2006). En bas : Les sites de à niveau de défoliation moyen ($48^{\circ} 16' 06.4''$ N, $71^{\circ} 14'' 29.6''$ W) et sévère ($48^{\circ} 16' 06.0''$ N, $71^{\circ} 14'' 52.5''$ W) sont situés à l'extérieur de la forêt Simoncouche 104
- 3.2 Température (courbe) et la somme des précipitations journalières (histogramme) de la station météorologique de Bagotville (QC) pour la période de mai à octobre 2011. La station de Bagotville se retrouve à proximité des sites d'échantillonnages..... 105
- 3.3 Dates d'échantillonnages des données pour les trois sites à niveau de défoliation différent (témoin, moyen et sévère) 106
- 3.4 Courbes représentant le contenu relatif en eau (CRE) calculé pour chaque échantillon en provenance des trois sites à l'étude en fonction des jours juliens d'échantillonnages. Sur le graphique, les ronds noirs représentent les échantillons en provenance du site témoin, les ronds blancs, les échantillons du site à défoliation moyenne et les triangles noirs, représentent les échantillons en provenance du site à défoliation sévère. Les astérisques au-dessus de certain jour julien d'échantillonnage représentent les dates ayant démontrées après analyses statistiques (ANOVA, $p < 0,05$), une différence significative. 106
- 3.5 Courbes représentant le pourcentage de sucres solubles totaux (SST) (haut) et d'amidon (bas) contenu dans les aiguilles (gauche) et dans le bois (droite) des sapins baumiers à l'étude exprimée en mg/g selon les jours juliens et les catégories de

défoliation. Sur les graphiques, les ronds noirs représentent les échantillons en provenance du site témoin, les ronds blancs, les échantillons du site à défoliation moyenne et les triangles noirs, représentent les échantillons en provenance du site à défoliation sévère. Les astérisques au-dessus de certain jour julien d'échantillonnage représentent les dates ayant démontrées après analyses statistiques (ANOVA, $p < 0,05$), une différence significative..... 107

3.6 Mesure de la formation du cerne de croissance chez les arbres en provenance des sites à l'étude selon les jours juliens d'échantillonnages. Sur les graphiques, les ronds noirs représentent les échantillons en provenance du site témoin, les ronds blancs, les échantillons du site à défoliation moyenne et les triangles noirs, représentent les échantillons en provenance du site à défoliation sévère. Les lignes sur le dernier graphique sont les courbes qui ont été estimées par la fonction de Gompertz pour chaque site. 108

3.7 Mesure des cernes de croissance selon les cinq dernières années à partir de 2011 pour les trois sites d'échantillonnages. Sur le graphique, les ronds noirs représentent les échantillons en provenance du site témoin, les ronds blancs, les échantillons du site à défoliation moyenne et les triangles noirs, représentent les échantillons en provenance du site à défoliation sévère. L'astérisque au-dessus de l'année 2011 représente l'année ayant démontrée après analyses statistiques (ANOVA, $p < 0,05$), une différence significative comparativement aux autres..... 109

3.8 Exemple de chromatogramme HS-GC des composés retrouvés dans les échantillons d'aiguilles : (1) Tricyclène (2) α -pinène; (3) Camphène; (4) β -pinène; (5) β -myrcène; (6) δ -3-carène; (7) β -phellandrène; (8) Terpinolène; (9) Maltol; (10) Camphre; (11) Bornéol; (12)(+)-myrtenal; (13) Pipéritone; (14) Standard de Géraniol; (15) Acétate de bornyl; (16)

(+)-longifolène; (17) α -longipinène; (18) β -caryophyllène; (19) α -humulène; (20) α -bisabolène..... 110

3.9 Histogramme à bande représentant la variance de la présence des composés dans les échantillons des trois sites à l'étude. Les différentes lettres (a,b,c) signifient une différence significative ($p < 0,05$) entre les sites. 111

3.10 Courbes représentant les pourcentages de δ -3-carène pour les six arbres par sites d'études. La partie ombragée représente la période de défoliation élevée lors de la saison d'échantillonnage. Pour les trois sites à l'étude, le carré noir représente l'arbre 1, le cercle blanc l'arbre 2, le triangle noir et le triangle blanc l'arbre 3 et 4, puis le carré noir et le carré blanc représente dans l'ordre l'arbre 5 et 6 pour chaque site 112

3.11 Courbes représentant les pourcentages du β -phellandrène pour les six arbres par sites d'études. La partie ombragée représente la période de défoliation élevée lors de la saison d'échantillonnage. Pour les trois sites à l'étude, le carré noir représente l'arbre 1, le cercle blanc l'arbre 2, le triangle noir et le triangle blanc l'arbre 3 et 4, puis le carré noir et le carré blanc représente dans l'ordre l'arbre 5 et 6 pour chaque site 113

CHAPITRE IV

- 4.1 L'entreposage des ressources (Storage) telles que l'amidon ou les SST (Reserves) peuvent être mobilisés vers divers mécanismes utilisés par la plante (Defense, Growth) ou être entreposés (Accumulation) (Stuart Chapin III, Schulze, & Mooney, 1990)..... 115
- 4.2 Défaillance en ordre des différents mécanismes qui régissent les arbres suite à une défoliation sévère sur plusieurs années..... 116

STRUCTURE DU MÉMOIRE

Le mémoire comprend quatre chapitres. Le premier est une introduction générale sur les différents éléments abordés lors de l'étude. Le deuxième chapitre est sous forme d'article scientifique rédigé en anglais présentant une nouvelle méthodologie d'analyse des composés de défense (terpènes) à l'aide du Static Headspace Gas Chromatography. Le troisième chapitre est également sous forme d'article rédigé en français, où les résultats et la discussion de la recherche complète y sont présentés. L'introduction présentera seulement des théories et des hypothèses étant donné que le sujet aura été préalablement introduit dans l'introduction générale. Ce chapitre discute des causes physiologiques menant à la diminution de la croissance et les liens entre la production des composés de défense, des sucres solubles totaux (SST) et des réserves en amidon. Finalement, le chapitre quatre présente une conclusion générale et les perspectives futures envisageables de la recherche.

Chapitre I

Introduction générale

1.1 Mise en contexte

La forêt boréale procure des avantages environnementaux, économiques et sociaux majeurs à la société québécoise. Elles se révèlent essentielles, entre autres, à la conservation de la biodiversité, à la séquestration du carbone, à la régulation et à la filtration de l'eau (Gouvernement du Québec, 2010). Par contre, la forêt boréale est souvent l'objet de perturbations naturelles majeures comme les feux et les épidémies d'insecte. En particulier, la tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE, *Choristoneura fumiferana* Clem.) est actuellement l'insecte qui cause le plus de dommages dans les forêts boréales de l'est de l'Amérique du Nord (Gray & Mackinnon, 2007). Ce type de perturbations naturelles a une grande influence sur la dynamique des écosystèmes boréaux qui nous entourent, mais surtout, il joue un grand rôle en modifiant la structure et la composition de ces forêts. (I. Simard et al., 2006). Il est bien entendu très intéressant de connaître le fonctionnement des infestations de ces insectes, car ils influencent considérablement la dynamique des forêts touchées. D'ailleurs, ce sujet a été étudié à plusieurs reprises afin de mieux comprendre l'enjeu de la TBE (Krause & Morin, 1995; I. Simard et al., 2006). La TBE, espèce indigène au Canada, engendre une défoliation très importante lors d'infestations majeures aux conifères comme l'épinette noire (*Picea mariana* Mill., Briton.), l'épinette blanche (*Picea glauca* Moench, Voss) ainsi qu'au sapin baumier (*Abies balsamea* L. Mill). Des dizaines de milliers d'hectares peuvent être gravement défoliés, et ce, pendant plusieurs années (Ressources Naturelles Canada, 2011). De plus, en considérant l'effet cumulatif des infestations régulières de la TBE dans la forêt boréale, il est possible de constater une diminution significative de la croissance des espèces résineuses et également une augmentation de la mortalité des conifères vivants dans ces écosystèmes touchés. Ces dommages engendrent en grande partie une perte au niveau des ressources ligneuses et non ligneuses et touchent de façon majeure le secteur économique forestier. Au Québec depuis 2006, les populations de tordeuses augmentent de façon constante; les

superficiés infestées en 2010 sont de plus de 600 000 hectares (Ressources Naturelles Canada, 2011).

Chaque espèce de conifère se comportant différemment lorsqu'il subit une invasion, il serait intéressant d'étudier *in situ* la réaction de l'un d'entre eux dans son milieu naturel lors d'une épidémie. Le sapin baumier (*Abies balsamea* L. Mill), espèce indigène de la forêt boréale et l'hôte préférentiel de la TBE, a donc été sélectionné pour cette recherche. Lors de cette étude, plusieurs facteurs ont été pris en considération, notamment l'effet de la tordeuse des bourgeons de l'épinette sur la concentration des composés de défenses, d'amidon et de sucres solubles totaux (SST) contenus dans les aiguilles et le bois des individus sélectionnés ainsi que l'effet de la TBE sur la croissance radiale des arbres touchés.

1.1.1 Effets sur la croissance radiale des hôtes de la tordeuse des bourgeons de l'épinette

Il est dorénavant possible d'observer la croissance radiale (au niveau cellulaire) des cernes de croissance de toutes les espèces d'arbre (autant les conifères que les feuillus) (Deslauriers, 1999, 2003; Rossi, Simard, Deslauriers, & Morin, 2008). Année après année, en se formant, le cerne de croissance laisse une trace permanente des événements importants survenus lors du développement de l'arbre. Les variations visibles sur le cerne de croissance, qui sont en partie causées par des perturbations environnementales majeures telles un épisode de défoliation sévère, permettent de retracer efficacement dans le temps ces événements. Plusieurs recherches ont d'ailleurs démontrés l'impact de la défoliation des arbres sur la réduction du cerne de croissance chez les arbres (Morin, 1994; Morin & Laprise, 1990). La défoliation a donc un impact

sur la croissance radiale des arbres touchés et de ce fait, l'analyse effectuée des cernes de ces arbres permet de mieux compléter les données d'observations terrestres ou aériennes de la défoliation des territoires touchés (Morin, 1998).

Selon Blais (1962), une réduction de la croissance radiale qui est causée par une épidémie sévère de la tordeuse des bourgeons de l'épinette est normalement très facile à identifier. Selon Krause et Morin (1995), la réduction de la croissance radiale débute tout d'abord dans la cime de l'arbre pour continuer ensuite jusqu'à la base de la tige de l'individu. De ce fait, la réduction et la récupération de l'arbre après la défoliation dans la zone de la cime du conifère sont beaucoup plus intensives que celle qui s'effectue dans la base de la tige de l'arbre. De plus, après la réduction de croissance, il est normalement possible d'observer une période plus ou moins longue de croissance lente dans les premières années après le moment de stress, puis suivie par une accélération de croissance marquée dans le cerne (Morin, 1994). Il est d'ailleurs intéressant de souligner que selon plusieurs recherches, ces signes d'infestations chez le sapin baumier sont très fréquents chez cette espèce, car l'*Abies balsamea* est l'hôte par excellence de la TBE (Blais, 1962; Morin, 1994). La défoliation des aiguilles en début de saison de croissance d'un arbre, entraîne un effet direct sur la production de ces sucres solubles totaux (Ericsson, 1980) ce qui en résulte par un important impact sur la formation du cerne intra-annuel des arbres (Rossi et al., 2008; Sundberg & Little, 1987). Selon d'autres recherches, la défoliation causée aux conifères affecterait davantage leur production de xylème comparativement aux feuillus (Rossi et al., 2008).

1.1.2 Utilisation des réserves d'amidon et de sucres solubles totaux (SST) par le sapin baumier en situation normale et de stress

Tout au long de l'année, l'arbre est en mesure d'accumuler les réserves dont il a besoin selon les divers évènements qui peuvent survenir. En général, les sucres solubles totaux (SST) (monosaccharide et disaccharide tel le glucose, le fructose ou le galactose, etc.) sont élevées durant l'hiver et plus bas durant l'été dans les aiguilles et le xylème des arbres. Pour sa part, la teneur en amidon dans le bois et les aiguilles, est élevée durant la période du printemps et de l'automne et reste plus basse durant le reste de l'année (Ashworth, Stirm, & Volenec, 1993; Little, 1970). Lorsque les arbres sont en période de stress, la production et le stockage des SST et de l'amidon peuvent varier de façon très différente comparativement à un arbre qui ne subit aucun évènement stressant. Ces périodes de stress peuvent être causées par des bouleversements environnementaux importants tels que le manque d'eau, qui produit un stress hydrique chez la plante, ou des infections pathologiques répétées.

Ces phénomènes activent le métabolisme de l'arbre et actionnent une cascade de production de composés de défense. Cette production de composés affecte ainsi directement le métabolisme normal des sucres solubles et de l'amidon (Rainer, 1997). Sous des conditions normales, le niveau de sucres solubles totaux dans les aiguilles des conifères est élevé durant la journée et plus bas la nuit. De plus, lors de journées ennuagées, l'augmentation du métabolisme de production de SST aide à combler le manque de carbone que génèrent les exigences de la respiration et de la croissance (Stuart Chapin III et al., 1990). De ce fait, les sucres solubles totaux et l'amidon sont en mesure de varier selon les différents besoins de l'arbre.

Selon certaines études, l'arbre qui subit un stress important telle une défoliation majeure, commencera à épuiser plus rapidement ses réserves de sucres solubles contenues dans les aiguilles et le bois pour ainsi combler le manque de nutriments

(carbone, azote, phosphore, etc.) nécessaire sa croissance (Honkanen, 1999; Stuart Chapin III et al., 1990; Willaume, 2011). Normalement, ces nutriments carbonés sont générés en grande partie par le processus de la photosynthèse. Plusieurs autres facteurs peuvent faire varier la quantité de sucres solubles totaux dans les aiguilles et entraîner leur délocalisation dans diverses autres parties de l'arbre. La variation du contenu relatif en eau (CRE) présente dans les aiguilles des conifères par exemple, peut entraîner une fluctuation des sucres solubles dans le feuillage de ces conifères (Little, 1970). De plus, le contenu relatif en eau dans les aiguilles varie durant la saison de croissance tout comme les SST et dépend également de certains facteurs comme l'âge des aiguilles, leur position dans la canopée, etc.

Pour leur part, les réserves d'amidon semblent varier surtout en fonction de la période de croissance, soit au printemps. Certaines études rapportent une variation notable due à la présence de stress au niveau des réserves d'amidon. Un degré élevé de défoliation affecterait les réserves d'amidon en les abaissant considérablement (Ericsson, Larsson, & Tenow, 1980; Kobe, 1997). Plus la défoliation est importante, plus les réserves sont affectées comparativement à des arbres sains. Les réserves d'amidon seraient notamment acheminées et relocalisées afin de contribuer à la régénération des aiguilles plutôt qu'à être utilisées afin de servir à la croissance de l'arbre (Ericsson et al., 1980). De plus, certaines études (Kobe, 1997) mettent l'emphase sur l'augmentation des chances de survie des arbres par leur capacité à emmagasiner suffisamment de réserves d'amidon durant l'automne. Cette capacité leur confère l'avantage d'être plus apte à survivre lors d'une défoliation importante, car après un tel évènement, les réserves d'amidon se situant dans les aiguilles et le bois chutent drastiquement ce qui empêche donc l'arbre de croître normalement et de satisfaire ses besoins métaboliques. De ce fait, en accordance avec la variation de croissance radiale des arbres durant les périodes de stress, il devrait être possible d'observer une variation (à la baisse) des réserves de sucres solubles et d'amidon présents dans les aiguilles des arbres ciblés durant la période de croissance étudiée (mai à octobre).

1.1.3 Les métabolites secondaires

Les plantes en général, mais surtout les conifères sont reconnues pour leur forte production de composés organiques divers. Dans de nombreux cas, certains de ces composés apparaissent comme n'ayant aucun lien direct avec la fonction du développement et de la croissance des plantes. Ces substances sont surtout connues sous le nom de métabolites secondaires (Taiz & Zeiger, 2006). Les métabolites secondaires ont longtemps été considérés comme des métabolites simples et même comme déchets métaboliques des plantes. Depuis peu, les métabolites secondaires sont connus comme étant des composés importants agissant au niveau de la défense des plantes (Gershenzon & et al, 2000; Lamontagne & Bauce, 2002; Taiz & Zeiger, 2006). Plus précisément, les fonctions des métabolites secondaires sont de protéger spécifiquement les plantes contre les herbivores et les infections microbiennes, ils servent également comme attractifs pour les pollinisateurs et les animaux qui ont pour rôle de disperser les graines des arbres et des plantes.

De plus, les métabolites secondaires ont la fonction d'être des agents qui ont pour rôle d'intervenir dans la compétition entre les plantes (plante-plante) et entre les plantes et les micro-organismes (plante-mycorhize) (Taiz & Zeiger, 2006). De plus, selon certaines études, les conifères subissant un stress (ex. : défoliation des aiguilles par des herbivores ou insectes) produiraient davantage de métabolites secondaires au niveau de leurs aiguilles pour se défendre et assurer leur survie (Bauce, 1996; Tuomi & et al, 1988; Wagner & et al, 1985). Les métabolites secondaires peuvent être classés en trois groupes bien distincts; terpènes, composés phénoliques et les composés contenant de l'azote (Taiz & Zeiger, 2006; Waksmundzka-Hajnos & et al, 2008). L'origine des métabolites secondaires mise en relation avec la voie métabolique de base est illustrée à la figure 1.1. Cette figure démontre bien que tous les produits de la plante dérivent de

la production des glucides en provenance de la photosynthèse et que l'acétyl-CoA est le point central des voies de synthèses des divers composés de défense.

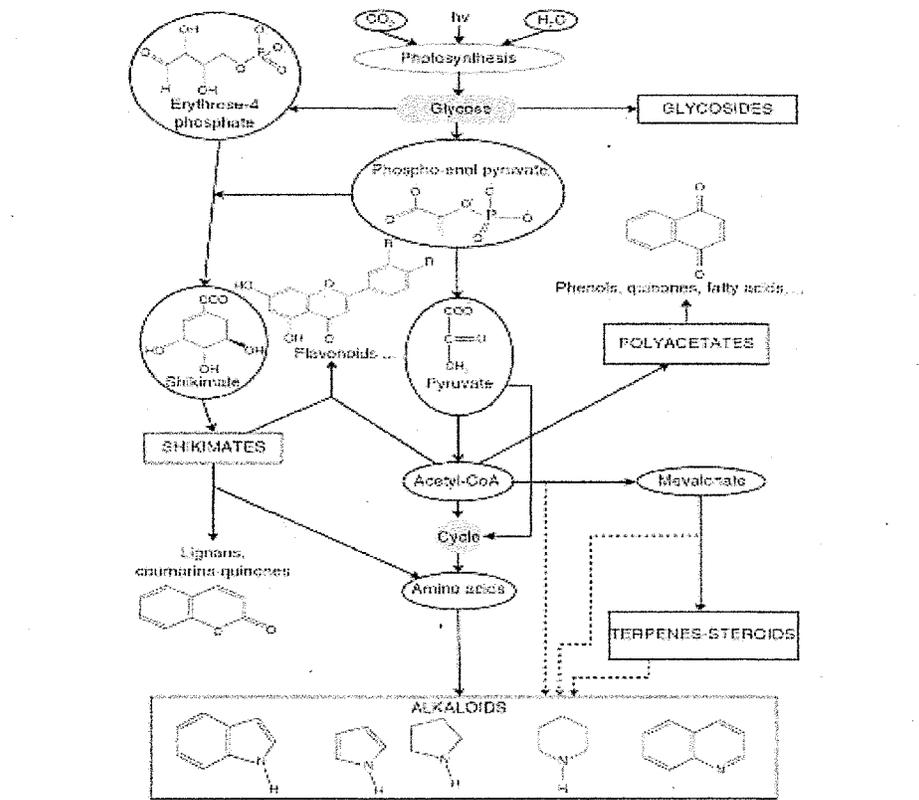


Figure 1.1: La voie de synthèse des métabolites secondaires chez les végétaux (Waksmundzka-Hajnos M. et al. 2008).

1.1.4 Les terpènes

Les terpènes représentent la classe la plus large et vaste de produits secondaires générés par les plantes. Chez les conifères, les terpènes s'accumulent en général au niveau des tissus des aiguilles, surtout en grande quantité dans les trichomes glandulaires de la face supérieure des aiguilles et ils sont également nombreux dans la résine présente dans le tronc (xylème et phloème) des conifères (B. Miller & al, 2005; Phytochemical Society of Europe, 1991). Selon certaines études, la quantité présente des composés terpéniques dans les aiguilles serait directement influencée (dépendante) par la quantité de sucres solubles totaux (SST) présents lors de la saison de croissance des arbres (Gershenzon & et al, 1989; Stuart Chapin III et al., 1990). Meilleure est la saison de croissance de l'arbre et plus bas serait le taux de terpènes dans les aiguilles de cette même année (Schiinwitz, 1991). Les composés terpéniques ont également été répertoriés en grand nombre dans l'huile essentielle du sapin baumier (Figure 1.2) et selon certaines études, cette huile contiendrait plusieurs terpènes et posséderait un fort potentiel antimicrobien (Pichette, Larouche, & Lebrun, 2006).

Chemical composition (%) of *A. balsamea* essential oil

Compound	RI DB-5 ^a	RI Spwax ^b	Relative concentration (%)
Santene	892	991	1.1 ^c
Tricyclene	927	1010	0.7 ^c
α -Pinene	939	1026	14.6 ^c
Camphene	952	1070	5.1 ^c
β -Pinene	977	1112	29.9 ^c
Myrcene	992	1174	1.8 ^c
δ -3-Carene	1008	1155	19.6 ^c
Limonene	1031	1200	6.6 ^c
β -Pheilandrene	1031	1210	5.8 ^c
Terpinolene	1098	1297	1.4 ^c
Borneol	1167	1709	0.2 ^d
α -Terpineol	1188	1709	0.7 ^d
Bornyl acetate	1292	1582	8.4 ^c
β -Caryophyllene	1414	1589	0.4 ^c
α -Humulene	1452	1661	0.2 ^c

^a Retention indices on apolar DB-5 column.

^b Retention indices on polar Supelcowax 10 column.

^c Percentage composition determined on Supelcowax column.

^d Percentage composition determined on DB-5 column.

Figure 1.2 : Représentation de la composition de l'huile essentielle du sapin baumier (Pichette A. et al. 2006). Les composés majoritaires présents dans cette huile sont le β -pinène et le δ -3-carène.

Il existe plusieurs techniques pour identifier les terpènes en provenance de différentes parties d'un végétal. En procédant souvent en premier lieu par une extraction des produits contenus dans la plante (ex. : distillation par entraînement à la vapeur, soxhlet, etc.) , il est possible à l'aide d'appareils (Ex: GC-MS, GC-FID, etc.) de les caractériser (Adams, 2007; Waksmundzka-Hajnos & et al, 2008). La manière la plus utilisée pour identifier ces molécules est par GC-MS (Gas chromatography-mass spectrometry). Ces composés sont très volatils et cet appareil permet facilement de les qualifier ainsi que de les quantifier par dosage. À l'aide également de standard, il est possible de bien les caractériser (Beretta & al, 2011; Oliveira, 2011) et de confirmer leur identité à l'aide d'une banque de données et de confirmer le tout avec l'indice de Kovats (Figure 1.3). Cet indice permet de certifier que le composé identifié est bien caractérisé, car cet indice est spécifique à un seul composé organique (Vaubourdolle, 2007).

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{t'_r(\text{Inconnu}) - t'_r(n)}{t'_r(N) - t'_r(n)} \right]$$

I = indice de Kovats

n = Nombre d'atomes de carbone dans le n-alcane le plus petit

N = Nombre de d'atomes de carbone dans le n-alcane le plus grand

Tr = Temps de rétention des produits

Figure 1.3 : Formule pour calculer l'indice de Kovats utilisée pour caractériser les composés organiques.

De plus, il existe d'autres techniques encore plus spécifiques nommées Static headspace et Headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) combiné au GC-MS. Ces techniques permettent d'identifier les terpènes en chauffant l'extrait pour ainsi rendre volatile les molécules qui ont cette capacité, c'est-à-dire, en grande majorité les composés terpéniques et les solvants organiques (Struppner & Ganzera, 1998; Wasfi, 2004). Ces techniques sont encore peu utilisées pour identifier les composés volatils en

provenance de plantes, mais dus à leur rapidité, elles commencent à être davantage employées (M. E. Miller & Stuart, 1999; Oliveira, 2011; Petronilho, 2011).

1.1.5 Biosynthèse

Dans cette section, la biosynthèse des terpènes sera décrite de façon non exhaustive et de manière générale. À partir de l'acétyl-CoA, la biosynthèse des composés terpéniques débute par une unité structurale commune : l'unité isoprène (Figure 1.4). Les terpènes sont en général tous constitués à partir de ces unités liées l'une à la suite de l'autre. Généralement, la chaîne de carbone ainsi formée à partir de l'unité commune (isoprène) peut se refermer pour former un ou plusieurs cycles (Sell, 2003).

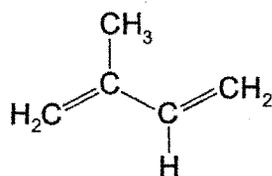


Figure 1.4 : Unité isoprène.

Plus précisément, les terpènes peuvent être biosynthétisés par deux voies principales soit à partir du 3-isopentényle pyrophosphate (IPP) et du 3,3-diméthylallyle pyrophosphate (DMAPP), eux-mêmes formés à partir de l'acétyl-CoA (Figure 1.1 et 1.5) (Bohlmann, Phillips, Ramachandiran, Katoh, & Croteau, 1999; Sell, 2003; Taiz & Zeiger, 2006).

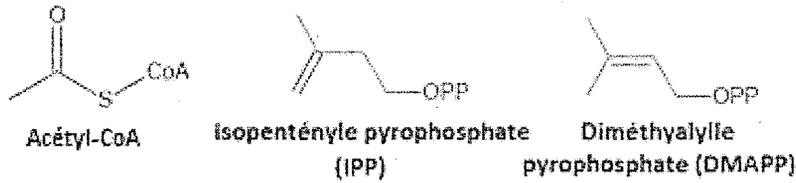


Figure 1.5: Représentation des molécules servant à la synthèse des terpènes.

Afin de former l'IPP, il faut tout d'abord générer l'acide mévanolique qui est constitué de trois unités d'acétyl-CoA joints ensemble par différentes étapes de synthèses (condensation, réduction, déshydratation, etc.). Ensuite, à partir de l'acide mévanolique, l'IPP et le DMAPP peuvent ainsi être générés (Figure 1.6) (Sell, 2003; Taiz & Zeiger, 2006).

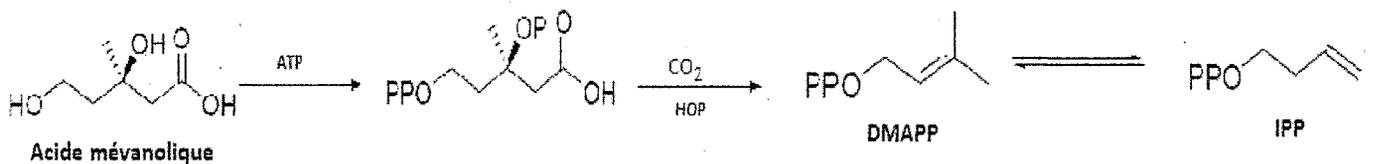


Figure 1.6: Synthèse de IPP et du DMAPP à partir de l'acide mévanolique.

Par la suite, à l'aide d'enzymes situés dans différents compartiments de la cellule végétale, l'IPP et le DMAPP peuvent se lier et former le géranyle pyrophosphate (GPP), qui est le précurseur et la base de tous les monoterpènes (Figure 1.7). Ainsi, le géranylgéranyle pyrophosphate (GGPP) et le géranylfarnésyle pyrophosphate (GFPP) sont synthétisés en ajoutant un à un les unités d'IPP nécessaires sur les molécules d'IPP ou de DMAPP selon la molécule finale voulue (figure 1.7-1.8-1.9) (Bohlmann et al., 1999). Donc, à partir de ces différentes unités, la plupart des terpènes peuvent être

généérés et ainsi contribuer au métabolisme de la plante. Dans son ensemble, les composés terpéniques se biosynthétisent dans les aiguilles dues à la présence d'enzymes qui sont nécessaires à leur production (Gershenzon & et al, 1989; Wang & et al, 2008).

Par tranche de cinq carbonnes, les terpènes sont divisés par famille; soit les hémiterpènes (C₅), monoterpènes (C₁₀), sesquiterpènes (C₁₅), diterpènes (C₂₀), triterpènes (C₃₀) et finalement les tétraterpènes (C₄₀) (B. Miller & al, 2005; Taiz & Zeiger, 2006). Les terpènes possédant le moins grand nombre de carbonnes (5 à 20) se retrouvent souvent en très grand nombre dans l'huile essentielle des plantes et sont très prisés par les industries des parfums et des cosmétiques (Taiz & Zeiger, 2006).

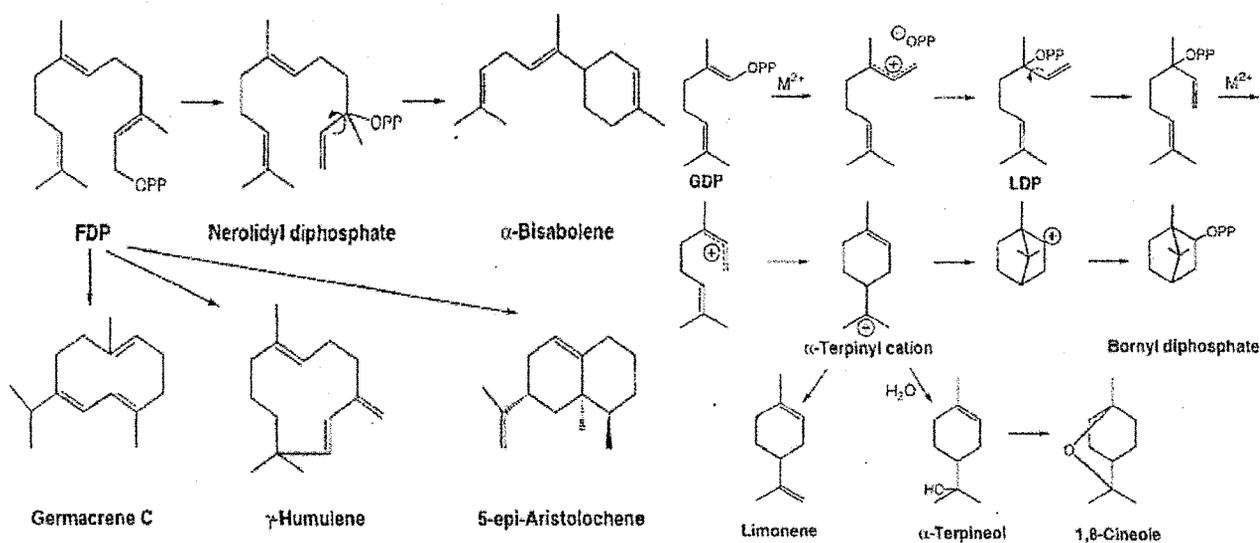


Figure 1.7: Représentation de la synthèse de monoterpènes (droite) et de sesquiterpènes (gauche) (Bohlmann et al. 1998).

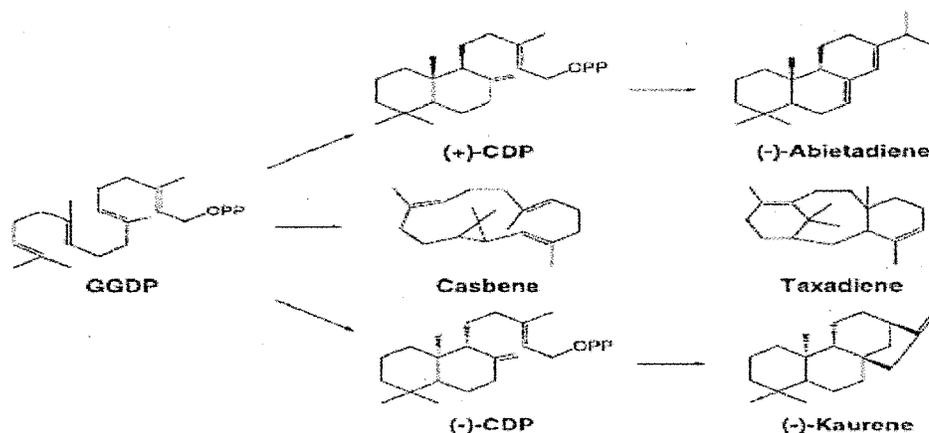


Figure 1.8: Représentation de la synthèse de quelques diterpènes (Bohlmann et al. 1998).

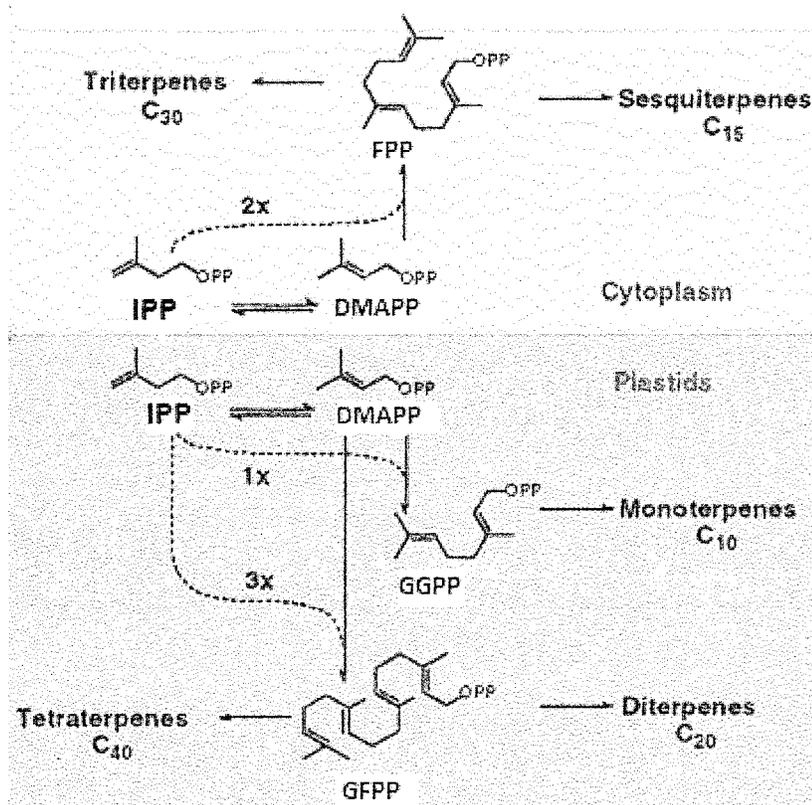


Figure 1.9: Voie de synthèse des différentes familles de terpènes (Bohlmann et al. 1998).

1.1.6 Fonctions des terpènes

Les fonctions les plus répertoriées chez les terpènes, toutes catégories confondues, sont d'être des phytoalexines efficaces (joue un rôle dans l'alléopathie entre les plantes), d'être des insecticides naturels visant certaines familles d'insectes précises et d'être des agents de défense contre divers agresseurs extérieurs (Phytochemical Society of Europe, 1991). De plus, ils sont également reconnus pour exercer la fonction de phéromones et de molécules signales. Se situant en grande partie dans les tissus des aiguilles chez les conifères et dans la résine, les terpènes peuvent ainsi assurer plusieurs rôles différents chez les conifères (Phytochemical Society of Europe, 1991). Les familles de molécules les plus connues pour être des agents de défense contre divers agresseurs pour les conifères sont en majorités les monoterpènes et les sesquiterpènes (Ibrahim, Kainulainen, & Aflatuni, 2001; Lewinsohn, Gijzen, & Croteau, 1990; Martin, Faldt, & Bohlmann, 2004; B. Miller & al, 2005). Selon certaines études, les changements environnementaux tels que le changement de température (augmentation en majorité) (Nault, 2003) et l'augmentation de pollution dans l'atmosphère (Kupcinskiene & et al, 2008) ainsi que les changements saisonniers auraient un effet sur la quantité de terpènes présents (en majorités les mono et les sesquiterpènes) dans les aiguilles des conifères (Nault, 2003; Rudloff von, 1972). Cela confirme que les terpènes jouent un rôle important dans la défense des arbres, car en produisant des quantités différentes de terpènes en période de stress, cela démontre que les arbres sont aptes à répondre à d'autres stimulus et qu'ils ne répondent pas seulement aux variations des saisons.

1.1.7 Objectifs du mémoire

L'objectif principal de ce mémoire est d'effectuer l'analyse des constituants chimiques qui se retrouvent principalement dans les aiguilles et le bois du sapin baumier en provenance d'individus semblables se situant dans trois sites ayant subi une défoliation d'intensité différente (témoin, moyenne et élevée). Le sapin baumier a très peu été étudié au niveau de ses composantes chimiques en lien avec un stress comme une défoliation s'étendant sur quelques années. Cette étude fournira des informations précieuses sur le comportement physiologique et métabolique de l'arbre lorsqu'il subit une défoliation en milieu naturel. Le niveau de défoliation de ces sites est attribué selon une charte de défoliation des conifères lors d'infestation par le MRNF (Ministère Ressources naturelles et faunes) (Gionest, 1999; Maclean & Lidstone, 1982).

L'analyse des composés chimiques et de la croissance se divisera en trois sections qui porteront sur :

- La quantification des métabolites secondaires (monoterpènes et sesquiterpènes) servant de composés de défense contre la tordeuse des bourgeons de l'épinette.
- La quantification des sucres solubles totaux et des réserves d'amidon contenus dans les aiguilles des sapins sélectionnés ainsi que les réserves d'amidon contenus dans le xylème.
- L'analyse intra-annuelle de la formation du cerne de croissance des sapins baumiers étudiés lors de la saison de croissance (mai à octobre 2011).

Les données recueillies, pour chacun des sites énumérés précédemment, seront comparées entre elles dans le but de réaliser un portrait expérimental préliminaire d'ensemble sur la possible réaction chimique et physiologique du sapin baumier en présence de la tordeuse des bourgeons de l'épinette dans son milieu naturel. Cette recherche a été mise au point dans le but précis de construire une méthodologie efficace et solide pour l'analyse des données chimiques en provenance des arbres en milieu naturel.

1.1.8 Références

- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (4th Edition ed.). Illinois, USA: Allured Business Media.
- Ashworth, E. N., Stirm, V. E., & Volenec, J. J. (1993). Seasonal-variations in soluble sugars and starch within woody stems of *Cornus sericea* L. [Article]. *Tree Physiology*, 13(4), 379-388.
- Bartolomeo, D., & Cristos, X. (2005). Osmotic regulation in leaves and roots of olive trees during a water deficit and rewatering. *Tree Physiology*, 26(179-185).
- Bauce, E. (1996). One and two years impact of commercial thinning on spruce budworm feeding ecology and host tree foliage production and chemistry. *Forestry Chronicle*, 72(4), 393-398.
- Bauce, E., Carisey, N., & Boulet, B. (2006). *Phénomène de résistance naturelle d'épinettes blanches à la tordeuse des bourgeons de l'épinette*.
- Bauce, E., Crepin, M., & Carisey, N. (1994). Spruce Budworm Growth, Development and Food Utilization on Young and Old Balsam Fir Trees. *Oecologia*, 97(4), 499-507.
- Beretta, G., & al, e. (2011). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55(1255-1264).
- Berger, R. G. (2007). *Flavours and Fragrances Chemistry Bioprocessing and Sustainability*. Germany: Springer Berlin Heidelberg.
- Blais, J. R. (1962). Collection and analysis of radial growth data from trees for evidence of past spruce budworm outbreaks. *Forestry Chronicle*, 38(474-484).
- Bohlmann, J., Phillips, M., Ramachandiran, V., Katoh, S., & Croteau, R. (1999). cDNA cloning, characterization, and functional expression of four new monoterpene synthase members of the Tpsd gene family from grand fir (*Abies grandis*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 368(2), 232-243.
- Brooks, J. E., & Borden, J. H. (1987). Seasonal variation in foliar and bud monoterpenes in Sitka spruce. *Can. J. Bot.*, 65, 1249-1252.

- Carisey, N., & Bauce, E. (1997). Balsam fir foliar chemistry in middle and lower crowns and Spruce budworm growth, development, food and nitrogen utilization. *Journal of Chemical Ecology*, 23(8), 1963-1978.
- Carlow, J., Ayers, L., Bailey, A., John, B., & Richardson, A. (2006). Determination of volatile compounds in foliage of Fraser fir (*Abies fraseri*) and balsam fir (*Abies balsamea*). *Microchemical Journal*, 83(2), 91-97.
- Deslauriers, A. (1999). *Mémoire de Maîtrise: Mise en place du cerne de croissance chez le sapin baumier (Abies balsamea (L.) Mill.) et relation avec le climat.*, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi.
- Deslauriers, A. (2003). *Thèse de Doctorat: Dynamique de la croissance radiale et influence météorologique quotidienne chez le sapin baumier (Abies balsamea (L.) MILL.) en forêt.* Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi.
- Direction de la protection des forêts. (2011). *Aires infestées par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec en 2011.*
- Direction de la protection des forêts. (2012). *Aires infestées par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec en 2012.*
- Ericsson, A., Larsson, S., & Tenow, O. (1980). Effects of early and late season defoliation on growth and carbohydrate dynamics in Scots pine. *J. Appl. Ecol.*, 17(747-769).
- Gershenzon, J., & et al. (1989). Biochemical and Histochemical Localization of Monoterpene Biosynthesis in the Glandular Trichomes of Spearmint (*Mentha spicata*). *Plant physiology*, 89(1351-1357).
- Gershenzon, J., & et al. (2000). Regulation of Monoterpene Accumulation in Leaves of Peppermint. *Plant Physiology*, 122(205-213).
- Gionest, F. (1999). *Mémoire de maîtrise : Relations temporelles entre des données de défoliation par la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Choristoneura fumiferana) et la croissance du sapin baumier (Abies balsamea).* Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi.
- Giovannelli, A. (2011). Sampling cambial region and mature xylem for non structural carbohydrates and starch analyses. *Dendrochronologia*, 29(177-182).
- Gouvernement du Québec. (2010). *Bilan d'aménagement forestier durable au Québec 2000-2008.*
- Gray, D., & Mackinnon, W. (2007). Historical spruce budworm defoliation records adjusted for insecticide protection in New Brunswick, 1965–1992. *J. Acad. Entomol. Soc.*, 3, 1-6.

- Hinshaw, J. V. (2011). Headspace Sampling. *LC-GC Europe*, 24(7), 538-546.
- Holubova, V., Hrdlicka, P., & Kuban, V. (2001). Age and space distributions of monoterpenes in fresh needles of *Picea abies* (L) karst. Determined by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 12(4), 243-249.
- Honkanen, T. (1999). Responses of *Pinus sylvestris* branches to stimulated herbory are modified by tree sink/source dynamics and by external resources. *Functionnal Ecology*, 13(126-140).
- Ibrahim, M., Kainulainen, P., & Aflatuni, A. (2001). Insecticidal, repellent, antimicrobial activity, and phytotoxicity of essential oils; with special reference to limonene and its suitability for control insect pest. *Agricultural and food science in Finland*, 10, 243-259.
- Kobe, R. K. (1997). Carbohydrate allocation to storage as a basis of interspecific variation in sapling survivorship and growth. *OIKOS*, 80(226-233).
- Kolb, B., & Ettre, L. (2006). *Static headspace-gas chromatography: theory and practice* (Second edition ed.). USA: Wiley VRC.
- Kozlowski, T., & Pallardy, S. (1997). Growth control in woody plants. In A. press (Eds.)
- Krause, C., & Morin, H. (1995). Changes in radial increment in stems and roots of balsam fir [*Abies balsamea* (L.) Mill.] after defoliation by spruce budworm. *The forestry chronicle* 71(No. 6).
- Kumbas, M., & Bauce, E. (2010). Effects of tree age and stand thinning related variations in balsam fir secondary compounds on spruce budworm *Choristoneura fumiferana* development, growth and food utilization. *Agricultural and Forest Entomology*, 13, 131-141.
- Kupcinskiene, E., & et al. (2008). The essential oil qualitative and quantitative composition in the needles of *Pinus sylvestris* L. growing along industrial transects. *Environmental pollution*, 155(481-491).
- Lamontagne, M., & Bauce, E. (2002). Testing the ecophysiological basis for the control of monoterpene concentrations in thinned and unthinned balsam fir stands across different drainage classes. *Oecologia*, 130(15-24).
- Lamontagne, M., Bauce, E., & Margolis, H. A. (2002). Testing the ecophysiological basis for the control of monoterpene concentrations in thinned and unthinned balsam fir stands across different drainage classes. *Oecologia*, 130(1), 15-24.

- Lamontagne, M., Margolis, H., & Baune, E. (2000). Testing the ecophysiological basis for the control of monoterpene concentrations along canopy profiles in thinned and unthinned balsam fir stands. *Oecologia*, 124(3), 318-331.
- Lewinsohn, E., Gijzen, M., & Croteau, R. (1990). Defense mechanisms of conifers: differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species. *Plant Physiology*, 96, 44-49.
- Little, C. H. A. (1970). Seasonal changes in carbohydrate and moisture content in needles of balsam fir (*Abies balsamea*). *Canadian Journal of Botany*, 48(2021-2028).
- Maclean, D. A., & Lidstone, R. G. (1982). Defoliation by spruce budworm: estimation by ocular and shoot-count methods and variability among branches, trees, and stand. *Can. J. For. Res.*, 12(582-594).
- Martin, D. M., Faldt, J., & Bohlmann, J. (2004). Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily. *Plant Physiology*, 135(4), 1908-1927.
- Miller, B., & al. (2005). Insect-Induced Conifer Defense. White Pine Weevil and Methyl Jasmonate Induce Traumatic Resinosis, de Novo Formed Volatile Emissions, and Accumulation of Terpenoid Synthase and Putative Octadecanoid Pathway Transcripts in Sitka Spruce. *Plant Physiology*, 137.
- Miller, M. E., & Stuart, J. D. (1999). Comparison of Gas-Sampled and SPME-Sampled Static Headspace for the Determination of Volatile Flavor Components. *Anal. Chem.*, 71(23-27).
- Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune. (2003). <http://www.mrnf.gouv.qc.ca/forets/fimaq/insectes/cycle-vie-tordeuse.htm#haut>. Retrieved July 2011
- Ministère Ressources naturelles et faunes, & Gouvernement du Québec. (2011). *Aires infestées par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec en 2011*.
- Morabito, D., Caruso, A., Carpin, S., Cédric Carli, Laurans, F., Depierreux, C., et al. (2006). Cambial activity of *Populus tremula* × *Populus alba* clone 717-1B4 in hydroponic culture. *Can. J. For. Res.*, 36(719-724).
- Morin, H. (1994). Dynamics of balsam fir forest in relation to spruce budworm outbreaks in the boreal zone, Quebec. *Can. J. For. Res.*, 24(730-741).
- Morin, H. (1998). Importance et évolution des épidémies de la tordeuse des bourgeons de l'épinette dans l'est du Canada: L'apport de la dendrochronologie. . *Géographie physique et Quaternaire*, 52(2).

- Morin, H., & Krause, C. (1995). Impact of spruce budworm defoliation on the number of latewood tracheids in balsam fir and black spruce. *Can. J. For. Res.*, 25(2029-2034).
- Morin, H., & Laprise, D. (1990). Histoire récente des épidémies de la Tordeuse des bourgeons de l'épinette au nord du lac-Saint-Jean (Québec) : une analyse dendrochronologique. *Can. J. For. Res.*, 20(1-8).
- Nault, J. R. (2003). Site temperatures influence seasonal changes in terpene composition in Douglas-fir vegetative buds and current-year foliage. *Can. J. For. Res.*, 33(2269-2273).
- Oliveira, I. (2011). Volatile profile of *Arbutus unedo* L. fruits through ripening stage *Food Chemistry*, 128(667-673).
- Petronilho, S. (2011). Sesquiterpenic composition of the inflorescences of Brazilian chamomile (*Matricaria recutita* L.): Impact of the agricultural practices. *Industrial Crops and Products*, 34, 1482-1490.
- Phytochemical Society of Europe. (1991). *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*: Oxford science publications, British.
- Pichette, A., Larouche, P., & Lebrun, M. (2006). Composition and Antibacterial Activity of *Abies balsamea* Essential Oil. *Phytotherapy research*, 20, 371-373.
- Potvin, C., & Lechowicz, M. J. (1990). The Statistical analysis of ecophysiological response curves obtained from experiments involving repeated measures *Ecology*, 71(4), 1389-1400.
- Rainer, E. (1997). Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein. *The plant cell*, 9(1825-1841).
- Régimbal, J.-M., & Collin, J. G. (1993). Essential oil analysis of balsam fir *Abies balsamea* (L.) Mill. *Journal of Essential Oil Research*, 6(3), 229-238.
- Ressources Naturelles Canada. (2011). <http://forets canada.rncan.gc.ca/indicateur/tordeusedesbourgeonsdelepinette>. Retrieved 27 Mai 2011
- Rossi, S., Anfodillo, T., & Menardi, R. (2006). Trephor: a new tool for sampling microcores from tree stems. *IAWA Journal*, 27(89-97).
- Rossi, S., Simard, S., Deslauriers, A., & Morin, H. (2008). Wood formation in *Abies balsamea* seedlings subjected to artificial defoliation. *Tree Physiology*, 29(29), 551-558.

- Rudloff von, E. (1972). Seasonal variation in the composition of the volatile oil of the leaves, buds, and twigs of white spruce (*Picea glarcca*). *Canadian Journal of Botany*, 50(1595-1601).
- Schiinwitz, R. (1991). Influence of needle loss, yellowing and mineral content on monoterpenes in the needles of *Picea abies* (L.) Karst. *Trees*, 5(208-214).
- Schonwitz, R., Merk, L., Kloos, M., & Ziegler, H. (1991). Influence of needle loss, yellowing and mineral content on monoterpenes in the needles of *Picea abies* (L.) Karst. *Trees Structure and Function*, 5, 208-214.
- Sell, C. S. (2003). *A fragrant introduction to terpenoid chemistry* (Vol. 410). UK: The royal society of chemistry.
- Shaw, A. C. (1953). The essential oil of *Abies Balsamea* (L.) Mill. . *Can. J. Chem.*, 31(2), 193-199.
- Simard, I., Morin, H., & Lavoie, C. (2006). A millennial-scale reconstruction of spruce budworm abundance in Saguenay, Québec, Canada. [Article]. *Holocene*, 16(1), 31-37.
- Simard, I., Morin, H., & Potelle, B. (2002). A new paleoecological approach to reconstruct long-term history of spruce budworm outbreaks. *Can. J. For. Res.*, 32, 428-438.
- Simard, S., Hachey, J., & Collin, J. (1988). The variations of essential oil composition during the extraction process. The case of *Thuja occidentalis* L. and *Abies balsamea* (L.) Mill. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 8(4), 561-573.
- Snow, N. H. (2002). Head-space analysis in modern gas chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(9-10), 608-617.
- Struppner, H., & Ganzera, M. (1998). Determination of safrole in different *Asarum* species by Headspace gas chromatography. *Chromatographia*, 47(No.11/12).
- Stuart Chapin III, F., Schulze, E.-D., & Mooney, H. A. (1990). The ecology and economics of storage in plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*(21), 423-447.
- Sundberg, B., & Little, C. H. A. (1987). Effect of defoliation on tracheid product and the level of indole-3-acetic in *Abies balsamea* shoots. *Plant Physiology*, 71(430-435).
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Plant Physiology* (4 ed.). Sunderland Ma (USA): Sinauer Associates Inc. publishers.
- Tuomi, J., & et al. (1988). Induced Accumulation of Foliage Phenols in Mountain Birch: Branch Response to Defoliation. *The American Naturalist*, 132(No. 4), 602-608.

- Vaubourdolle, M. (2007). *Toxicologie, Sciences mathématiques, physiques et chimiques Tome1* (3e éditions ed.). France.
- Vereen, D., McCall, J., & Butcher, D. (2000). Solid phase microextraction for the determination of volatile organics in the foliage of Fraser fir (*Abies fraseri*). *Microchemical Journal*, 65(3), 269-276.
- Von Rudloff, E., & Granat, M. (1982). Seasonal variation of the terpenes of the leaves, buds, and twigs of balsam fir (*Abies balsamea*). *Can. J. Bot.*(2682-2685).
- Wagner, M. R., & et al. (1985). Defoliation increases nutritional quality and allelochemicals of pine seedlings. *Oecologia*, 67(235-237).
- Waksmundzka-Hajnos, M., & et al. (2008). *Thin layer chromatography in phytochemistry*: CRC Press.
- Wang, G., & et al. (2008). Terpene Biosynthesis in Glandular Trichomes of Hop. *Plant Physiology*, 148.
- Wasfi, A. I. (2004). Rapid and sensitive static headspace gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of ethanol and abused inhalants in blood. *Journal of Chromatography B*, 799(331-336).
- Willaume, M. (2011). Correlated responses of root growth and sugar concentrations to various defoliation treatments and rhythmic shoot growth in oak tree seedlings (*Quercus pubescens*). *Annals of Botany*, 107(653-662).

Chapitre II

Nouvelle méthode d'analyse des composés de défense volatiles par Static Headspace Gas Chromatography

(HS-GC)

Volatile compounds in the foliage of balsam fir analyzed by Static Headspace Gas Chromatography (HS-GC): an example of the spruce budworm defoliation effect in the boreal forest of Quebec, Canada

Caron Laurie, Deslauriers Annie*, Mshvildadze Vakhtang, Pichette André

Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, 555
Boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC G7H2B1, Canada

*Corresponding author: E-mail: adeslaur@ugac.ca, telephone +1 418-545-5011 ext.
5066, fax +1 418-545-5012

Microchemical Journal, Volume 110, September 2013, Pages 587-590

Attribution des tâches:

Pour cet article, la méthodologie a été mise au point par Laurie Caron avec l'aide de Carole Grenon (professionnelle du Laboratoire LASÈVE) et Vakhtang Mshvildadze. La rédaction complète de l'article ainsi que la soumission de l'article a également été effectuée par Laurie Caron. Des corrections de forme ont été effectuées par Annie Deslauriers ainsi que Vakhtang Msvildadze.

2.1 Abstract

Many studies have focused on the influence of needle defense compounds that are produced when trees are attacked. Spruce budworm is the most important defoliator of conifers in eastern North America causing tree mortality. Volatile components such as terpenes are of importance as they are known to be agents of defense in plants and trees against many aggressors like spruce budworm. In this study, the Static Headspace Gas Chromatography (HS-GC) method was used to evaluate volatile compounds in the foliage of balsam fir (*Abies balsamea*) in order to compare the results obtained with the traditional GC-MS method. An advantage of analyzing plant volatile compounds with the HS-GC was the simplicity of execution, allowing a large number of samples to be treated. The most abundant volatile molecules were identified on the HS-GC chromatogram, except for some compounds such as α -thujene, fenchone, terpin-1-en-4-ol and α -terpineol. In addition to the qualitative analysis of terpene, a quantitative analysis of β -phellandrene was done to compare the variation of this compound between a control and a defoliated site. This study suggests that β -phellandrene was released as a response to injuries when the site was heavily defoliated by spruce budworm.

Keywords: Static Headspace, Balsam fir, *Abies balsamea*, β -phellandrene, monoterpene.

2.2 Introduction

In eastern North America, the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana* Clem.) is the best known defoliating insect of balsam fir [*Abies balsamea* L. (Mill.)] and black spruce [*Picea mariana* B.P.S. (Mill.)]. Since 2005, the area defoliated in Quebec (Canada) has doubled every year, exceeding 2 million ha in 2012 (Direction de la protection des forêts, 2012). It is currently the insect that causes the most damage in the boreal forests of eastern North America and more specifically affects balsam fir (Gray & Mackinnon, 2007). This problem needs extensive study to understand the relationship between insect and tree, including how trees defend themselves. Many studies have focused on the influence of needle defense components, such as terpenes, which are produced when trees are attacked by defoliator insects (Carisey & Bauce, 1997; Kumbas & Bauce, 2010). These molecules are of importance as they are known to be agents of defense in plants and trees against many aggressors like insects (Ibrahim et al., 2001; Lamontagne, Margolis, & Baune, 2000; Lewinsohn et al., 1990; Phytochemical Society of Europe, 1991; Taiz & Zeiger, 2006). Conifers also produce secondary metabolites (such as β -phellandrene, β -pinene, δ -3-carene, β -caryophyllene, etc.) in their needles to defend themselves and ensure/increase their survival (Carlow, Ayers, Bailey, John, & Richardson, 2006; Schonwitz, Merk, Kloos, & Ziegler, 1991). To gather extensive qualitative and quantitative information about the defense components, many samples must be collected and analysed in order to understand their variations during the growing season (from May to October).

Static Headspace Gas Chromatography (HS-GC) has been used since the early days of gas chromatography and is a primary tool for the analysis of volatile organic compounds in the pharmaceutical, clinical and biological fields (Snow, 2002).

The possibility of obtaining a specific separation of volatile compounds in a sample offers several advantages over the traditional method by GC-MS or GC-FID. Unlike other GC methods, the HS-GC technique can prevent the non-volatile compounds in a sample from entering the GC inlet by holding the entire sample matrix (liquid or solid) in a vial while transferring only volatile components into the GC inlet and column (Hinshaw, 2011). Because of this, non-volatile compounds remain in the vial and not accumulate in the column which, in turn, will increase the lifetime of a GC column. In the literature, the main techniques used to determine the volatile compounds found in plants, such as terpenes, are the GC-MS or GC-FID methods (Adams, 2007). However, the sample preparation step for GC-MS or GC-FID analyses can be time-consuming as samples generally require treatments before they can be analyzed. An initial extraction procedure by a solvent, or another type of extraction, is usually necessary to prepare the sample before it can be analyzed by GC methods. The most commonly used extraction method is steam distillation to obtain the essential oil of a plant. This requires a relatively long extraction time (about 2 hours) and a large quantity of plant material (about 200-500g) to obtain enough essential oil for analysis (Pichette et al., 2006). When there are many samples to be analyzed, this extraction method requires much more time than the HS-GC method.

The advantage of analyzing plant volatile molecules with HS-GC is the simplicity of execution: ground tissues are placed in a headspace vial that is sealed in a gas-tight enclosure before the sample is ready to be transferred to the gas chromatography system for analysis (Hinshaw, 2011; Kolb & Ettre, 2006). In addition to the simplicity of sample preparation, the HS-GC method offers a good sensitivity and high speed of execution (Vereen, McCall, & Butcher, 2000). These advantages clearly show that headspace sampling is an interesting option to consider for the analyses of samples in analytical chemistry thus helping in the understanding of a biological issue such as plant defense.

In this study, the Static Headspace Gas Chromatography (HS-GC) technique was used to (1) qualitatively evaluate volatile compounds like monoterpenes and sesquiterpenes from *Abies balsamea* foliage; (2) compare the results obtained with the traditional GC-MS method; (3) provide an example of a quantitative analysis of a selected monoterpene (β -phellandrene) from foliage of balsam fir. A comparison of results obtained by HS-GC and GC-MS will determine if the HS-GC method is comparable to the GC method. The quantitative analysis will demonstrate if a variation can be detected during the growing season between trees differently defoliated by spruce budworm.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Sample sites

Sampling was performed simultaneously on two research sites in the Laurentide Wildlife Reserve in the province of Quebec (Canada) from May to October 2011. The control site did not show any signs of defoliation by spruce budworm and is located near (about 1 km) the defoliated site. The defoliated site was classified as heavily defoliated in 2011 (Direction de la protection des forêts, 2011). Six dominant trees per site were randomly selected (Table 2.1) and the foliage was sampled in the middle of the tree canopy.

2.3.2 Sampling

Needle samples from each tree were collected every two weeks starting in spring 2011 [Days of the Year (DOY) 139] except during the period of heaviest defoliation in June when sampling was performed weekly. The needles were placed in paper bags and stored at -20 °C. The age of the selected needles varied between 1 and 3 years (Holubova, Hrdlicka, & Kuban, 2001). The needles were immersed in liquid nitrogen at -196 °C to stop all enzymatic activities and 5 g was ground (Retsch MM200 Vibrant) for 5 minutes at 1 µm. The needles were then stored at -20 °C until analysis of chemical compounds.

2.3.3 Analytical Method

An amount of 50 mg of needle powder and 10µL geraniol standard (20.0 mg in 1mL of dichloromethane) were placed in a 10mL HS-vial. Geraniol standard was chosen

as intern standard because it is not found naturally in balsam fir needles. Each sample was prepared and analyzed three times in order to ensure good repeatability. For quantitative analysis, a calibration curve ($R^2 = 0.995$) was produced with five different concentrations of α -phellandrene:

$$y = 0.1075x + 0.0825$$

Where y is the peaks area obtained by HS-GC and x is the concentration of α -phellandrène.

The chemical standard of β -phellandrene was impossible to find from Sigma Aldrich or any other company. For this reason, α -phellandrene was chosen as a standard because it has the same response as β -phellandrene. The concentration of β -phellandrene in the needle was expressed as gram per gram of fresh foliage weight used for the analysis and converted into a percentage. Each sample was analyzed in triplicate for the qualitative analysis.

An Agilent 7890C GC system with an Agilent PAL autosampler (headspace module) was used for analyses using helium as the carrier gas (flow 1mL/min). The column was a DB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). Injector and needle temperature were maintained at 250 °C and 90 °C, respectively. Sample incubation time was 900 seconds at 80 °C and the injection volume was 500 μ L in splitless mode. The temperature

programme was 40 °C for 2 min, then a rise of 2 °C/min and held at 135 °C for 15 min. For GC-MS analysis, an essential oil from the foliage of balsam fir was obtained by hydrodistillation as described by Simard et al. 1988 (S. Simard, Hachey, & Collin, 1988). In summary, 200g of balsam fir foliage was placed in a 2 L flask and 1 L of distilled water was added. Steam distillation was carried out for 2 h at atmospheric pressure. The same conditions were reproduced for the GC-MS analysis but the injection volume was 1µL in split mode (200:1).

For this study, all chemical standards were purchased from Sigma Aldrich-Fluka (Oakville, ON). The compounds were identified by a comparison of the retention time and mass spectra with the literature (Adams, 2007; Pichette et al., 2006; Régimbal & Collin, 1993), plus a database from LASEVE Laboratory of the University of Quebec at Chicoutimi (UQAC) and a commercial database.

2.4 Results and discussion

Most of the volatile molecules listed in the literature (Régimbal & Collin, 1993; S. Simard et al., 1988) were found in the chromatogram of the balsam fir essential oil of the control site analyzed by GC-MS (figure 2.1). However, the following components were absent: limonene, linalol, para-cymene, fenchene, sabinene and α -terpinene. These elements are usually described in the literature, but are not essential to the certification of the essential oil of balsam fir unlike the presence of bornyl acetate (Berger, 2007; Shaw, 1953).

In comparison to GC-MS chromatogram, an example of the chromatogram obtained by HS-GC is illustrated in figure 2.2. After several tests under different conditions, the method demonstrated in this article was the most optimal. A good signal was observed, suggesting that the equilibration time was long enough to allow the compounds to evaporate properly. In most of the obtained chromatograms, the baseline was flat and noise free. The components that are displayed on the GC-MS chromatogram (figure 2.1) were very similar to those of the HS-GC (figure 2.2). The retention times of the compounds in the HS-GC chromatogram were offset by about two minutes.

Some differences can be observed between these two analysis methods. Some compounds in figure 1 are not present in figure 2.2. such as α -thujene (3), fenchone (10), terpin-1-en-4-ol (16) and α -terpineol (17). The absence of these compounds may be explained by insufficient volatility or concentration of these compounds for HS-GC

detection. On the other hand, certain compounds are visible in figure 2.2 (Maltol, α -longipinene) and not in figure 2.1. However, the typical components of balsam fir foliage (β -pinene, δ -3-carene, borneol, bornyl acetate, etc.) were successfully identified by HS-GC (figure 2.2). This method therefore offers a sufficient performance in qualitative analyses and demonstrates that the chromatogram obtained by the HS-GC analysis of balsam fir needle samples is comparable to the GC-MS chromatogram. Moreover, the HS-GC technique offers the opportunity to perform a qualitative analysis without any extraction steps prior to analysis.

An example of a quantitative analysis was performed by using the HS-GC technique on a specific monoterpene, β -phellandrene, in order to rapidly analyze the variation of this molecule in trees defoliated by spruce budworm during the growing season (figure 2.3). Some studies in the literature suggest that β -phellandrene is released by the tree as a response to injury (Vereen et al., 2000) when the insect is feeding on the foliage. The quantitative analysis of β -phellandrene by HS-GC suggests that the two studied sites follow a similar pattern throughout the sampling with quantities ranging between 0 and 96%. The observed variations during spring (increase from 0% to 20% at DOY 161) and fall (increase of 5% to 35% at DOY 287) are consistent with the seasonal variations of monoterpenes described in the literature (Brooks & Borden, 1987; Von Rudloff & Granat, 1982) for a defoliated site and control site. At DOY 168 (mid-June), an important decrease (about 20% to 0% of β -phellandrene) was observed for both sites. A similar seasonal variation of β -phellandrene was observed between sites except for DOY 174 (figure 2.3). For the control site, a significant decrease

appeared (0% of β -phellandrene at DOY 168 and 174) while for the defoliated site, an increase of the monoterpene from 0% to 15% was observed. This increase in the defoliated site occurred exactly during the period of strong defoliation (end of June) (Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune, 2003) when a rain of spruce budworm faeces was observed on this sampling date (I. Simard et al., 2006; Isabelle. Simard, Morin, & Potelle, 2002). This difference between the two sites may suggest that the β -phellandrene was released by trees on the defoliated site in 2011 as a response to injuries. Accordingly, we hypothesized that β -phellandrene could contribute to the defense of trees against spruce budworm during that precise period.

Rapport-Gratuit.com

2.5 Conclusion

Static Headspace Gas Chromatography was a useful technique for qualitative and quantitative studies of balsam fir foliage and this method was comparable to the traditional GC methods. In addition to the simplicity of sample preparation, the HS-GC method offers good sensitivity and a high speed of execution. It allows a rapid analysis of the composition of volatile compounds in a multi-sample sequence. Also, the example of a quantitative analysis of a selected monoterpene (β -phellandrene) has demonstrated a variation between trees differently defoliated by spruce budworm during the growing season. These results suggest that β -phellandrene was released by trees on the defoliated site in 2011 as a response to injuries and could contribute to the tree defense against spruce budworm in that precise period.

2.6 Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Carole Grenon from LASEVE Laboratory for the help and suggestions and Maxime Caron for the help with translation. This work was supported by the CRSNG Discovery Grants and by the Ministère des Ressources Naturelles.

2.7 References

- [1] Direction de la protection des forêts, Aires infestées par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec en 2012, in: MRNF (Ed.), Gouvernement du Québec, Québec, 2012, pp. 21.
- [2] D. Gray, W. Mackinnon, Historical spruce budworm defoliation records adjusted for insecticide protection in New Brunswick, 1965–1992, *J. Acad. Entomol. Soc.*, 3 (2007) 1-6.
- [3] N. Carisey, E. Bauce, Balsam fir foliar chemistry in middle and lower crowns and Spruce budworm growth, development, food and nitrogen utilization, *Journal of Chemical Ecology*, 23 (1997) 1963-1978.
- [4] M. Kumbas, E. Bauce, Effects of tree age and stand thinning related variations in balsam fir secondary compounds on spruce budworm *Choristoneura fumiferana* development, growth and food utilization, *Agricultural and Forest Entomology*, 13 (2010) 131-141.
- [5] L. Taiz, E. Zeiger, *Plant Physiology*, 4 ed., Sinauer Associates Inc. publishers, Sunderland Ma (USA), 2006.
- [6] E. Lewinsohn, M. Gijzen, R. Croteau, Defense mechanisms of conifers: differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species, *Plant Physiology*, 96 (1990) 44-49.
- [7] M. Ibrahim, P. Kainulainen, A. Aflatuni, Insecticidal, repellent, antimicrobial activity, and phytotoxicity of essential oils; with special reference to limonene and its suitability for control insect pest, *Agricultural and food science in Finland*, 10 (2001) 243-259.
- [8] Phytochemical society of Europe, *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*, Oxford science publications, British, 1991.
- [9] M. Lamontagne, H. Margolis, E. Baune; Testing the ecophysiological basis for the control of monoterpene concentrations along canopy profiles in thinned and unthinned balsam fir stands, *Oecologia*, 124 (2000) 318-331.
- [10] J. Carlow, L. Ayers, A. Bailey, B. John, A. Richardson, Determination of volatile compounds in foliage of Fraser fir (*Abies fraseri*) and balsam fir (*Abies balsamea*), *Microchemical Journal*, 83 (2006) 91-97.
- [11] R. Schonwitz, L. Merk, M. Kloos, H. Ziegler, Influence of needle loss, yellowing and mineral content on monoterpenes in the needles of *Picea abies* (L.) Karst., *Trees Structure and Function*, 5 (1991) 208-214.
- [12] N.H. Snow, Head-space analysis in modern gas chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21 (2002) 608-617.
- [13] J.V. Hinshaw, Headspace Sampling, *LC-GC Europe*, 24(7) (2011) 538-546.
- [14] R.P. Adams, *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*, 4th Edition ed., Allured Business Media, Illinois, USA, 2007.
- [15] A. Pichette, P. Larouche, M. Lebrun, Composition and Antibacterial Activity of *Abies balsamea* Essential Oil, *Phytotherapy research*, 20 (2006) 371-373.

- [16] B. Kolb, L. Ettre, *Static headspace-gas chromatography: theory and practice*, Second edition ed., Wiley VRC, USA, 2006.
- [17] D. Vereen, J. McCall, D. Butcher, Solid phase microextraction for the determination of volatile organics in the foliage of Fraser fir (*Abies fraseri*), *Microchemical Journal*, 65 (2000) 269-276.
- [18] Direction de la protection des forêts, Aires infestées par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec en 2011, in: MRNF (Ed.), Gouvernement du Québec, Québec, 2011, pp. 22.
- [19] V. Holubova, P. Hrdlicka, V. Kuban, Age and space distributions of monoterpenes in fresh needles of *Picea abies* (L.) karst. Determined by gas chromatography-mass spectrometry, *Phytochemical Analysis*, 12 (2001) 243-249.
- [20] S. Simard, J. Hachey, J. Collin, The variations of essential oil composition during the extraction process. The case of *Thuja occidentalis* L. and *Abies balsamea* (L.) Mill, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 8 (1988) 561-573.
- [21] J.-M. Régimbal, J.G. Collin, Essential oil analysis of balsam fir *Abies balsamea* (L.) Mill., *Journal of Essential Oil Research*, 6 (1993) 229-238.
- [22] R.G. Berger, *Flavours and Fragrances Chemistry Bioprocessing and Sustainability*, Springer Berlin Heidelberg, Germany, 2007.
- [23] A.C. Shaw, The essential oil of *Abies Balsamea* (L.) Mill. , *Can. J. Chem.*, 31 (1953) 193-199.
- [24] E. Von Rudloff, M. Granat, Seasonal variation of the terpenes of the leaves, buds, and twigs of balsam fir (*Abies balsamea*), *Can. J. Bot.*, (1982).
- [25] J.E. Brooks, J.H. Borden, Seasonal variation in foliar and bud monoterpenes in Sitka spruce, *Can. J. Bot.*, 65 (1987) 1249-1252.
- [26] Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune,
<http://www.mrnf.gouv.qc.ca/forets/fimaq/insectes/cycle-vie-tordeuse.htm#haut>, Gouvernement du Québec, 2003.
- [27] I. Simard, H. Morin, C. Lavoie, A millennial-scale reconstruction of spruce budworm abundance in Saguenay, Québec, Canada, *Holocene*, 16 (2006) 31-37.
- [28] I. Simard, H. Morin, B. Potelle, A new paleoecological approach to reconstruct long-term history of spruce budworm outbreaks, *Can. J. For. Res.*, 32 (2002) 428-438.

2.8 Table List

Tree	Diameter (cm)	Height (m)
C	18.97±2.31	16.40±1.55
D	15.42±2.60	13.57±2.12

Table 2.1 Diameter (DBH 1.3m) and average height of the trees in the control site (C) and defoliated site (D).

2.9 Figure list

Figure 2.1 Traditional GC-MS chromatogram of essential oils from Balsam fir foliage: (1) Santene; (2) Tricyclene; (3) α -thujene; (4) α -pinene; (5) Camphene; (6) β -pinene; (7) β -myrcene; (8) δ -3-carene; (9) β -phellandrene; (10) Fenchone; (11) Terpinolene; (12) α -thujone; (13) Isopinocarveol; (14) Camphre; (15) Borneol; (16) Terpin-1-en-4-ol; (17) α -terpineol; (18) Piperitone; (19) Bornyl acetate; (20) Longifolene; (21) β -caryophyllene; (22) α -humulene; (23) α -bisabolene.

Figure 2.2 HS-GC chromatogram of balsam fir foliage powder : (1) Tricyclene (2) α -pinene; (3) Camphene; (4) β -pinene; (5) β -myrcene; (6) δ -3-carene; (7) β -phellandrene; (8) Terpinolene; (9) Maltol; (10) Camphre; (11) Borneol; (12) Myrtenal; (13) Piperitone; (14) Geraniol standard; (15) Bornyl acetate; (16) Longifolene; (17) α -longipinene; (18) β -caryophyllene; (19) α -humulene; (20) α -bisabolene.

Figure 2.3 Percentage of β -phellandrene (g/g) from foliage of balsam fir during 2011 growing season in samples analyzed for the control site and defoliated site on all selected trees. The grey section on the graph represents the period of defoliation.

Figure 2.1

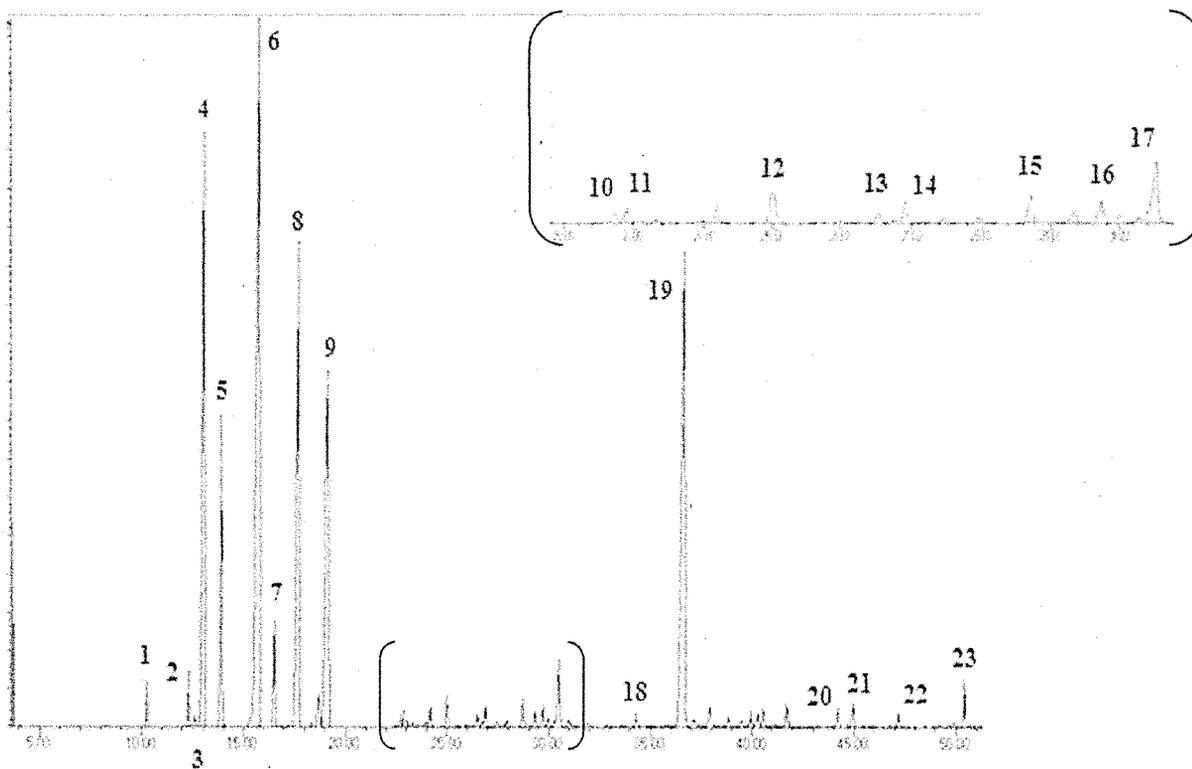


Figure 2.2

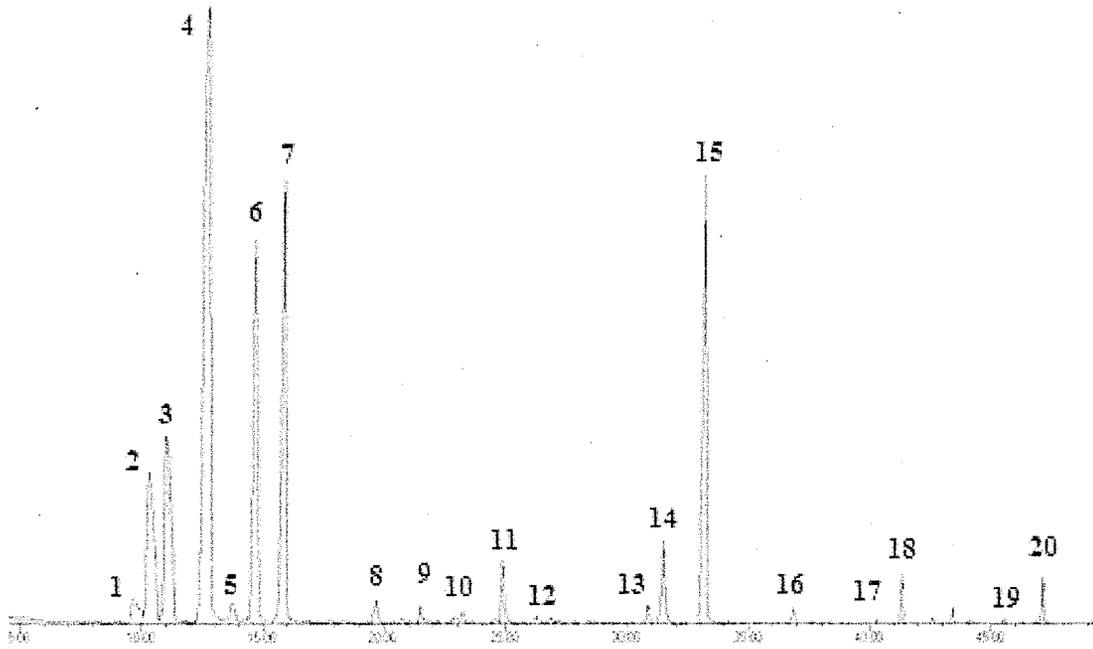
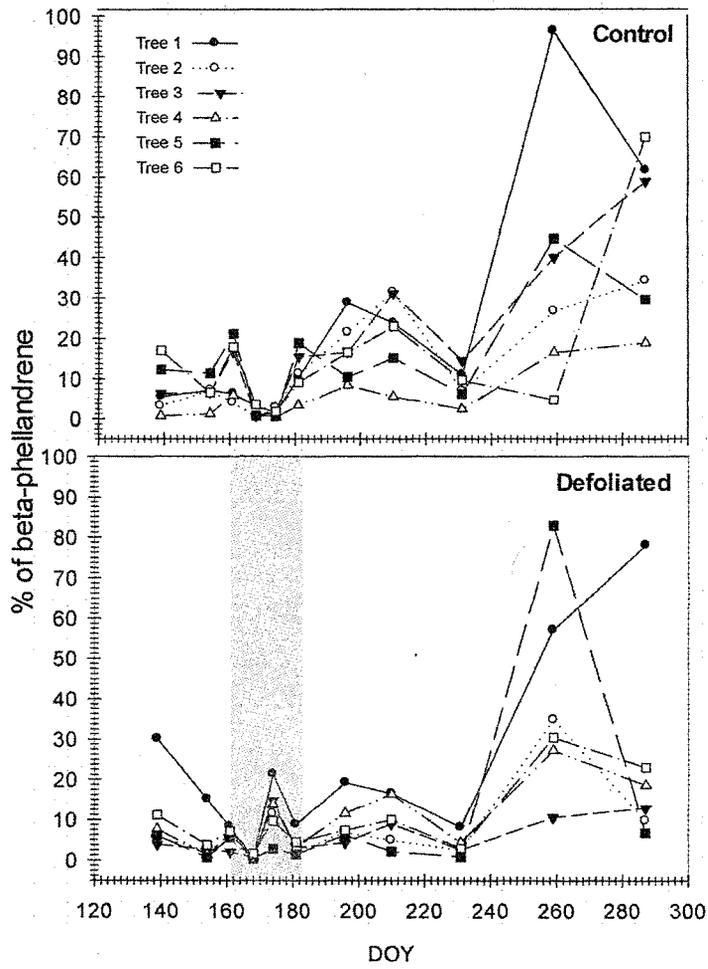


Figure 2.3



Chapitre III

Analyse de l'impact de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clem.) sur la croissance et la composition chimique de sapins baumiers (*Abies Balsamea* (L.) Mill) en milieu naturel.

Rapport-Gratuit.com

Analyse de l'impact de la tordeuse des bourgeons de l'épinette (*Choristoneura fumiferana* Clem.) sur la croissance et la composition chimique de sapins baumiers (*Abies Balsamea* (L.) Mill) en milieu naturel.

Caron Laurie, Deslauriers Annie, Mshvildadze Vakhtang, Sergio Rossi

Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, 555
Boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC G7H2B1, Canada

Attribution des tâches :

L'analyse des divers échantillons (terpènes, sucres et amidon, croissance cellulaire, etc.) et la rédaction de cet article ont été effectuées par Laurie Caron. L'analyse statistique et la révision du texte ont été effectuée en majeure partie par Annie Deslauriers et Sergio Rossi.

3.1 Résumé

La tordeuse des bourgeons de l'épinette (TBE, *Choristoneura fumiferana* Clem.) est actuellement l'insecte qui cause le plus de dommages dans les forêts boréales de l'Est de l'Amérique du Nord. Au Québec depuis 2006, les populations de tordeuses augmentent de façon constante; les superficies infestées en 2010 sont de plus de 600 000 hectares. Depuis 2011, une épidémie importante de TBE sévit dans plusieurs secteurs de la région du Saguenay Lac-Saint-Jean. L'objectif principal de cette recherche a été de dresser un portrait expérimental préliminaire de l'ensemble des réactions chimiques et physiologiques du sapin baumier en présence de la tordeuse des bourgeons de l'épinette à différentes intensités dans son milieu naturel. Lors de cette étude, trois hypothèses ont été testées dans le but de vérifier les diverses théories abordées en lien avec l'impact de la tordeuse des bourgeons de l'épinette sur le sapin baumier soit: (1) Augmentation de la production de métabolites secondaires en fonction de la sévérité de la défoliation; (2) Diminution des réserves d'amidon et de sucres solubles totaux (SST) afin de combler le manque de nutriments carbonés générés par la sévérité de la défoliation; et (3) Diminution de la croissance en fonction également du niveau de défoliation des sites. Deux d'entre elles (hypothèses 2 et 3) se sont avérées être confirmées tandis que l'hypothèse 1 s'est avérée être infirmée. Cela suggère donc que les arbres subissant une défoliation importante cessent de produire adéquatement les composés de défenses et d'accumuler convenablement les réserves d'amidon, de sucres solubles totaux utiles à leur maintien régulier. La différence observée entre les sites affectés par la TBE prouve que plus la défoliation est intense et dure longtemps plus le fonctionnement métabolique de l'arbre est atteint à plusieurs niveaux.

3.2 Introduction

Il existe plusieurs facteurs qui peuvent influencer la production des métabolites secondaires dans les aiguilles des conifères tels que les nutriments disponibles, l'eau, la lumière, les sucres solubles, etc. (Bauce, Carisey, & Boulet, 2006) et certaines études s'appuient fortement sur ces fondements. Trois grandes théories ont été élaborées concernant les facteurs principaux qui détermineraient la concentration des terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes, etc.) dans les aiguilles. L'une des premières théories mentionne que la lumière affecterait directement les réserves de monoterpènes par : (1) l'apport en énergie qu'elle apporte pour leur biosynthèse; (2) le contrôle du changement anatomique des feuilles; et (3) la photorégulation de la synthèse des monoterpènes dans le complexe des phytochromes en influençant ainsi l'expression des gènes (Lamontagne et al., 2000).

Une autre théorie s'appuie sur la quantité d'azote présente dans les tissus des organes produisant les terpènes. Cette théorie stipule que lorsque la quantité d'azote est grande dans les tissus des aiguilles, cela favoriserait une plus grande production d'enzymes. D'ailleurs, ces enzymes seraient d'avantages utilisés pour la synthèse des monoterpènes et la formation des structures de stockage dans les aiguilles (Lamontagne, Bauce, & Margolis, 2002). Une dernière théorie sur le sujet s'appuie pour sa part, sur la balance du ratio carbone-nutriment présent dans les tissus de la plante. Cette théorie suggère que lorsque les plantes accumuleraient beaucoup de glucides (surplus de glucides dans la plante), cela permettrait d'augmenter plus facilement la translocation de ces produits vers les voies de synthèse des composés de défenses à base de carbone, comme les monoterpènes (Lamontagne et al., 2000). Cette hypothèse serait surtout véridique lorsque la nutrition minérale deviendrait plus restrictive pour la croissance que pour la photosynthèse. Dans ce cas, la production de monoterpènes dans les tissus concernés serait directement liée à l'apport carbone/nutriment de la plante. Pour ainsi mesurer la disponibilité du carbone dans les aiguilles, les données les

plus pertinentes à obtenir sont la concentration de l'amidon et la concentration des sucres solubles totaux (SST) (Lamontagne et al., 2000).

Lors de cette étude, trois hypothèses ont été testées dans le but de vérifier les diverses théories abordées en lien avec l'impact de la tordeuse des bourgeons de l'épinette sur le sapin baumier :

1. Selon certaines études, les conifères subissant un stress (ex. : défoliation des aiguilles par des herbivores ou insectes) produiraient davantage de métabolites secondaires au niveau de leurs aiguilles pour se défendre et assurer leur survie (Tuomi & et al, 1988; Wagner & et al, 1985). Donc, en comparant les données de quantification des métabolites secondaires tels que les monoterpènes et sesquiterpènes, entre les trois différents sites de défoliation (témoin, moyen et élevé), il sera possible de constater une plus grande quantité de certains terpènes (soit au niveau qualitatif et quantitatif) chez les individus du site plus intensément défolié comparés aux sites témoin et modérément défoliés.

2. L'arbre subissant une défoliation majeure commencera à utiliser davantage les sucres solubles totaux pour ainsi combler le manque de nutriments (carbone, azote, phosphore, etc.) qui contribuent à sa croissance et son métabolisme (Stuart Chapin III et al., 1990; Willaume, 2011). En fait, la défoliation contribue à l'altération de la composition normale des réserves en carbone contenue dans les aiguilles ainsi que dans le tronc, et ce, en diminuant la quantité de ces réserves (Honkanen, 1999). De plus, un degré élevé de défoliation affecterait également les réserves d'amidon en les abaissant considérablement (Ericsson et al., 1980; Kobe, 1997). De ce fait, en comparant les données des différents sites, il sera possible de constater que chez les individus des sites

défoliés, la teneur des réserves de sucre et d'amidon sera plus basse comparé aux individus des sites témoins selon le moment de la croissance.

3. En étudiant, au niveau cellulaire, la formation du cerne de croissance, il sera possible d'obtenir des informations précises sur la xylogénèse et d'être en mesure d'identifier les évènements possibles qui ont pu causer certains stress à l'arbre qui est étudié (Deslauriers, 1999, 2003). La caractéristique qui prédomine dans le cerne de croissance de l'année étudiée est l'apparition d'une réduction de ce cerne durant la saison de croissance qui est touché par une épidémie de tordeuse des bourgeons de l'épinette (Krause & Morin, 1995). Donc, en comparant la croissance cellulaire (nombre de cellules dans le xylème) entre les individus et les sites il sera possible de constater une diminution de croissance (moins grand nombre de cellules dans le xylème) chez les arbres de défoliation moyenne à élevée comparativement au groupe d'individus du site témoins.

3.3 Méthodologie

3.3.1 Aire d'étude

3.3.1.1. Sites d'échantillonnages

Les sites d'échantillonnages étaient situés à environ 30 km de Saguenay dans la réserve faunique des Laurentides (figure 18, tableau 1). Le site témoin était localisé à la forêt d'enseignement Simoncouche (48° 12' 43.5' N, 71° 14' 26.6' W) et les sites à niveau de défoliation moyen (48° 16' 06.4' N, 71° 14' 29.6' W) et sévère (48° 16' 06.0' N, 71° 14' 52.5' W) étaient localisés près du site témoin dans la réserve faunique des Laurentides (figure 3.1). La défoliation courante a été estimée, à l'aide de lunettes d'approche, en observant le feuillage de la cime formée l'année même et en identifiant la classe de défoliation (Gionest, 1999; Maclean & Lidstone, 1982; Ministère Ressources naturelles et faunes & Gouvernement du Québec, 2011)). La défoliation a été aussi obtenue en observant l'échantillonnage des branches prises dans le milieu de la canopée des individus sélectionnés. Les classes qui ont été choisies pour le site à défoliation sévère étaient entre 41-60 % et 61-80 % (classe 3 et 4) de défoliation pour l'année courante (Ministère Ressources naturelles et faunes & Gouvernement du Québec, 2011). Pour le site à défoliation moyenne, les classes sélectionnées ont été de 21-40 % et 41-60 % (classe 2 et 3) durant l'année de défoliation (tableau 3.1). Ces classes ont été déterminées lors de la période de défoliation la plus intense soit au mois de juin 2011. Pour le site d'échantillonnage qui regroupait les témoins, il n'y avait aucunement la présence de défoliation. Ensuite, un nombre de six arbres dominants par site (18 individus) a été sélectionné.

3.3.1.2 Température et précipitations journalières

La température et les précipitations pour l'année 2011 ont été recueillies par la station météorologique de Bagotville (QC). Il n'y pas eu de hausses ou de baisses de température particulières lors du printemps ou de l'été (ex. : 30-35 °C pendant plusieurs semaines) ou de température sous les normales saisonnières (figure 3.2). La température a varié en général entre 15 °C et 20 °C durant la saison d'échantillonnage. Les précipitations ont été bien réparties durant la saison ce qui n'a pas engendré de sécheresse pour ce secteur.

3.3.2 Méthodes d'échantillonnage

Cinq types d'échantillons différents ont été récoltés selon le moment de la saison de croissance, soit des aiguilles (analyse des terpènes, des sucres et de l'amidon) des branches (contenu relatif en eau) des macro-carottes (analyse de l'amidon dans le tronc) et des micro-carottes (analyse de la formation du cerne de croissance et des caractéristiques anatomiques) (figure 3.3)). Les échantillons d'aiguilles et de branches ont été récoltés aux deux semaines au printemps et à toutes les semaines durant le mois de juin. Ensuite, la récolte s'est poursuivie aux deux semaines pour le mois de juillet et une seule fois par mois lors des mois d'août, septembre et octobre. Ces intervalles d'échantillonnage ont été faits dans le but d'avoir un portrait « avant » la période de défoliation intense (mai à mi-juin), « pendant » (mi-juin à juillet) et « après » (août, septembre et octobre). Pour leur part, les micro-carottes ont été amassées toutes les deux semaines (mai à octobre) pour ainsi obtenir un bon profil de croissance et finalement, les macro-carottes ont été récoltées une fois tous les mois (figure 3.3).

3.3.3 Récolte et conservation des échantillons

3.3.3.1 Aiguilles

Les aiguilles récoltées pour l'analyse des terpènes et des sucres ont été conservées dans des sacs de papier bruns et placés au congélateur à environ -20 °C. Seulement les aiguilles des trois premières années ont été conservées. Par la suite, les aiguilles ont été trempées dans de l'azote liquide à -196 °C afin d'arrêter toutes activités enzymatiques. Une quantité entre 5 et 10 g d'aiguilles ont été placées au lyophilisateur pendant une durée d'une semaine pour être ensuite broyées (Vibrant MM200 Retsch) pendant 5 minutes à 1 µm. Par la suite les aiguilles ont été entreposées au congélateur à -20 °C jusqu'à l'analyse des composés chimiques (Carisey & Bauce, 1997; Giovannelli, 2011).

3.3.3.2 Branches

Lors de l'échantillonnage, des petites sections de branches ont été pesées à l'aide d'une balance ($\pm 0,0001$) pour ainsi avoir leur masse fraîche. Ensuite, les branches ont été placées individuellement dans des pots différents contenant de l'eau distillé et filtrée à 0,22 µm, puis placés dans le noir dans le réfrigérateur à une température d'environ 3 à 4 °C. Après, 24 h, les branches ont été pesées afin d'obtenir la masse réhydratée. Puis, pour une durée de 48 h, ces échantillons ont été placés au four à 80 °C pour ensuite être repesés et ainsi obtenir leur masse sèche (Bartolomeo & Cristos, 2005; Morabito et al., 2006). Le contenu relatif en eau (%) a été calculé selon la formule :

$$CRE = \frac{M_f - M_s}{(M_r - M_s)} \times 100$$

où M_f est la masse fraîche, M_r la masse réhydratée et M_s la masse sèche.

3.3.3.3 Micro-carottes

Les micro-carottes ont été récoltées à l'aide d'un trephor suivant une trajectoire en spirale sur le tronc de l'arbre. Une distance d'environ 10 cm est respectée entre chaque échantillon récolté sur l'arbre (Rossi, Anfodillo, & Menardi, 2006). Les micro-carottes sont ensuite placées individuellement dans des vials de 2mL contenant de l'éthanol à 10 %.

3.3.3.4 Macro-carottes

Les macro-carottes ont été récoltées à l'aide d'une sonde de Presler et conservées au congélateur à -20 °C à l'arrivée au laboratoire pour être par la suite plongées dans l'azote liquide à -196 °C et lyophilisées pendant une semaine (Giovannelli et al., 2011). Ensuite, tous les échantillons ont été mis en poudre à l'aide d'un broyeur (Vibrant MM200 Retsch) et ce, pendant 5 minutes jusqu'à l'obtention d'une poudre à 1 µm pour ensuite être conservés au congélateur à -20 °C.

3.3.4 Analyse des échantillons

3.3.4.1 Cerne de croissance

Les micro-carottes ont été fixées dans de la paraffine à l'aide d'un circulateur (Automate pour le traitement des tissus Leica TP1020). Par la suite, des sections transversales d'environ 7 µm ont été coupées à l'aide d'un microtome à rotation (Microtome Leica RM 2245) et fixées sur des lames à l'aide d'albumine. Les lames ont ensuite été immergées successivement dans deux bains d'Histo-Clear™ pendant 10

minutes afin d'enlever la paraffine, puis dans deux bains contenant de l'éthanol à 100 % pendant 2 minutes afin de faire passer en solution l'Histo-clear™ et finalement dans l'eau dans le but de les réhydrater. Les échantillons ont ensuite été colorés à l'aide d'une solution à 0,05 % de crésyl violet acétate et ce, pendant 5 minutes pour être analysés sous le microscope. Pour chaque échantillon, les cellules du cambium, les cellules en élargissement, les cellules en formation des parois secondaires et finalement les cellules matures ont été dénombrées sur 3 files (Deslauriers, 1999).

3.3.4.2 Terpènes

Les échantillons d'aiguille ont été traités selon la méthodologie adaptée de Kolb et al. 2006 et l'article « Volatile compounds in the foliage of balsam fir analyzed by Static Headspace Gas Chromatography (HS-GC): an example of the spruce budworm defoliation effect in the boreal forest of Quebec, Canada » présenté au chapitre précédent.

3.3.4.3 Analyse des sucres solubles totaux dans les aiguilles et le bois

La méthodologie de l'analyse des sucres solubles totaux a été faite selon la méthode adaptée de Chow et Landhausser (2004). Cette méthode consiste premièrement à extraire les sucres à l'éthanol chaud à 80 % et à utiliser la technique phénol - acide sulfurique. Les sucres (surtout glucose, fructose et galactose) neutres donnent des dérivés furfurals qui se condensent avec le phénol pour former un complexe jaune. L'absorbance de ces échantillons est alors mesurée à 490 nm à l'aide

d'un spectrophotomètre UV-VIS. Plus l'absorbance observée est élevée, plus la quantité de SST est grande. Les quantités de sucres sont alors transformées en mg/g d'échantillon sec.

3.3.4.4 Amidon dans les aiguilles et le bois

L'analyse de l'amidon a été réalisée selon la méthode adaptée de Chow et Landhausser (2004). Cette méthode consiste à analyser l'amidon à l'aide d'une technique de digestion enzymatique avec l'amylase et l'amyloglucosydase. Les chaînes de glucoses formant ainsi l'amidon se scindent et il est alors possible d'analyser la concentration de ces composés par absorbance à 520 nm sur un spectrophotomètre UV-VIS. Plus l'absorbance observée est élevée, plus la quantité d'amidon est importante. Ces quantités sont alors transformées en mg/g d'échantillon sec.

3.3.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques se composent d'ANOVA à mesures répétées pour l'analyse des concentrations de sucres, de terpènes, d'amidon et du contenu relatif en eau selon les dates d'échantillonnage. Ensuite, pour l'analyse qualitative de la composition en terpène, l'ANOVA à mesures répétées et l'analyse de Tukey sont utilisés afin de comparer les différentes classes de défoliation des sites analysés. Pour la croissance intra-annuelle, l'analyse statistique utilisée est la méthode de la fonction de Gompertz avec comparaison de courbes non-linéaire (NLIN procedure dans SAS) afin de déceler les différences de croissance entre les sites selon les jours d'échantillonnages (Deslauriers, 2003; Potvin & Lechowicz, 1990) :

$$y = I + A \exp(-e^{(\beta - \kappa t)})$$

où les paramètres A , β et κ sont l'asymptote de croissance, l'axe du temps et le taux de changement de la courbe, respectivement, et le I représente la croissance initiale, qui est placée à zéro pour la croissance radiale. Le point d'inflexion de la courbe correspondant au jour julien de maximum de croissance (Rossi et al. 2006) a été déterminé à l'aide de cette équation :

$$t_p = \frac{\beta}{\kappa}$$

Le taux absolu de croissance (r) a été calculé selon l'équation suivante :

$$\mathbf{r} = \frac{A\kappa}{4}.$$

La durée de formation du cerne de croissance a été calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$\mathbf{d} = \frac{4}{\kappa}.$$

3.4 Résultats

3.4.1. Contenu relatif en eau (CRE)

Le contenu relatif en eau (CRE) à l'intérieur de l'arbre n'est pas constant durant la saison de croissance. Pour cette étude, la mesure de CRE a été prise durant toute la saison d'échantillonnage (figure 3.4). Il est possible d'observer que les échantillons du site à défoliation sévère ont obtenu des pourcentages de contenu relatif en eau (CRE) plus bas sur une tendance générale (variation entre 50 % et 70 %) en comparaison avec ceux des pourcentages de CRE des échantillons à niveau de défoliation moyen (variation entre 40 % et 80 %) et du site témoin (variation entre 45 % et 100 %). Pour leur part, les pourcentages de CRE obtenus pour les échantillons du site témoin tendent à être plus élevés comparativement aux classes de défoliation. Pour le site à niveau de défoliation moyen, les résultats de pourcentage de CRE se situent en partie entre les résultats du site témoin et ceux du site à niveau de défoliation sévère. De plus, malgré ces différences de résultats, les trois sites suivent en général le même modèle, et ce, tout le long de la saison d'échantillonnage.

Lors du premier jour d'échantillonnage (jour 139), les branches n'ont pas été classées par arbre, mais par site. Cela n'a donc pas permis de pouvoir obtenir un écart-type pour cette date. Pour le jour julien 168, une différence significative ($p < 0,0001$) a été observée entre les trois sites avec un contenu en eau plus bas pour les arbres sévèrement défoliés. Ensuite, une baisse suivie d'une hausse plus importante du pourcentage de CRE est observable jusqu'à la fin de la saison de croissance pour les trois sites suivant les patrons de précipitation, mais sans différence significative entre les classes de défoliation.

3.4.2 Quantification des sucres solubles totaux dans les échantillons d'aiguilles et de bois

Les quantités de sucres solubles retrouvées dans les échantillons d'aiguilles et de bois des trois sites ont été comparées entre eux (figure 3.5, graphique en haut à gauche). Cette comparaison permet de voir si la quantité de sucres solubles dans les tissus étudiés des arbres affectés par la TBE est différente du site témoin.

3.4.2.1 Échantillons d'aiguilles

La quantité de sucres solubles totaux (mg/g) varie entre 10mg/g et 50mg/g dans les échantillons d'aiguilles, et ce, pour les trois sites (figure 3.5). La courbe représentant le site témoin montre une quantité moins élevée de SST en comparaison avec les autres sites, et ce, jusqu'au jour julien 210 (équivalent à la fin juillet). Après cette date, il s'en suit d'une augmentation importante du pourcentage de sucres solubles pour ce site. Pour les sites à niveau de défoliation sévère et moyen, la quantité de SST diffère très peu entre eux, et ce, jusqu'au jour julien 210. Par la suite, les résultats divergent entre eux pour les jours juliens 231 et 259 pour enfin se rejoindre au jour julien 287. L'analyse ANOVA réalisée sur ces données démontre la différence significative entre les dates pour presque tous les jours juliens d'échantillonnage (139, 154 et de 181 à 287; tableau 3.2 figure 3.5).

3.4.2.2 Échantillons de bois

Pour sa part, la quantité de SST dans les échantillons de bois varie entre 10,5 mg/g et 55 mg/g (figure 3.5, graphique en haut à droite). Les courbes du site témoin et du site à niveau de défoliation sévère suivent un modèle semblable contrairement au site à niveau de défoliation moyen qui varie selon son propre patron. Les analyses

statistiques ANOVA ont démontré pour ces résultats une différence significative pour deux dates d'échantillonnages (196 et 231; tableau 3.3). Le jour julien 196, pour les sites témoin et à défoliation sévère, marque une augmentation importante de SST pour ces deux sites. Outre cette date, il n'y a pas d'augmentation ou de diminution qui semblent refléter un modèle distinct de quantité de sucres solubles totaux dans les échantillons de bois en fonction de la saison de croissance.

3.4.3 Quantifications de l'amidon dans les échantillons d'aiguilles et de bois

L'amidon est un polysaccharide par la présence de plusieurs chaînes de glucoses connectées entre elles. La quantification de cette molécule complexe dans les divers échantillons d'aiguilles et de bois permet de voir les différences entre les sites affectés par la tordeuse des bourgeons de l'épinette et le site témoin.

3.4.3.1 Échantillons d'aiguilles

Les résultats obtenus pour l'amidon dans les aiguilles de sapins baumiers analysés varient entre 0 mg/g et 120 mg/g pour les courbes des trois sites à l'étude et celles-ci tendent à suivre le même patron saisonnier de variation (figure 3.5, graphique en bas à gauche). Les analyses statistiques ANOVA ont démontré pour ces résultats une différence significative pour les dates d'échantillonnages 154, 161, 168, 174, 181, 196 et 210 (tableau 3,2).

En tendance générale, le site témoin a obtenu une quantité d'amidon plus élevée que les deux autres sites se situant ainsi entre 0 mg/g et 120 mg/g, et ce, pour toute la saison de croissance. Le site à niveau de défoliation sévère a obtenu une quantité d'amidon entre 0 mg/g et 50 mg/g ce qui situe ces résultats plus bas que les autres sites.

Pour leurs parts, les résultats du site à niveau de défoliation moyen varient entre 0 mg/g et 70 mg/g et se sont situés à mi-chemin entre ceux du site témoin et ceux du site à défoliation sévère. Une importante augmentation variant de 40 mg/g à 100 mg/g selon le site, marque les jours juliens d'échantillonnage 161 (site moyen) et 168 (site témoin et sévère) (figure 3,5). Ensuite, pour les cinq dates d'échantillonnages (174 à 231) qui suivent, une baisse importante de la quantité d'amidon pour les trois sites à l'étude (diminution entre 50mg/g et 110mg/g) est observable pour cette portion de la saison d'échantillonnage. Une dernière augmentation d'environ 20 mg/g du résultat d'amidon pour le jour julien d'échantillonnage 259 est observable pour les trois sites et marque ainsi la fin de la saison de croissance.

3.4.3.2 Échantillons de bois

Les trois sites à l'étude suivent le même modèle et la quantité d'amidon contenu dans les échantillons de bois varient entre 0 mg/g et 16 mg/g (figure 3.5, graphique en bas à droite). En général, les quantités d'amidon ne diffèrent pas beaucoup entre les sites. Le site témoin subit une augmentation plus importante de 6mg/g au jour julien 161 comparativement aux deux autres sites qui augmentent de 2mg/g (figure 3.5). Par contre, cette différence n'est pas statistiquement significative. Ensuite, les réserves en amidon dans le bois se vident durant l'été (jour julien 196 et 231) pour ensuite reformer des réserves l'automne venu (jour julien 259-287). Par contre, les analyses statistiques ANOVA n'ont démontré aucune différence significative entre les dates d'échantillonnages (tableau 3.3).

3.4.4 Formation du cerne de croissance

Au début de la saison de croissance, l'augmentation du nombre de cellules du cambium représente la réactivation du tissu produisant le bois. Les cellules du cambium suivent le même patron de variation intra-annuelle soit une courbe en cloche avec un maximum au jour julien 161 pour l'ensemble des classes de défoliation (figure 3.6a,). La variation du nombre de cellules du cambium reflète les classes de défoliation, car au maximum de production, le nombre de cellules du cambium est plus élevé chez les arbres non défoliés (10 cellules) comparativement aux arbres défoliés modérément (8 cellules) et sévèrement (6.5 cellules). La médiane de la production de cellules de cambium est de 6 cellules en moyenne pour le site témoin, 5,5 pour le site moyen et de 5 pour le site sévère (figure 3.6a, graphique interne).

Pour les courbes représentant la formation des cellules en élargissement, le modèle retrouvé sur ce graphique est très similaire à celui du dénombrement des cellules cambiales (figure 3.6b). Le maximum de la production de cellules en élargissement représenté aux jours juliens 161-168, démontre une certaine variation à ces dates entre les classes de défoliation. Par la suite, le nombre de cellules en élargissement des arbres sévèrement défoliés diminue plus tôt au cours de la saison (jour 161) comparativement aux autres classes de défoliation (jour 161). La médiane de cellules pour le site témoin est de 4 comparativement à 1,5 pour les sites à défoliation moyenne et sévère respectivement (figure 3.6, graphique interne).

Les courbes représentant le nombre de cellules en lignification produit lors de la saison de croissance suivent un modèle similaire (figure 3.6c). En général, pour les trois sites, une hausse du nombre de cellules à partir du jour julien 161 se poursuit jusqu'au maximum de production (jour 181). Après cette date d'échantillonnage, une constance du nombre de cellules en lignification (site sévère et moyen) ou d'une légère augmentation

(site témoin jusqu'au jour julien 259) (figure 3.6c) est observable. Par la suite, il est possible d'apercevoir une baisse générale du nombre de cellules jusqu'au jour d'échantillonnage 301 pour les trois sites à l'étude. La médiane de production de cellules en lignification est de 6 , 4 et 3 pour les arbres témoins, moyennement et sévèrement défoliés respectivement (figure 3.6c, graphique interne).

Les courbes représentant le dénombrement de cellules matures suivent le même modèle, et ce, durant toute la saison de croissance (figure 3.6d). Il est possible de voir, pour les cinq premières dates d'échantillonnages (jour julien 132 à 168), que les résultats pour les trois sites sont similaires. Par la suite, jusqu'à la fin de la saison d'échantillonnage, le nombre de cellules matures est en général en hausse, et ce, jusqu'au dernier jour julien d'échantillonnage pour les trois sites. Pour le nombre de cellules totales, il est possible d'observer une augmentation constante pour les trois sites, et ce, tout le long de la saison de croissance (figure 3.6e). Seulement vers la fin de la saison d'échantillonnage, à partir du jour julien 273, les sites commencent à démontrer certaines différences (hausse pour le site moyen, baisse pour le site témoin et sévère), et ce, pour les quatre dates d'échantillonnage restantes (figure 3.6e). Les courbes ayant une ligne continue (témoin) , pointillée (moyen) et à trait (sévère) représentent la courbe qui a été estimée par la fonction de Gompertz pour chaque site.

Dans l'ensemble, il est possible de voir que la formation du cerne de croissance présente des différences entre les sites (tableau 3.4). Selon la comparaison des courbes de croissance selon la méthode de Potvin et al. (1990), une valeur de $p < 0,0001$ a été obtenu démontrant ainsi une différence significative dans la croissance intra-annuelle entre les sites à l'étude. Le site témoin a produit un nombre beaucoup plus important de cellules (54,16) que les sites moyen (34,33) et sévère (21,19) au cours de la saison d'échantillonnage. Le taux de production de cellule (r) démontre également que le site témoin a eu une production de cellules plus importantes que les autres sites (tableau

3.4). Le point d'inflexion de la courbe (β/κ) indique le jour julien où la croissance a atteint son maximum. Pour chaque site ce résultat se situe entre les jours juliens d'échantillonnage 168 et 174. La durée de formation des cellules ($d(j)$) est beaucoup plus courte chez le site témoin (95 jours) que chez les sites moyen (130 jours) et sévère (120 jours).

3.4.5 Mesure des cernes de croissance sur cinq années

En mesurant les cernes sur quelques années, il est ainsi possible de voir la progression de la croissance de l'arbre. Cette technique aide à démontrer davantage les différences entre les trois sites à l'étude. Les régressions linéaires agencées aux courbes des mesures de cernes permettent de bien voir la diminution de croissance cellulaire pour les sites à défoliation sévère et moyen (figure 3.7). La largeur des cernes du site à défoliation sévère diminue plus rapidement que ceux du site à défoliation moyenne (diminution de -0.87 mm/année comparativement à -0.81 mm/année respectivement). Pour sa part, les mesures de cerne du site témoin augmentent d'une année à l'autre (pente de 0.53 mm/année) sauf pour l'année 2010, où il est possible d'observer une baisse dans la largeur des cernes mesurés (figure 3.7). Les analyses statistiques ANOVA ont démontré pour ces résultats une différence significative entre les années seulement pour 2011 ($p=0,0258$).

3.4.6 Qualification des terpènes présents dans les échantillons d'aiguilles

Selon la concentration des terpènes présents, le nombre de composés détectables peut ainsi varier d'un échantillon à l'autre. Selon l'intensité de défoliation, il est également possible de voir une certaine variance entre les composés présents ou non dans les échantillons analysés.

3.4.6.1 Chromatogramme HS-GC et identification des composés

L'analyse des échantillons par HS-GC permet de fournir un chromatogramme détaillé qui permet d'observer chaque composé présent (figure 3.8). Il est possible de détecter une grande quantité de composés volatils qui sont pour la plupart des monoterpènes et des sesquiterpènes. De plus, l'observation des molécules identifiées sur le chromatogramme permet de remarquer que certains composés ne sont pas des terpènes, mais des dérivés des terpènes ou d'autres types de molécules (figure 3.8; tableau 3.5). Ils sont présents sur le chromatogramme HS-GC, car ces composés sont volatils et peuvent ainsi être analysés et identifiés par la méthode utilisée.

La plupart des chromatogrammes analysés pour les trois sites comportent entre une dizaine et une vingtaine de composés identifiés. La majorité des composés se situe au début du chromatogramme entre les temps de rétentions de 9 à 34 minutes environ et fait parties en grande majorité de la classe des monoterpènes (figure 3.8; tableau 3.5). Les autres molécules d'intérêts se situent vers les 35 minutes à 50 minutes de temps de rétention et sont en grande majorité des sesquiterpènes. Les composés d'intérêts qui ont été quantifiés sont le δ -3-carène et le β -phellandrène et sont représentés par les nombres 6 et 7 sur le chromatogramme. De plus, il faut noter que le standard de géraniol utilisé pour l'analyse quantitative qui est représentée par le nombre 14 sur le chromatogramme, ne se retrouve naturellement pas dans les

d'aiguilles de sapin baumier. Les composés tels le β -pinène (pic avec le nombre 4) et l'acétate de bornyl (pic avec le nombre 15) sont des composés caractéristiques des aiguilles de sapins baumiers et leur présence certifie la qualité des échantillons.

3.4.6.2 Variance des différents composés dans les échantillons

Une analyse qualitative devient intéressante lorsqu'elle permet de démontrer une divergence entre les individus des différents sites, à savoir la présence ou l'absence d'un certain composé d'importance. Normalement, les aiguilles du sapin baumier sont constituées des mêmes molécules et celles-ci peuvent varier en fonction du temps de l'année. L'analyse statistique d'ANOVA et de Tukey permet de déceler les différences significatives observables entre les composés retrouvés dans les échantillons analysés (figure 3.9). Les composés retrouvés les plus souvent durant l'ensemble de la saison de croissance tels que le tricyclène, α -pinène, camphène, β -pinène, β -myrcène, bornéol, acétate de bornyl, longifolène et α -humulène ne varient pas entre les individus et les différentes classes de défoliation (figure 3.9). Ces molécules sont, pour la plupart, des monoterpènes et quelques sesquiterpènes.

Certains composés (para-cymène, myrtal, pipéritone) ont démontré une différence entre le site à défoliation moyen en comparaison avec les autres sites, car ces composés étaient significativement plus présents. D'autres composés, tel que le thymol, sont significativement moins présents (environ 5 % de présence) dans les échantillons du site à niveau de défoliation moyen. Pour le site à défoliation sévère, une différence a été observée seulement pour un monoterpène et deux sesquiterpènes (le terpinolène, le β -caryophyllène, et le β -bisabolène), car ces composés étaient plus absents (environ 10% de présence pour le terpinolène et 70 % de présence pour les sesquiterpènes) comparativement aux autres sites (40 % à 50 % pour le terpinolène et presque 100 % de présence pour les sesquiterpènes) (figure 3.9). Le δ -3-carène, le maltol et le camphre

ont présenté des ressemblances entre les deux sites affectés par la tordeuse des bourgeons de l'épinette (pourcentage de présence plus élevé), mais étaient différents significativement du site témoin (pourcentage de présence plus bas). Un seul composé, le linalool, a démontré une différence significative entre les trois sites (figure 3.9).

3.4.7 Quantification des monoterpènes sélectionnés dans les échantillons d'aiguilles

Les métabolites secondaires tels que les monoterpènes et les sesquiterpènes présents dans les tissus analysés peuvent varier en fonction du niveau de défoliation des arbres affectés. Ils sont un premier pilier de défense contre les attaques d'insectes et contribuent ainsi à la survie de l'arbre

3.4.7.1 Premier composé analysé : δ -3-carène

Le δ -3-carène a été choisi pour être quantifié, car il y avait de la variance entre les différents sites d'échantillonnages comparativement aux autres monoterpènes présents dans les échantillons (figure 3.9). Les courbes représentant la quantité mg/g de δ -3-carène pour chaque arbre suivent une variation intra-annuelle similaire entre les sites (figure 3.10) lorsque les échantillons analysés présentaient ce composé. Chaque arbre est représenté par une courbe, car la variance entre les données permettait difficilement la production d'une moyenne pour ces données, à cause de l'absence de δ -3-carène chez de nombreux arbres, surtout ceux sévèrement défoliés.

Les résultats obtenus pour les trois sites varient entre 0 mg/g et 1000 mg/g. En général, les quantités obtenues subissent des augmentations et des diminutions successives. Pour certains arbres, il était impossible de quantifier le δ -3-carène, car les concentrations se situaient en dessous de la limite détectable. Le site à niveau de défoliation sévère présente seulement un seul arbre détenant des concentrations

quantifiables (figure 3.10). Pour leur part, les sites à niveau de défoliation moyen et témoin ont respectivement trois arbres et un arbre qui n'ont pas de résultats pour le δ -3-carène. La principale différence entre les sites se situe au jour julien 174, car il est possible d'observer que pour les sites à niveau de défoliation sévère et moyen, il y a une importante augmentation de la concentration de δ -3-carène comparativement au site témoin où il y a une diminution importante (figure 3.10).

3.4.7.2 Deuxième composé analysé : β -phellandrène

Le β -phellandrène a aussi été choisi pour être quantifié, car ces résultats semblaient présenter une différence observable à l'œil sur les chromatogrammes, entre les sites d'échantillonnages comparativement aux autres monoterpènes présents dans les échantillons. Toutefois, cette différence s'est révélée n'être pas significativement différente (figure 3.9). Les courbes représentant la quantité en mg/g de β -phellandrène pour chaque arbre suit un modèle similaire entre les sites (figure 3.11). Chaque arbre est représenté par une courbe, comme pour le δ -3-carène, car il était difficile d'utiliser une moyenne pour ces résultats. Il est possible d'observer que les pourcentages obtenus pour les trois sites varient entre 0 mg/g et 960 mg/g. Il a été possible de quantifier toutes les concentrations obtenues pour ce monoterpène, car elles se situent au-dessus de la limite détectable. En général, les quantités obtenues subissent des augmentations et des diminutions successives pour les trois sites selon les jours d'échantillonnages (figure 3.11).

La principale différence entre les sites se situe au jour julien 174, car il est possible d'observer que pour les sites à niveau de défoliation sévère et moyen, il y a une forte augmentation de β -phellandrène comparativement au site témoin où il y a une diminution importante (figure 3.11).

3.4.8 Discussion

La discussion sera divisée en deux sections, la première traitera de l'impact de la défoliation sur la production des composés de défense (métabolites secondaires) et la deuxième portera sur l'impact de la défoliation sur la croissance intra-annuelle. De cette façon, toutes les données pourront être mises en relation afin de discuter de l'ensemble de la réaction physiologique, des sapins étudiés dans le cadre de cette étude, face à la tordeuse des bourgeons de l'épinette.

3.4.8.1 Impact de la défoliation sur les composés de défense du sapin baumier

3.4.8.1.1 Influence des glucides sur la synthèse des composés de défenses

Selon les trois grandes théories qui influenceraient la concentration des composés de défense dans les aiguilles, les terpènes ne seraient pas seulement influencés par un stress tel que la tordeuse des bourgeons de l'épinette, mais aussi par d'autres facteurs tels la lumière, les nutriments et la balance carbone/nutriments (Lamontagne & Bauce, 2002; Lamontagne et al., 2000). Dans la présente étude, la quantité de nutriments ainsi que la capacité de photosynthèse reliée à la présence de la lumière n'ont pas été étudiés ce qui ne permettra pas d'élucider l'influence que l'azote et la lumière ont sur la quantité des composés de défense. Par contre, lors de l'échantillonnage des aiguilles, un élément en lien avec l'effet de la lumière a été considéré. Les échantillons ont été récoltés dans le milieu de la canopée, car c'est à cet endroit que la lumière y serait la plus optimale pour la formation des composés de défense (Carisey & Bauce, 1997). Selon certaines expérimentations passées effectuées par Lamontagne et al. (Lamontagne & Bauce, 2002; Lamontagne et al., 2000) sur des

arbres ayant subi des coupes pré-commerciales, la balance carbone/nutriment serait difficilement observable sur ces arbres dus aux nombreux facteurs influençant cette balance. La concentration des terpènes serait d'avantages corrélés aux SST et à l'amidon en fonction du stade phénologique des aiguilles. Les jeunes aiguilles produiraient naturellement plus de monoterpènes que les aiguilles matures (Bauce, Crepin, & Carisey, 1994) ce qui suggèrerait que la concentration des monoterpènes dans les aiguilles serait contrôlée principalement par le surplus des glucides disponibles tôt dans la saison de croissance et, plus tard dans la saison, par la capacité enzymatique des aiguilles. Selon Kozłowski et Pallardy (1997), les insectes défoliateurs affecteraient directement les arbres en diminuant leur quantité de réserves en glucides et d'hormones régulatrices servant pour le maintient générale de l'arbre et de la croissance. La TBE s'attaque souvent à la canopée supérieure et celle du milieu, ce qui affecterait davantage la production de réserves de glucides qui se concentre dans ces parties de l'arbre dû à la présence de plus de luminosité. D'ailleurs, les données obtenues pour l'amidon tendent dans ce sens.

Les données de SST et d'amidon recueillies pour les trois sites à l'étude varient entre les sites et les dates d'échantillonnages. Ces variations, surtout pour l'amidon dans les aiguilles et le bois (figure 3.5), correspondent aux variations saisonnières inscrites dans la littérature soit par une augmentation au printemps lors de la sortie des bourgeons et à l'automne pour la préparation de l'arbre à l'hiver (Ashworth et al., 1993; Little, 1970). Les SST sont plus difficilement liés à ce qui se décrit dans la documentation scientifique due aux variations très prononcées des résultats obtenus pour les quantités de SST dans les aiguilles et dans le bois (figure 3.5). Il est toutefois possible de voir une différence saisonnière plus prononcée entre les sites surtout pour les données d'amidon dans les aiguilles. Aux jours d'échantillonnage 161 (site moyen) et 168 (sites témoin et sévère), une importante augmentation pour tous les sites indique le stockage de réserve d'amidon dans les aiguilles en vue de la croissance primaire.

Chez les arbres affectés par la TBE, un entreposage dit « saisonnier » en amidon a été mesuré au début de l'été, mais les quantités étaient nettement inférieures comparativement au site témoin (figure 3.5). Par exemple, les arbres sévèrement défoliés ont entreposé deux fois moins d'amidon (50 mg/g) que les arbres témoins. De plus, les réserves mesurées au jour julien 161-168 ont été épuisées après deux semaines seulement, au jour julien 174. En comparaison, les arbres non défoliés utiliseront les réserves en amidon des aiguilles de façon graduelle, jusqu'au jour julien 231. Cette différence de 60 jours démontre que les arbres sévèrement affectés par la TBE ont la capacité d'entreposer de l'amidon, mais ce, en moins grande quantité et l'épuise définitivement plus rapidement. Le contenu relatif en eau (CRE) serait un facteur pouvant influencer le stockage de la quantité d'amidon dans les tissus comme les aiguilles (Little, 1970). Pour cette étude, les données de CRE (figure 3.4) recueillies pour les trois sites n'ont pas démontré qu'elles étaient différentes entre elles. Alors, le CRE ne peut être considéré comme ayant un impact sur l'entreposage de l'amidon.

En résumé, selon la voie de biosynthèse des monoterpènes, qui dépendent directement des glucides disponibles qui se transforment en acétyl-CoA (chapitre I; figure 1.1), les arbres des sites défoliés disposeraient de moins de ressources pour la synthèse des composés de défenses comparativement aux arbres non défoliés ce qui a possiblement affecté la synthèse de certains composés.

3.4.8.1.2 Variation dans la synthèse du nombre de composés de défense en fonction de la défoliation

La qualification des terpènes dans cette étude a apporté peu de précisions sur les terpènes présents ou non selon les différentes classes de défoliation. Par contre, pour le site à défoliation sévère, une différence a été observée pour un monoterpène et deux sesquiterpènes (terpinolène, le β -caryophyllène, et le β -bisabolène). Le

terpinolène et le β -caryophyllène sont des composés reconnus pour être des composés actifs dans la défense des arbres, notamment, en réduisant significativement la croissance des larves de TBE (Bauce et al., 1994; Carisey & Bauce, 1997; Phytochemical Society of Europe, 1991). Tout comme le δ -3-carène, ils sont moins présents dans les arbres sévèrement défoliés. Cela appuierait le fait que les arbres à défoliation sévère ont de la difficulté à synthétiser les composés de défense dus à la quantité moins abondante de réserves (amidon) et de SST présents dans les aiguilles.

3.4.8.1.3 Synthèse des monoterpènes en réaction à la TBE

L'analyse quantitative réalisée sur deux monoterpènes (δ -3-carène et le β -phellandrène) lors de cette étude, démontre que pour la production du δ -3-carène, les arbres du site sévère (1 arbre sur 6) et du site moyen (3 arbres sur 6) ont difficilement produit ce monoterpène (figure 3.10), comparativement aux arbres du site témoin. L' δ -3-carène est d'ailleurs reconnu pour être un composé de défense actif contre la TBE (Bauce et al., 1994; Carisey & Bauce, 1997) en nuisant au développement normal de l'insecte (surtout au sixième stade de croissance). Pour sa part, le β -phellandrène, qui au départ semblait varier entre les sites, a été produit en quantité similaire pour tous les arbres de chaque site (figure 3.11). Les deux monoterpènes sélectionnés, lorsque synthétisés par les arbres, ont suivi un modèle semblable aux variations saisonnières retrouvées dans la littérature (Brooks & Borden, 1987).

Une différence marquante au niveau d'une seule date d'échantillonnage (jour julien 174) a été décelée pour les deux monoterpènes. Une importante augmentation de la quantité de δ -3-carène et de β -phellandrène a été observée pour les sites à niveau de défoliation moyen et sévère (figure 3.10-3.11). Cette augmentation s'est d'ailleurs exactement passée au cours de la période de forte défoliation (fin juin) quand une pluie de crottins de tordeuse a été observée à cette date d'échantillonnage (I. Simard et al.,

2006; Isabelle. Simard et al., 2002). Ce jour d'échantillonnage correspond également avec la diminution drastique de l'amidon dans les aiguilles des arbres du site à niveau de défoliation sévère et également à la diminution des sucres solubles totaux (SST) disponibles également dans les aiguilles du site de défoliation sévère (figure 3.4). Selon ces observations, il serait possible d'émettre l'hypothèse que l'augmentation des monoterpènes soit en lien plus ou moins direct avec un effet de « dernière chance » utilisé par l'arbre pour se défendre contre la forte défoliation de la TBE dû à une différence bien marquée dans le temps. Il est intéressant de comparer cette hypothèse avec certaines sources qui stipulent que les arbres qui seraient affectés par un insecte défoliateur ne produiraient pas d'avantages de composés de défenses, mais que ce sont les arbres situés près de ces arbres défoliés par les insectes qui seraient plus aptes à en produire (Kozlowski & Pallardy, 1997).

3.4.8.2 Impact de la défoliation sur la croissance intra-annuelle

3.4.8.2.1 Croissance en lien avec l'amidon et le SST

Les résultats obtenus pour la croissance intra-annuelle de la saison de croissance de 2011 ont démontré une différence significativement entre les sites (figure 3.6; tableau 3.4) et sont en accord avec les diverses théories émises en lien avec la diminution de la croissance intra-annuelle des arbres défoliés par la TBE (Blais, 1962; Morin & Krause, 1995; Rossi et al., 2008). La différence entre le nombre de cellules produites pour la saison de croissance 2011 du site témoin (54 cellules) et du site sévère (21 cellules) est assez importante. Le résultat du maximum de croissance atteint par les sites à l'étude se situe entre les jours d'échantillonnages 168 et 174 (Rossi et al. 2006) et concordent avec la diminution importante d'amidon contenu dans le bois (diminution à partir du jour 161 jusqu'à 196) (figure 3.5).

La croissance ainsi réduite pour les sites à niveau de défoliation moyen et sévère démontre d'une part que la croissance a été compromise par la défoliation et d'autre part, que les réserves d'amidon (surtout) ont été utilisées pour la synthèse d'autres composés employés ailleurs dans l'arbre. Selon la littérature, la défoliation abaisserait les réserves d'amidons dans les aiguilles comparativement aux arbres sains et ces réserves seraient d'avantages relocalisés dans les aiguilles plutôt que de servir directement à la croissance (Ericsson et al., 1980). Les arbres du site témoin ont présenté une augmentation de leur quantité d'amidon dans le bois (12 mg/g) , plus importante que celle des deux autres sites (4 mg/g). De plus, la littérature stipule qu'une hausse importante d'amidon au printemps est nécessaire d'une part à l'arrivée des bourgeons, mais aussi au début de la croissance du cambium dans le xylème (Little, 1970). Il est donc probable que la quantité moins importante d'amidon retrouvée dans le bois des arbres des sites défoliés aie grandement contribué à réduire la croissance de ces arbres lors de la saison de croissance.

Pour la quantité de SST dans le bois, selon Kozlowski et Pallardy (1997) , les insectes défoliateurs affecteraient directement les arbres en diminuant leur quantité de réserves de SST servant pour la croissance de l'arbre. Les résultats obtenus pour la quantité de SST dans le bois sont plus difficilement interprétables comparativement à ceux obtenus pour l'amidon dû à une importante variation dans les données. Le site à niveau de défoliation moyen ne démontre ni augmentation importante ni diminution. Pour leur part, le site témoin et le site sévère suivent un modèle similaire et démontrent, contrairement à la quantité d'amidon dans le bois, entre le jour d'échantillonnage 161 et 196 une augmentation des SST. Cette augmentation pour le site sévère va à l'encontre de la littérature qui mentionne plutôt une diminution des SST dans le bois. La quantité de sucres solubles totaux dans le bois tout comme celle dans les aiguilles, ont toute deux démontré une importante variance dans les résultats. Cette variance est due en partie par la variation continue des SST dans les aiguilles tout au long de la journée. Les sucres solubles totaux varient beaucoup plus dans les aiguilles

que l'amidon par exemple. De ce fait, plusieurs mesures auraient été nécessaires afin d'élaborer une moyenne plus représentative des SST dans les tissus étudiés.

3.4.8.2.2 Autres facteurs

La croissance peut varier selon plusieurs autres facteurs tout comme la production de composés de défense. Le stress hydrique peut être un facteur qui peut altérer significativement la croissance et diminuer l'entreposage de l'amidon dans les tissus concernés (Kozłowski & Pallardy, 1997). Dans la présente étude, les résultats du contenu relatif en eau (CRE) sont semblables pour les trois sites et n'est donc pas un facteur qui est considéré comme pouvant avoir un impact sur la croissance et les réserves d'amidon. La défoliation peut également entraîner un dérèglement du processus de la photosynthèse et ainsi affecter la composition normale des SST dans l'arbre (Honkanen, 1999).

3.4.8.2.3 Mesure de croissance des cernes

La diminution de la croissance étant bien marquée pour la saison de croissance 2011, il en est d'ailleurs ainsi pour les quatre années de croissance précédentes des sites défoliés (2007 à 2011). Les mesures prises sur les cernes précédents (figure 3.7) démontrent bien le déclin de la croissance en lien avec la défoliation des sites. Les sites sévère et moyen ont une diminution respectivement de -0.87 mm/année et de -0.81 mm/année et le site témoin augmente d'une année à l'autre (augmentation de 0.53 mm/année) sauf pour l'année 2010 où une diminution est observable. Ces résultats de diminution de croissance pour les sites attaqués par la TBE viennent corroborer la littérature à ce sujet (Blais, 1962; Morin & Krause, 1995).

3.4.9 Conclusion

Trois hypothèses supportaient l'objectif principal de l'étude et ont été confirmées en partie. Les hypothèses deux et trois mentionnaient respectivement que les réserves d'amidon et de sucres solubles totaux (SST) pour les sites affectés par la TBE seraient diminuées comparativement au site témoin et que la croissance suivrait également cette tendance. Ces hypothèses ont été confirmées, par contre, pour la quantité de SST de l'hypothèse deux, cette partie reste dans l'ombre et est difficilement interprétable dû à la grande variation pour les trois sites. La première hypothèse qui stipulait que les composés de défense se retrouveraient en plus grande quantité dans les aiguilles des arbres affectés par la TBE, c'est avérée pour sa part, être infirmée, car les composés de défenses étaient en plus grand nombre (analyse qualitative) chez le site témoin et en plus grande quantité (analyse quantitative) également que chez le site à niveau de défoliation sévère. Selon plusieurs études, les arbres affectés seraient en mesure de produire plus de composés de défenses, mais il semble que ces études ne mentionnent pas à partir de quelles années de défoliations ce mécanisme commence à moins bien fonctionner. D'ailleurs Kozlowski et al. (1997), souligne que les arbres non attaqués par une infestation et étant près de ceux touchés, produiraient d'avantages de composés de défenses que ceux affectés.

3.4.10 Références

- Ashworth, E. N., Stirm, V. E., & Volenec, J. J. (1993). Seasonal-variations in soluble sugars and starch within woody stems of *Cornus sericea* L. [Article]. *Tree Physiology*, 13(4), 379-388.
- Bartolomeo, D., & Cristos, X. (2005). Osmotic regulation in leaves and roots of olive trees during a water deficit and rewatering. *Tree Physiology*, 26(179-185).
- Bauce, E., Carisey, N., & Boulet, B. (2006). *Phénomène de résistance naturelle d'épinettes blanches à la tordeuse des bourgeons de l'épinette*.
- Bauce, E., Crepin, M., & Carisey, N. (1994). Spruce Budworm Growth, Development and Food Utilization on Young and Old Balsam Fir Trees. *Oecologia*, 97(4), 499-507.
- Blais, J. R. (1962). Collection and analysis of radial growth data from trees for evidence of past spruce budworm outbreaks. *Forestry Chronicle*, 38(474-484).
- Brooks, J. E., & Borden, J. H. (1987). Seasonal variation in foliar and bud monoterpenes in Sitka spruce. *Can. J. Bot.*, 65, 1249-1252.
- Carisey, N., & Bauce, E. (1997). Balsam fir foliar chemistry in middle and lower crowns and Spruce budworm growth, development, food and nitrogen utilization. *Journal of Chemical Ecology*, 23(8), 1963-1978.
- Deslauriers, A. (1999). *Mémoire de Maîtrise: Mise en place du cerne de croissance chez le sapin baumier (Abies balsamea (L.) Mill.) et relation avec le climat.*, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi.
- Deslauriers, A. (2003). *Thèse de Doctorat: Dynamique de la croissance radiale et influence météorologique quotidienne chez le sapin baumier (Abies balsamea (L.) MILL.) en forêt.* Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi.
- Ericsson, A., Larsson, S., & Tenow, O. (1980). Effects of early and late season defoliation on growth and carbohydrate dynamics in Scots pine. *J. Appl. Ecol.*, 17(747-769).
- Gionest, F. (1999). *Mémoire de maîtrise : Relations temporelles entre des données de défoliation par la tordeuse des bourgeons de l'épinette (Choristoneura fumiferana) et la croissance du sapin baumier (Abies balsamea).* Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi.
- Giovannelli, A. (2011). Sampling cambial region and mature xylem for non structural carbohydrates and starch analyses. *Dendrochronologia*, 29(177-182).

- Honkanen, T. (1999). Responses of *Pinus sylvestris* branches to stimulated herbory are modified by tree sink/source dynamics and by external resources. *Functionnal Ecology*, 13(126-140).
- Kobe, R. K. (1997). Carbohydrate allocation to storage as a basis of interspecific variation in sapling survivorship and growth. *OIKOS*, 80(226-233).
- Kozłowski, T., & Pallardy, S. (1997). Growth control in woody plants. In A. press (Eds.)
- Krause, C., & Morin, H. (1995). Changes in radial increment in stems and roots of balsam fir [*Abies balsamea* (L.) Mill.] after defoliation by spruce budworm. *The forestry chronicle* 71(No. 6).
- Lamontagne, M., & Bauce, E. (2002). Testing the ecophysiological basis for the control of monoterpene concentrations in thinned and unthinned balsam fir stands across different drainage classes. *Oecologia*, 130(15-24).
- Lamontagne, M., Bauce, E., & Margolis, H. A. (2002). Testing the ecophysiological basis for the control of monoterpene concentrations in thinned and unthinned balsam fir stands across different drainage classes. *Oecologia*, 130(1), 15-24.
- Lamontagne, M., Margolis, H., & Baune, E. (2000). Testing the ecophysiological basis for the control of monoterpene concentrations along canopy profiles in thinned and unthinned balsam fir stands. *Oecologia*, 124(3), 318-331.
- Little, C. H. A. (1970). Seasonal changes in carbohydrate and moisture content in needles of balsam fir (*Abies balsamea*). *Canadian Journal of Botany*, 48(2021-2028).
- Macleán, D. A., & Lidstone, R. G. (1982). Defoliation by spruce budworm: estimation by ocular and shoot-count methods and variability among branches, trees, and stand. *Can. J. For. Res.*, 12(582-594).
- Ministère Ressources naturelles et faunes, & Gouvernement du Québec. (2011). *Aires infestées par la tordeuse des bourgeons de l'épinette au Québec en 2011*.
- Morabito, D., Caruso, A., Carpin, S., Cédric Carli, Laurans, F., Depierreux, C., et al. (2006). Cambial activity of *Populus tremula* × *Populus alba* clone 717-1B4 in hydroponic culture. *Can. J. For. Res.*, 36(719-724).
- Morin, H., & Krause, C. (1995). Impact of spruce budworm defoliation on the number of latewood tracheids in balsam fir and black spruce. *Can. J. For. Res.*, 25(2029-2034).
- Phytochemical Society of Europe. (1991). *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids*: Oxford science publications, British.

- Potvin, C., & Lechowicz, M. J. (1990). The Statistical analysis of ecophysiological response curves obtained from experiments involving repeated measures. *Ecology*, 71(4), 1389-1400.
- Rossi, S., Anfodillo, T., & Menardi, R. (2006). Trephor: a new tool for sampling microcores from tree stems. *IAWA Journal*, 27(89-97).
- Rossi, S., Simard, S., Deslauriers, A., & Morin, H. (2008). Wood formation in *Abies balsamea* seedlings subjected to artificial defoliation. *Tree Physiology*, 29(29), 551-558.
- Simard, I., Morin, H., & Lavoie, C. (2006). A millennial-scale reconstruction of spruce budworm abundance in Saguenay, Québec, Canada. [Article]. *Holocene*, 16(1), 31-37.
- Simard, I., Morin, H., & Potelle, B. (2002). A new paleoecological approach to reconstruct long-term history of spruce budworm outbreaks. *Can. J. For. Res.*, 32, 428-438.
- Stuart Chapin III, F., Schulze, E.-D., & Mooney, H. A. (1990). The ecology and economics of storage in plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*(21), 423-447.
- Tuomi, J., & et al. (1988). Induced Accumulation of Foliage Phenols in Mountain Birch: Branch Response to Defoliation. *The American Naturalist*, 132(No. 4), 602-608.
- Wagner, M. R., & et al. (1985). Defoliation increases nutritional quality and allelochemicals of pine seedlings. *Oecologia*, 67(235-237).
- Willaume, M. (2011). Correlated responses of root growth and sugar concentrations to various defoliation treatments and rhythmic shoot growth in oak tree seedlings (*Quercus pubescens*). *Annals of Botany*, 107(653-662).

3.4.11 Liste des tableaux

Tableau 3.1 : Représentation des principales caractéristiques des sites d'échantillonnage

Tableau 3.2 : Représentation des valeurs de probabilité obtenues par analyse ANOVA qui ont démontré une différence significative ($p < 0,05$) entre les dates d'échantillonnages pour sucres solubles totaux et l'amidon dans les aiguilles. NS : non significatif

Tableau 3.3 : Représentation des valeurs de probabilité obtenues par analyse ANOVA qui a démontré une différence significative ($p < 0,05$) entre les dates d'échantillonnages pour les analyses de sucres solubles totaux et d'amidon dans le bois. NS : non significatif

Tableau 3.4 : Représentation des différentes valeurs obtenues par analyse Gauss-Newton pour la croissance interannuelle des arbres à l'étude pour les trois sites.

Tableau 3.5 : Représentation des molécules visibles sur le chromatogramme HS-GC retrouvées dans les échantillons d'aiguilles des trois sites à l'étude.

Tableau 3.1 :

Sites d'échantillonnage	Coordonnées géographiques	Altitude des sites	Classe de défoliation	DHP moyen des arbres	Hauteur moyenne des arbres
Témoin	48° 12' 43.5' N, 71° 14' 26.6' W	370 m	0	18,97cm	16,40m
Moyen	48° 16' 06.4' N, 71° 14'' 29.6' W	290 m	2 et 3	17,08cm	14,28m
Sévère	48° 16' 06.0' N, 71° 14'' 52.5' W	320 m	3 et 4	15,42cm	13,57m

Tableau 3.2 :

Jour Julien	Aiguilles Sucre	Aiguilles Amidon
	Valeur de P	Valeur de P
139	0,011	NS
154	<0,0001	0,0006
161	NS	0,0021
168	NS	0,0117
174	NS	<0,0001
181	<0,0001	<0,0001
196	0,003	<0,0001
210	0,0411	0,0012
231	0,0004	NS
259	0,0026	NS
287	0,0334	NS

Tableau 3.3 :

Jour Julien	Bois Analyse Sucre	Bois Analyse Amidon
	Valeur de P	Valeur de P
139	NS	NS
161	NS	NS
196	0,0214	NS
231	0,035	NS
259	NS	NS
287	NS	NS

Tableau 3.4 :

Site	A	β	$\kappa (10^{-2})$	r	β/κ	d (j)	F-value	P
Témoin	54,16	7,23	4,2	0,56	172,2	95	252,24	<0.0001
Moyen	34,33	5,14	3,07	0,26	167,3	130	337,77	<0.0001
Sévère	21,19	5,79	3,32	0,17	174,5	120	136,72	<0.0001
3 sites	36,75	6,08	3,55	0,33	171,3	112	311,85	<0.0001
Effet de la défoliation							36,67	<0.0001

Tableau 3.5 :

Numéro	Temps de rétention	Nom de la molécule	Type de terpènes
1	9,619	Tricylène	Monoterpène
2	10,236	α -pinène	Monoterpène
3	10,974	Camphène	Monoterpène
4	12,7	β -pinène	Monoterpène
5	13,648	β -myrcène	Monoterpène
6	14,298	α -phellandrène	Monoterpène
7	14,759	Δ -3-carène	Monoterpène
8	15,514	Para-cymène	Monoterpène
9	15,779	β -phellandrène	Monoterpène
10	19,673	Terpinolène	Monoterpène
11	20,722	Linalol	Alcool monoterpénique
12	21,502	Maltol	Acide
13	23,248	Camphre	Monoterpène
14	24,869	Bornéol	Monoterpène
15	26,867	(+)-myrtenal	Monoterpène
16	30,854	Piperitone	Cétone monoterpénique
17	31,514	Standard de Géraniol	Alcool monoterpénique
18	33,262	Acétate de Bornyl	Ester monoterpénique
19	33,928	Thymol	Phénol monoterpénique
20	36,91	α -longipinène	Sesquiterpène
21	40,303	(+)-longifolène	Sesquiterpène
22	41,328	β -caryophyllène	Sesquiterpène
23	45,554	α -humulène	Sesquiterpène
24	47,163	β -Bisabolène	Sesquiterpène

3.4.12 Liste des figures

Figure 3.1: En haut : Représentation des sites d'échantillonnage situés à environ 30km de Chicoutimi (Saguenay) (I. Simard et al., 2006). En bas : Les sites de à niveau de défoliation moyen ($48^{\circ} 16' 06.4''$ N, $71^{\circ} 14' 29.6''$ W) et sévère ($48^{\circ} 16' 06.0''$ N, $71^{\circ} 14' 52.5''$ W) sont situés à l'extérieur de la forêt Simoncouche.

Figure 3.2: Température (courbe) et la somme des précipitations journalières (histogramme) de la station météorologique de Bagotville (QC) pour la période de mai à octobre 2011. La station de Bagotville se retrouve à proximité des sites d'échantillonnages.

Figure 3.3: Dates d'échantillonnages des données pour les trois sites à niveau de défoliation différent (témoin, moyen et sévère).

Figure 3.4 : Courbes représentant le contenu relatif en eau (CRE) calculé pour chaque échantillon en provenance des trois sites à l'étude en fonction des jours juliens d'échantillonnages. Sur le graphique, les ronds noirs représentent les échantillons en provenance du site témoin, les ronds blancs, les échantillons du site à défoliation moyenne et les triangles noirs, représentent les échantillons en provenance du site à défoliation sévère. Les astérisques au-dessus de certain jour julien d'échantillonnage représentent les dates ayant démontrées après analyses statistiques (ANOVA, $p < 0,05$), une différence significative.

Figure 3.5 : Courbes représentant la quantité de sucres solubles totaux (SST) (haut) et d'amidon (bas) contenu dans les aiguilles (gauche) et dans le bois (droite) des sapins baumiers à l'étude, exprimée en mg/g selon les jours juliens et les catégories de défoliation. Sur les graphiques, les ronds noirs représentent les échantillons en provenance du site témoin, les ronds blancs, les échantillons du site à défoliation moyenne et les triangles noirs, représentent les échantillons en provenance du site à défoliation sévère. Les astérisques au-dessus de certain jour julien d'échantillonnage représentent les dates ayant démontrées après analyses statistiques (ANOVA, $p < 0,05$), une différence significative.

Figure 3.6: Mesure de la formation du cerne de croissance chez les arbres en provenance des sites à l'étude selon les jours juliens d'échantillonnages. Sur les graphiques, les ronds noirs représentent les échantillons en provenance du site témoin, les ronds blancs, les échantillons du site à défoliation moyenne et les triangles noirs, représentent les échantillons en provenance du site à défoliation sévère. Les lignes sur

le dernier graphique sont les courbes qui ont été estimées par la fonction de Gompertz pour chaque site.

Figure 3.7 : Mesure des cernes de croissance selon les cinq dernières années à partir de 2011 pour les trois sites d'échantillonnages. Sur le graphique, les ronds noirs représentent les échantillons en provenance du site témoin, les ronds blancs, les échantillons du site à défoliation moyenne et les triangles noirs, représentent les échantillons en provenance du site à défoliation sévère. L'astérisque au-dessus de l'année 2011 représente l'année ayant démontrée après analyses statistiques (ANOVA, $p < 0,05$), une différence significative comparativement aux autres.

Figure 3.8 : Exemple de chromatogramme HS-GC des composés retrouvés dans les échantillons d'aiguilles : (1) Tricyclène (2) α -pinène; (3) Camphène; (4) β -pinène; (5) β -myrcène; (6) δ -3-carène; (7) β -phellandrène; (8) Terpinolène; (9) Maltol; (10) Camphre; (11) Bornéol; (12)(+)-myrtenal; (13) Pipéritone; (14) Standard de Géraniol; (15) Acétate de bornyl; (16) (+)-longifolène; (17) α -longipinène; (18) β -caryophyllène; (19) α -humulène; (20) α -bisabolène.

Figure 3.9 : Histogramme à bande représentant la variance de la présence des composés dans les échantillons des trois sites à l'étude. Les différentes lettres (a,b,c) signifient une différence significative ($p < 0,05$) entre les sites.

Figure 3.10 : Courbes représentant les pourcentages de δ -3-carène pour les six arbres par sites d'études. La partie ombragée représente la période de défoliation élevée lors de la saison d'échantillonnage. Pour les trois sites à l'étude, le carré noir représente l'arbre 1, le cercle blanc l'arbre 2, le triangle noir et le triangle blanc l'arbre 3 et 4, puis le carré noir et le carré blanc représente dans l'ordre l'arbre 5 et 6 pour chaque site.

Figure 3.11 : Courbes représentant les pourcentages du β -phellandrène pour les six arbres par sites d'études. La partie ombragée représente la période de défoliation élevée lors de la saison d'échantillonnage. Pour les trois sites à l'étude, le carré noir représente l'arbre 1, le cercle blanc l'arbre 2, le triangle noir et le triangle blanc l'arbre 3 et 4, puis le carré noir et le carré blanc représente dans l'ordre l'arbre 5 et 6 pour chaque site.

Figure 3.1 :

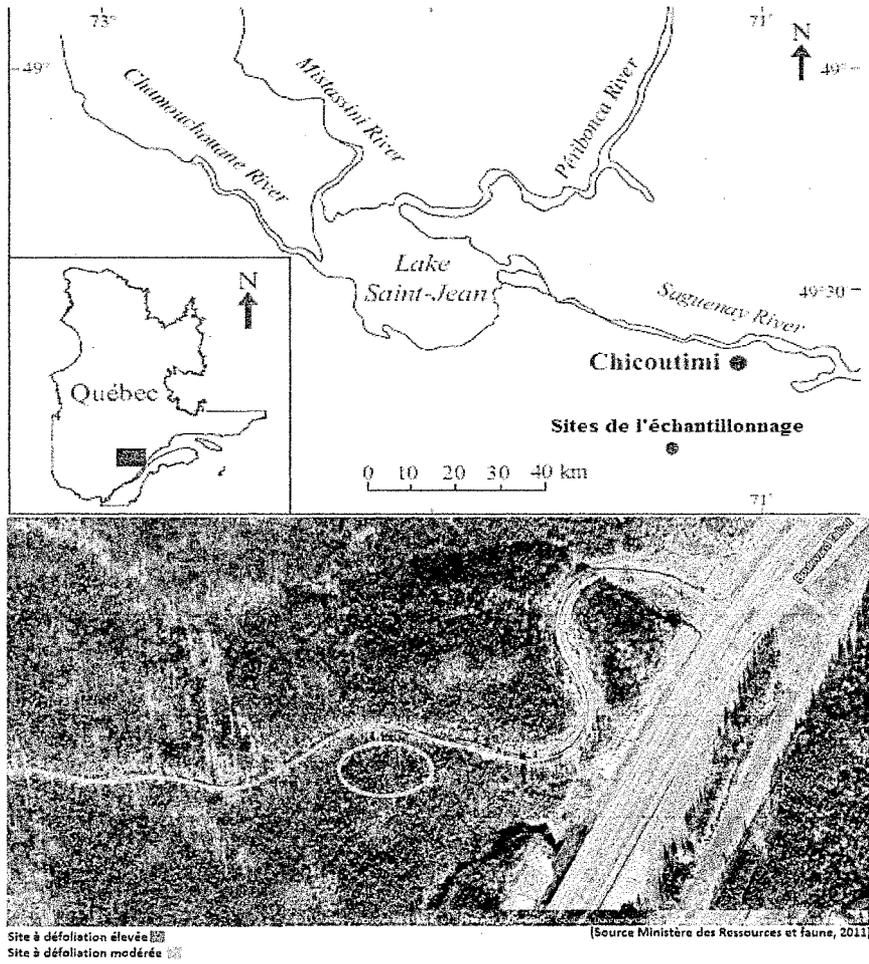


Figure 3.2 :

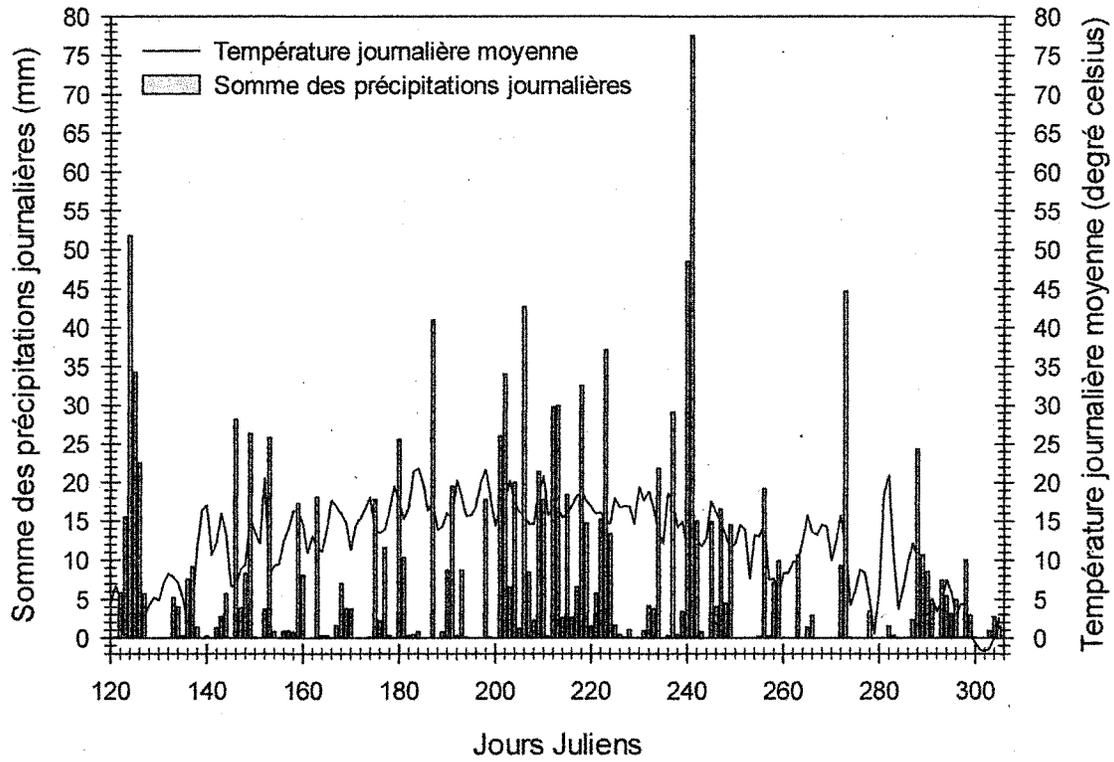


Figure 3.3 :

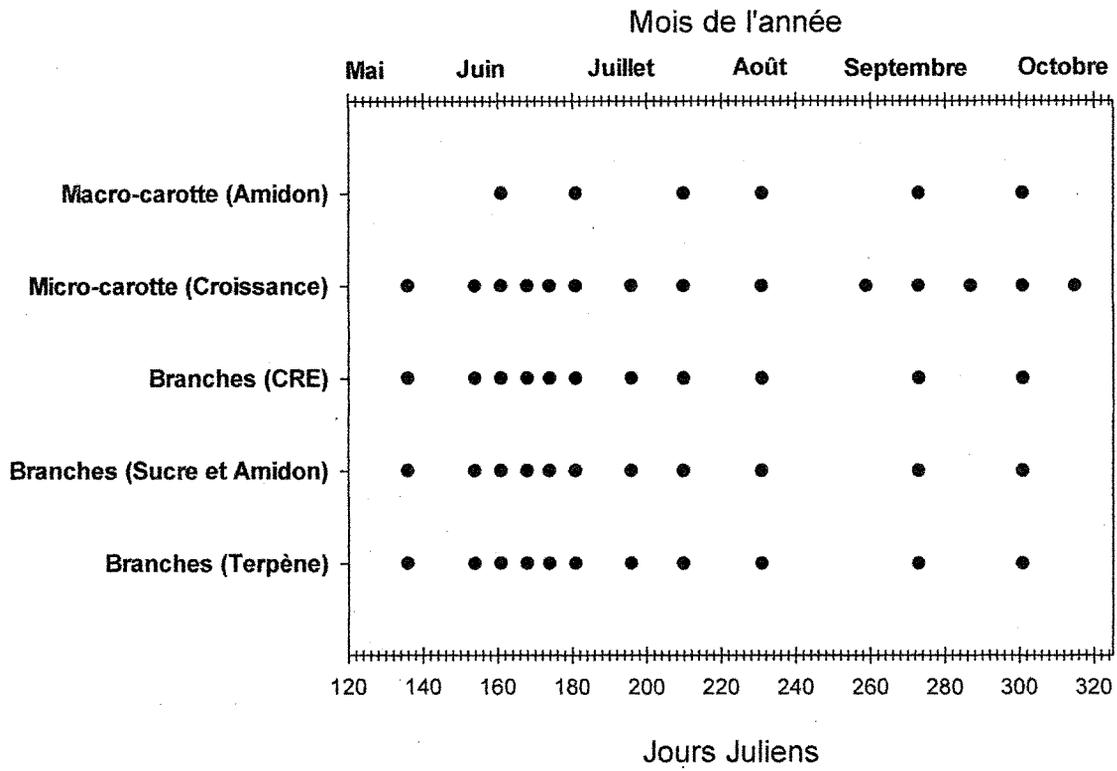


Figure 3.4 :

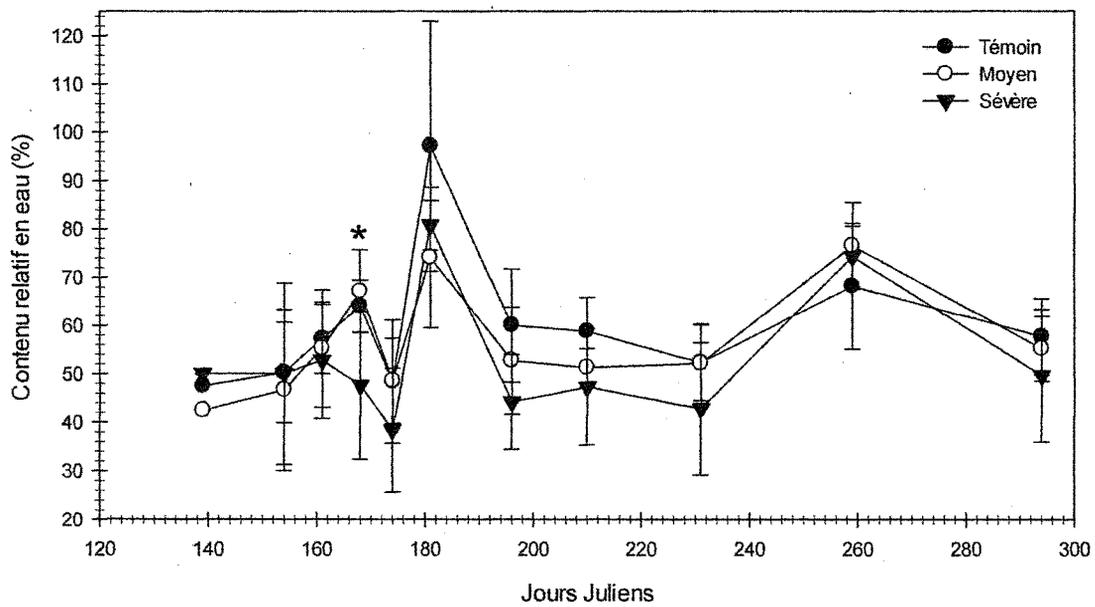
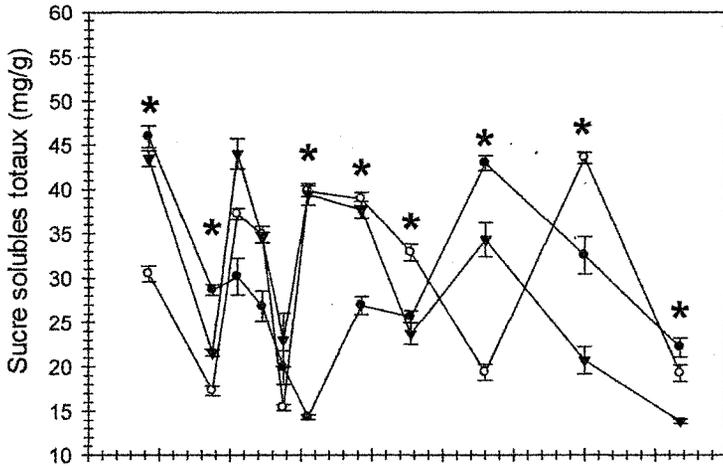


Figure 3.5 :

Aiguilles



Bois

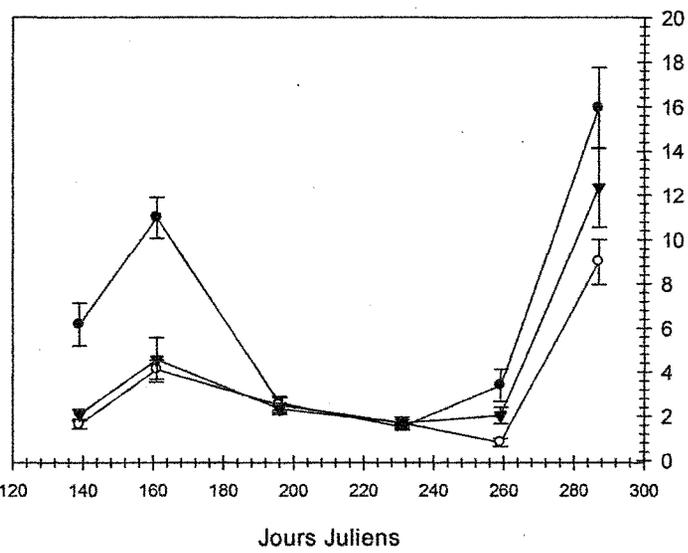
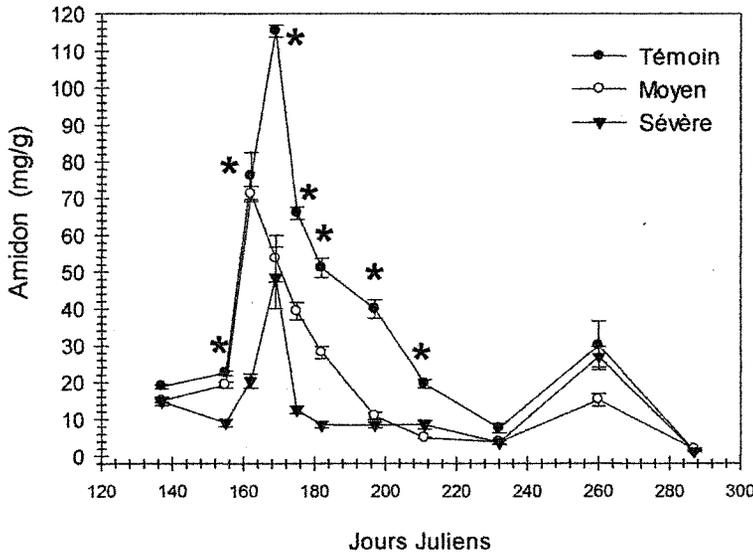
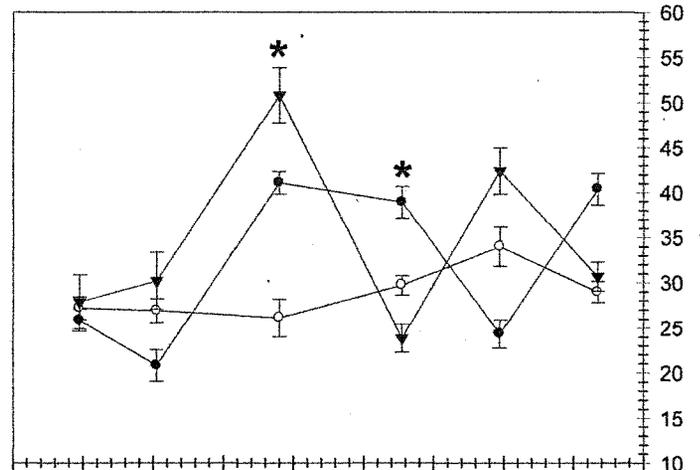


Figure 3.6 :

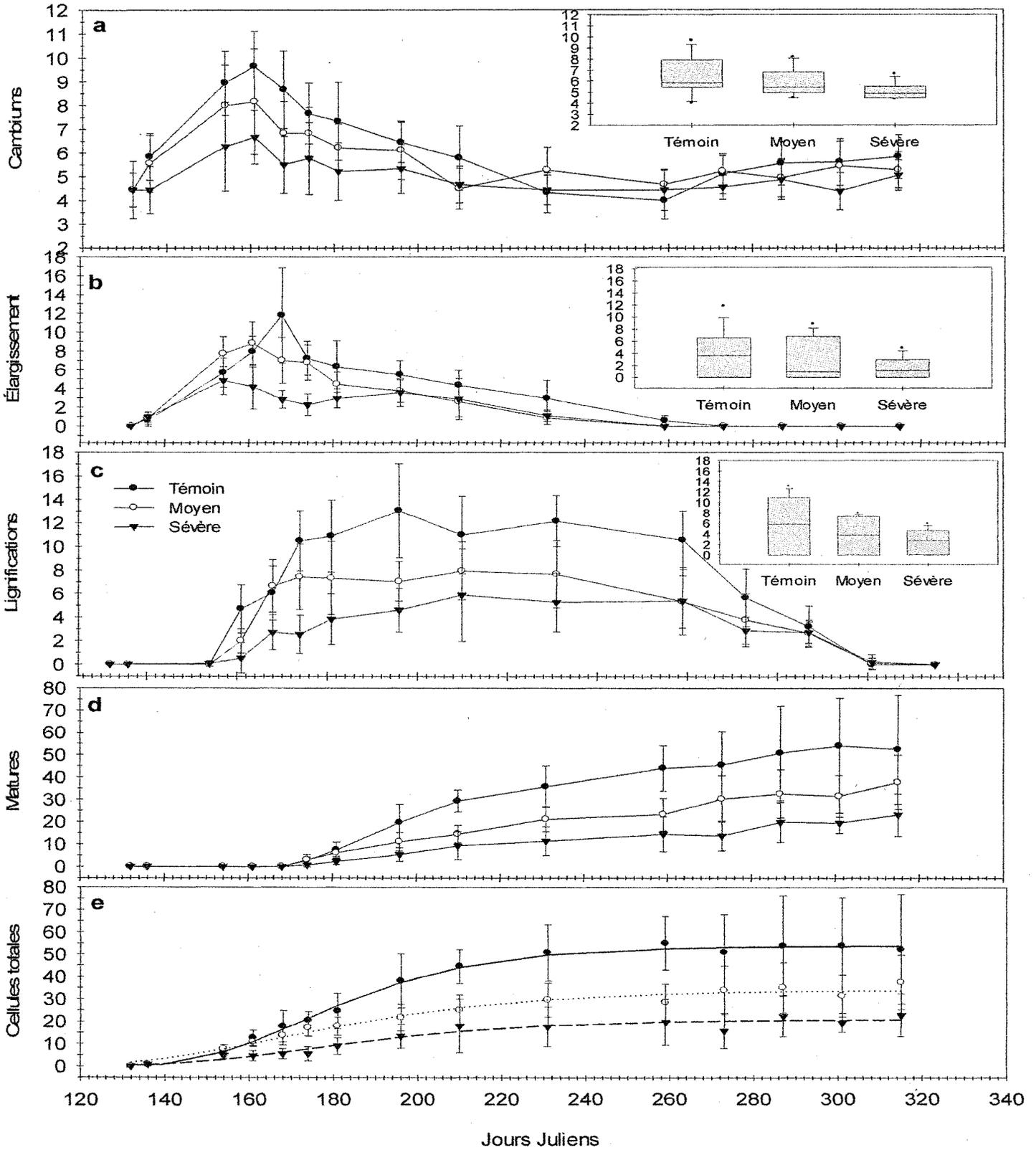


Figure 3.7 :

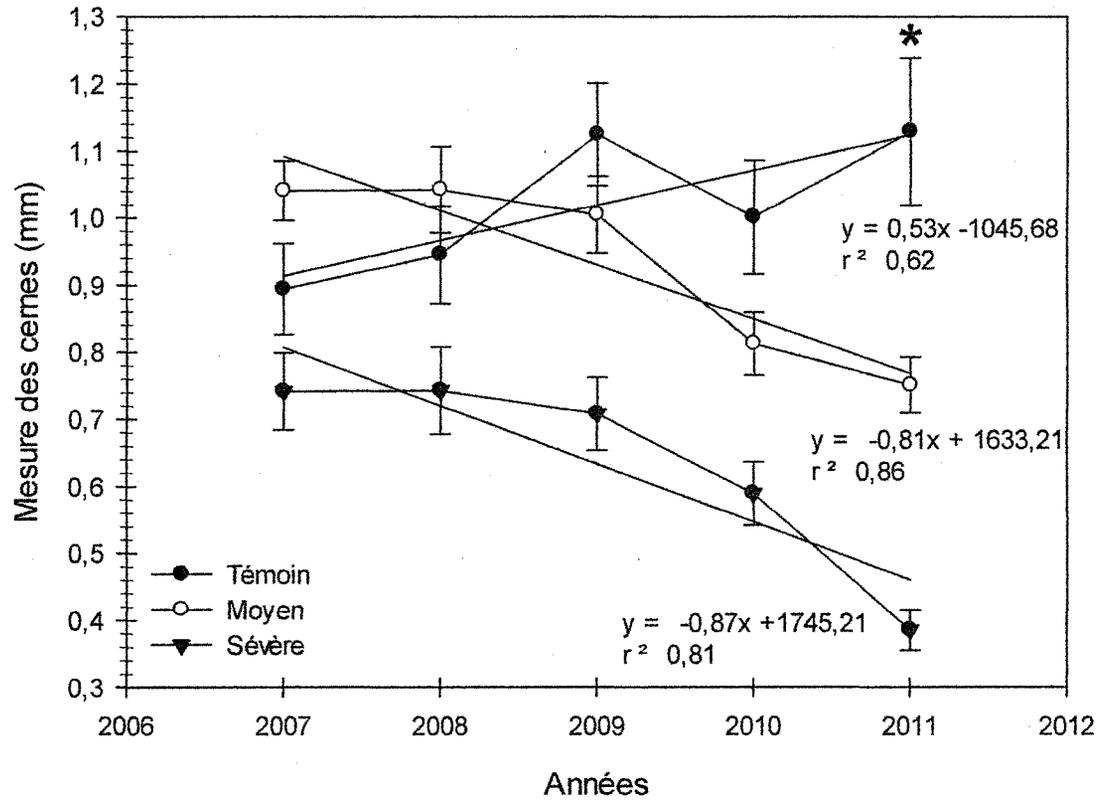


Figure 3.8 :

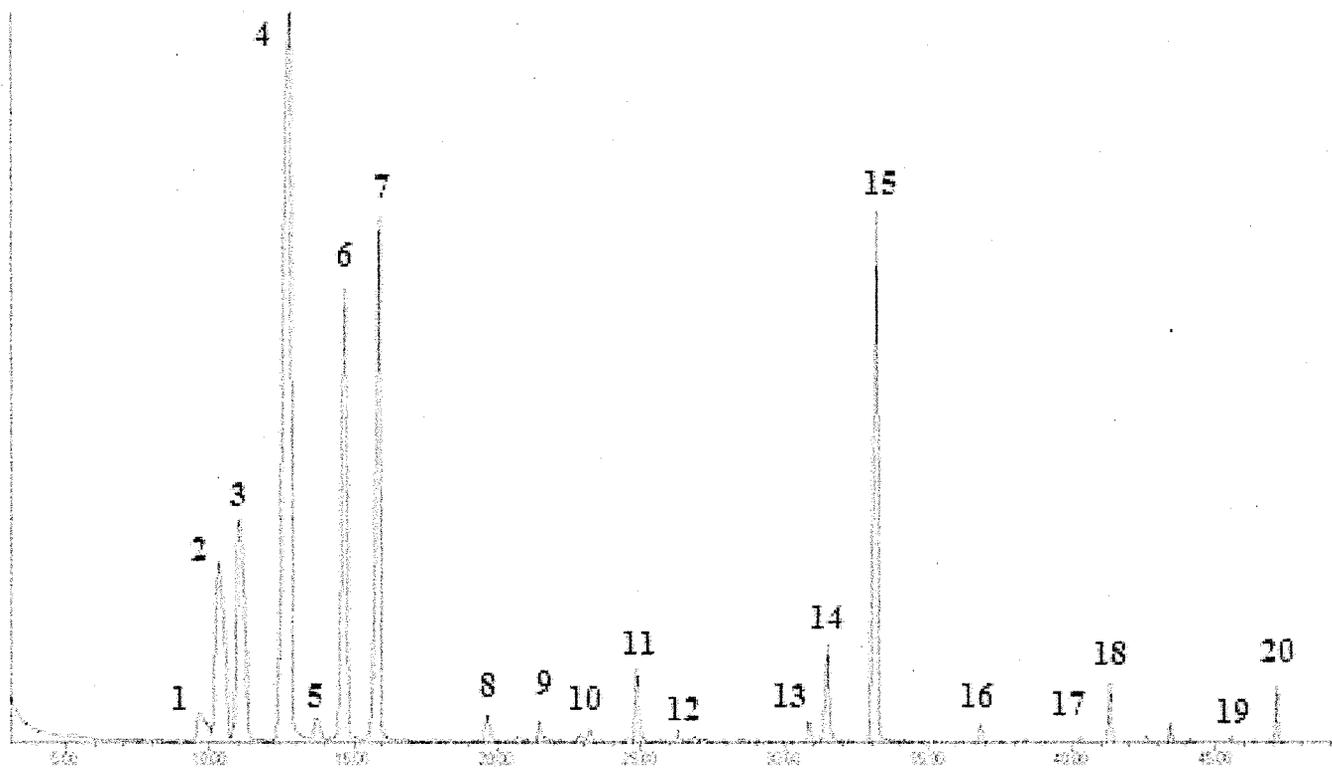


Figure 3.9 :

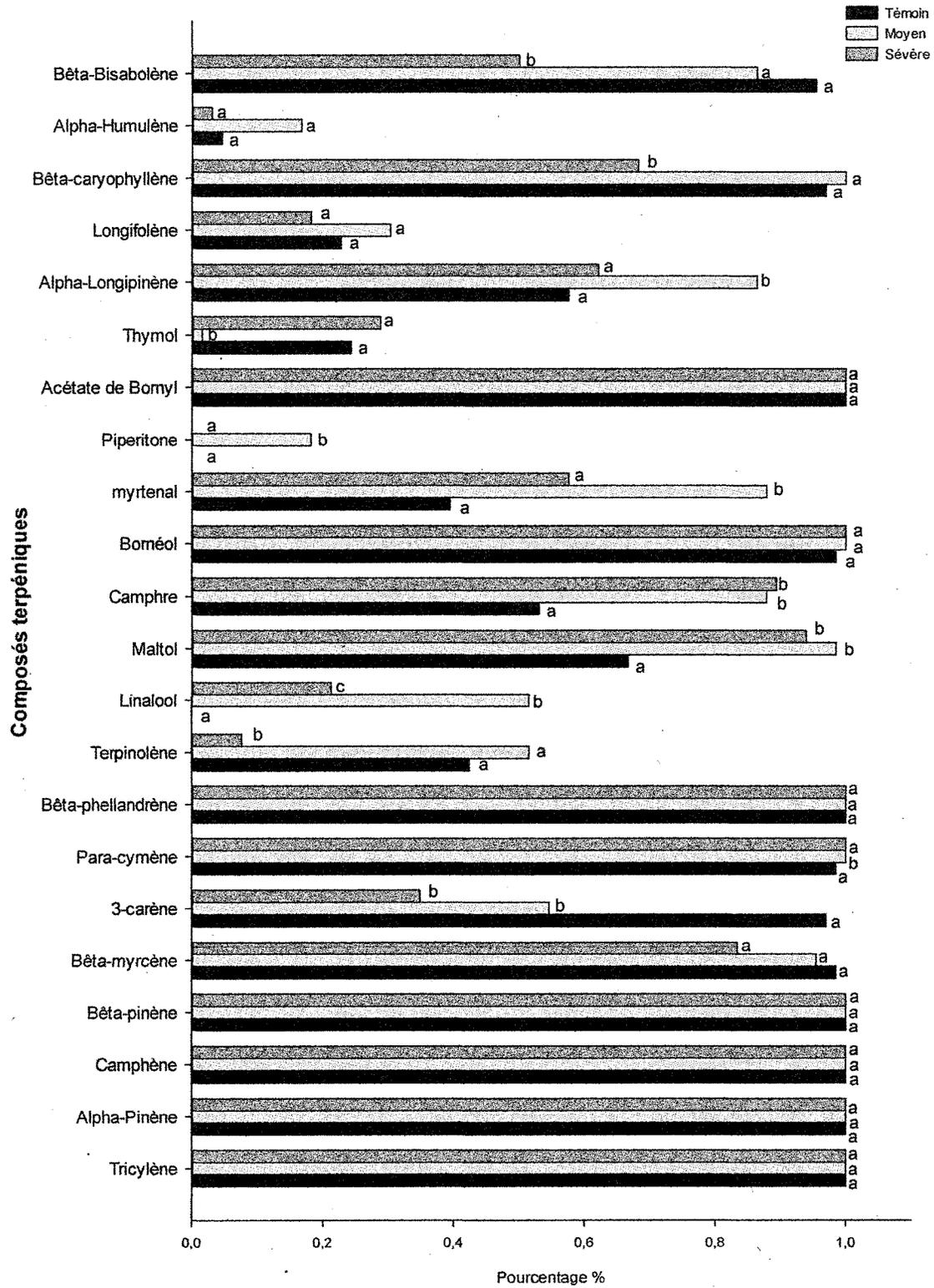


Figure 3.10 :

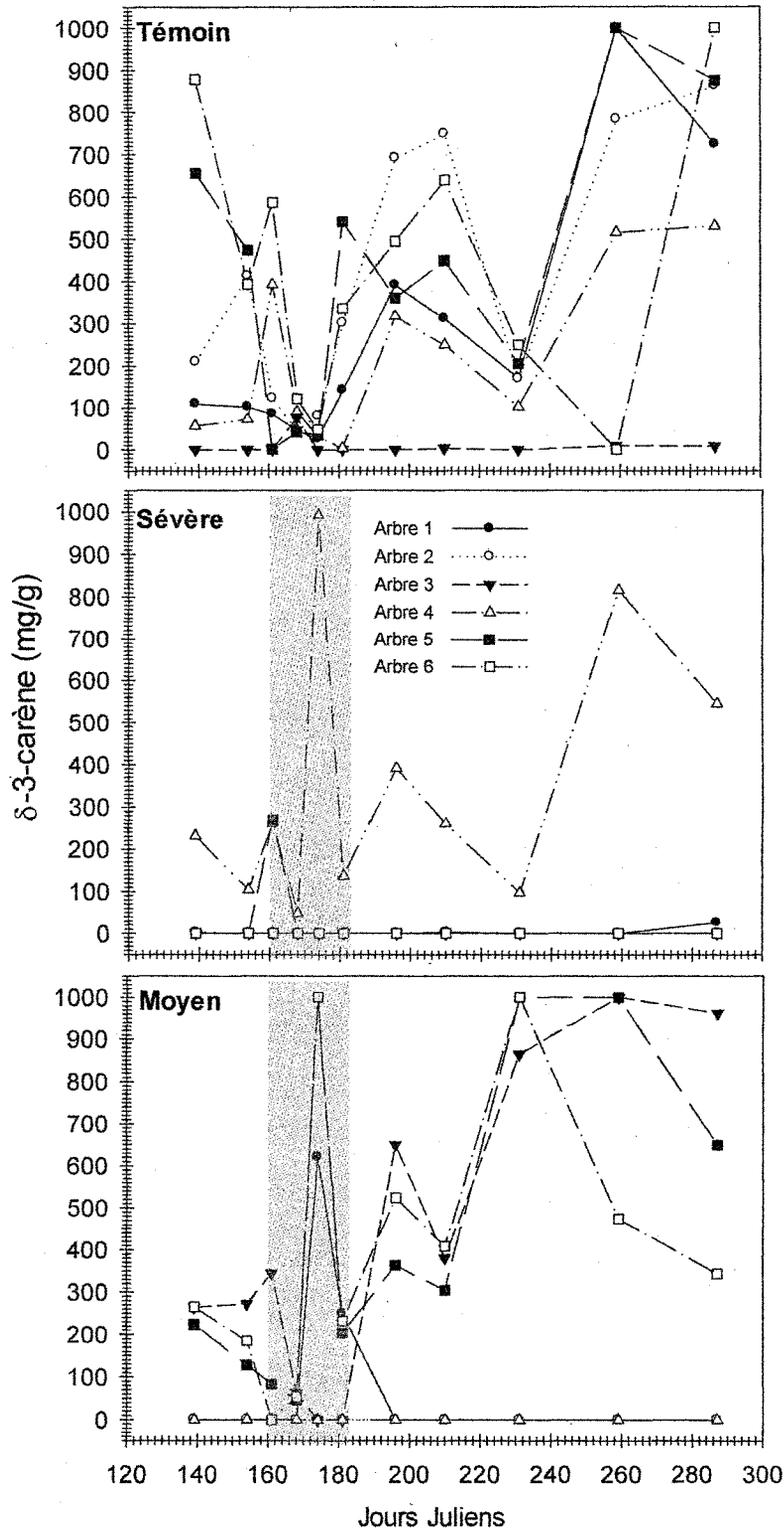
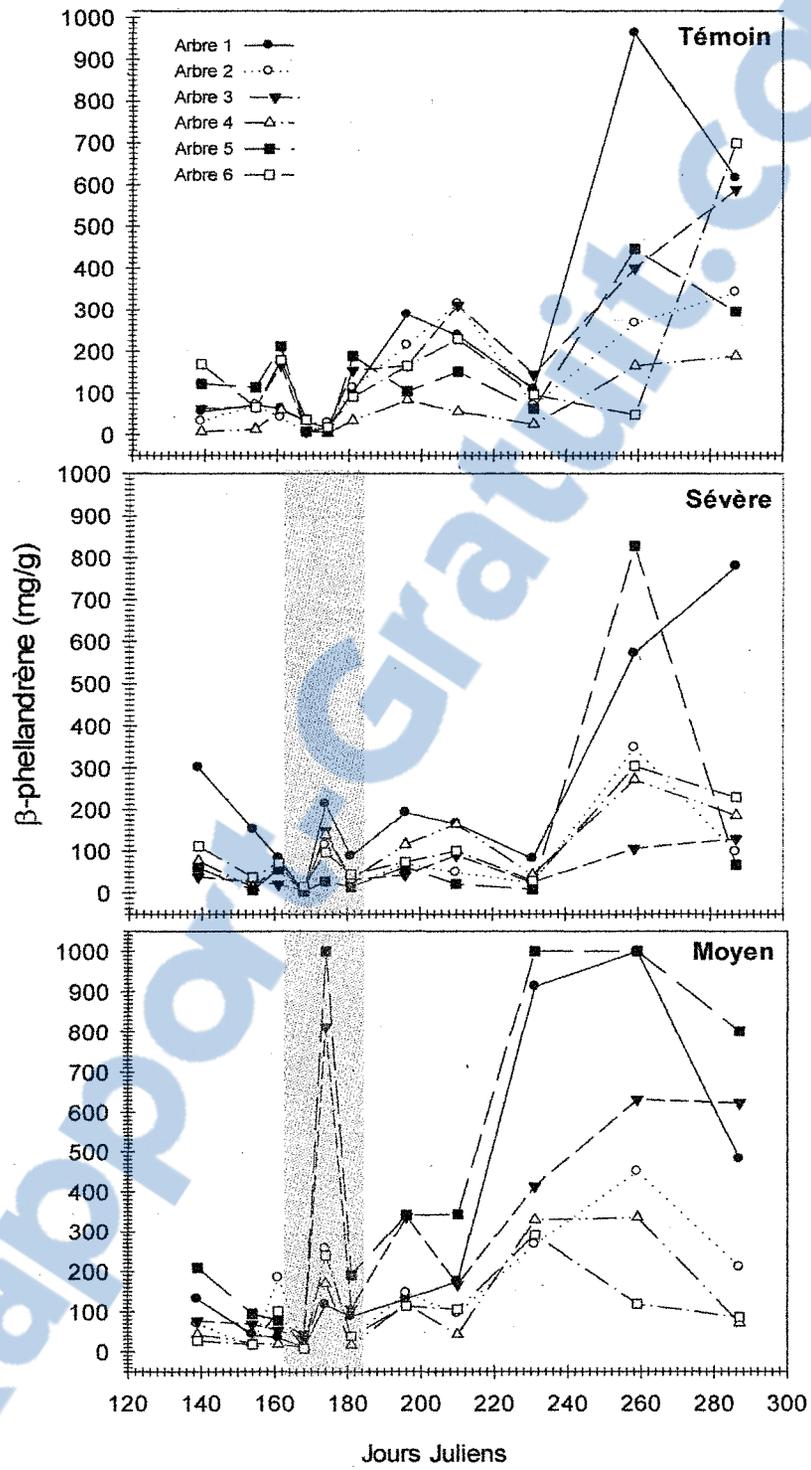


Figure 3.11 :



Chapitre IV

Conclusion générale

Ce projet de maîtrise a permis de fournir des informations sur l'effet d'une défoliation de quelques années, engendrée par la tordeuse des bourgeons de l'épinette, sur des sapins baumiers en milieu naturel. Il a été possible de voir qu'une défoliation importante atteint la plupart des mécanismes primaires de l'arbre. L'objectif principal de ce travail était d'effectuer l'analyse des constituants chimiques qui se retrouvaient principalement dans les aiguilles et le bois du sapin baumier en provenance d'individus semblables se situant dans trois sites ayant subi une défoliation d'intensité différente (témoin, moyenne et sévère). De plus, l'analyse des terpènes par HS-GC a permis l'élaboration d'une nouvelle méthode plus rapide afin d'analyser les composés de défenses volatiles contenus dans une grande quantité d'échantillons.

4.1 Lien entre les concepts et les résultats

Il est plutôt difficile d'émettre un lien spécifique avec les résultats obtenus dans cette étude. L'amidon et les SST peuvent intervenir dans plusieurs voies de biosynthèses (figure 4.1) et être davantage dirigés vers des sites plus importants que la croissance avant d'être utilisés pour la synthèse des composés de défense.

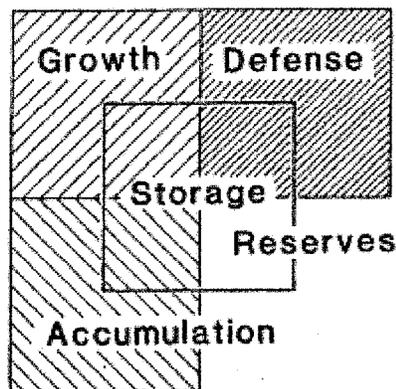


Figure 4.1: L'entreposage des ressources (Storage) telles que l'amidon ou les SST (Reserves) peuvent être mobilisés vers divers mécanismes utilisés par la plante (Defense, Growth) ou être entreposés (Accumulation) (Stuart Chapin III et al., 1990).

Dans le cas de cette étude, la défoliation affecte principalement le mécanisme de la photosynthèse, qui après plusieurs années de défoliations (2 à 4 ans), affecte tous les autres mécanismes (figure 4.2). La production d'amidon et de SST est ainsi touchée ce qui entraîne une diminution de la capacité des aiguilles à entreposer des réserves en vue du débourrement et de la croissance des nouveaux bourgeons.

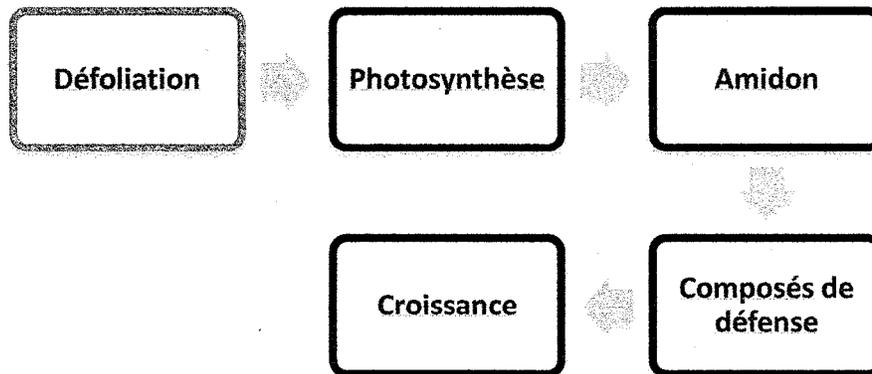


Figure 4.2 : Défaillance en ordre des différents mécanismes qui régissent les arbres suite à une défoliation sévère sur plusieurs années.

De plus, la capacité de production des composés spécifiques (δ -3-carène pour cette étude) pour la défense est également affectée par la défoliation. Selon certaine théorie (Gershenson & et al, 2000), l'arbre possède un bassin (pool de terpènes) présent continuellement qui agirait comme première barrière (comme les globules blancs pour les humains par exemple) et synthétiserait d'autres types de terpènes plus spécifiques pour sa défense lors d'infestations. Dans cette étude, le pool de terpènes n'a pas semblé varier d'un site à un autre.

Finalement, ayant épuisé les ressources en énergie pour la synthèse de tous ces composés, la croissance de l'arbre serait réduite en dernier recours (figure 4.2). Selon Stuart Chapin III et al. (1990), la croissance de l'arbre serait le mécanisme prioritaire de l'arbre, car année après année, les arbres s'assurent toujours d'emmagasiner assez de réserves pour la future croissance à venir et diminuerait les effectifs pour ce mécanisme en dernier lieu. Pour cette présente étude, il est donc possible de dire que les arbres subissant une importante défoliation cessent de produire adéquatement les composés utiles à leur maintien régulier. Entre le site moyen et le site sévère, il a été également possible d'observer des différences, ce qui suggère que plus la défoliation est intense et dure longtemps, plus l'arbre est affecté.

Pour de futures recherches, il serait intéressant de vérifier dès la première année de défoliation d'un arbre jusqu'à la dernière, quels mécanismes ou procédés l'arbre diminue-t-il en premier lieu (photosynthèse, quantité de nutriments, croissance, etc.) et également de suivre l'évolution de la remise sur pied de l'arbre, après une défoliation, sur quelques années.

4.2 Références

Gershenzon, J., & et al. (2000). Regulation of Monoterpene Accumulation in Leaves of Peppermint. *Plant Physiology*, 122(205-213).

Stuart Chapin III, F., Schulze, E.-D., & Mooney, H. A. (1990). The ecology and economics of storage in plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*(21), 423-447.