

Comparaison du profil terpénique de deux provenances de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.)

MOUTCHOU Saida (1) - BADJAH HADJ- AHMED Ahmed Yacine (2) - KHEMICI Mohamed (1) - AID Fatiha (3)

(1) - Institut National de la Recherche Forestière- B. P. 37 Chéraga, Alger, Algérie-

(2) - Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyse Physico-Chimique (CRAPC)
B.P. 248 El Alia. Bab Ezzouar Alger, Algérie

(3) - Physiologie Végétale/ LPBO, FSB- USTHB - B.P. 32 El Alia. Bab Ezzouar, Alger, Algérie

ملخص

تحتوي هذه الدراسة على تحليل و مقارنة المركبات التربينية الموجودة في زيوت قشرة الصنوبر الحلبي *Pinus halepensis* Mill. الذي أخذت عينته من موقعين في الجزائر. تم التعرف على المركبات باستعمال الجهاز المزدوج للكروماتوغرافيا الغازية مع مطيافية الكتلة بالقذف الإلكتروني. من بين المركبات التي تم إثبات وجودها، (*trans-caryophyllène* و *α-caryophyllène*). في العينة المأخوذة من بوشاوي نجد نسبة 65,3% و 12,36%، بينما يوجد في عينة برج بو عريريج 12,7% و 2%. من بين المكونات الأخرى، *pinane* بنسبة 48,1% في عينة برج بو عريريج و *benzaldehyde* بنسبة 2,55% في عينة بوشاوي. يلاحظ من جهة أخرى أن العديد من المركبات السسكيتربينية الأوكسجينية لم يتم التعرف عليها بينما يوجد العديد من المركبات الثقيلة و خاصة التربينات المزدوجة على مثال *cembrene* و *néocembrene A*.

Résumé

L'analyse comparée des composés terpéniques présents dans les essences corticales a été effectuée pour deux provenances algériennes de pin d'Alep : Bouchaoui et Bordj-Bou-Arréridj (BBA). L'identification des terpènes a été obtenue par couplage de la chromatographie en phase gazeuse (CG) et de la spectrométrie de masse (SM) en mode impact électronique.

Parmi les constituants ainsi identifiés, les sesquiterpènes prédominent et les deux provenances présentent une différence notable de teneur relative pour deux composés majoritaires de cette catégorie : le *trans caryophyllène* et l'*α caryophyllène*. Parmi les hydrocarbures terpéniques, le *pinane* est celui qui discrimine le mieux les deux provenances ; il représente 48.1% de la teneur totale chez BBA, alors qu'il est à l'état de trace chez Bouchaoui. Pour les monoterpènes oxygénés, le *benzaldehyde* est mieux représenté chez la première (2.55%) que chez la seconde (1.02%). Des composés lourds, en particulier des diterpènes comme le *cembrene* et le *néocembrene A*, ont été décelés à travers l'extrapolation des finger-prints obtenus par CG à ceux de la CG-SM.

Mots clés

Essence, écorce de pin, *Pinus halepensis* Mill., chromatographie gazeuse, spectrométrie de masse, impact électronique.

INTRODUCTION

Le genre *Pinus* est largement répandu sur le pourtour du bassin méditerranéen. Le pin d'Alep est une espèce couramment utilisée dans le reboisement, en raison de son adaptation à certains facteurs écologiques comme la faible pluviométrie et la forte teneur du sol en calcaire actif.

En Algérie, le pin d'Alep couvre une superficie de 863.858 hectares (DGF, 2002). Cette espèce joue un rôle écologique important par sa présence fréquente dans différents écosystèmes forestiers. Elle permet de repeupler les zones arides pour limiter le ruissellement et protéger les sols. Les sous-produits du pin d'Alep présentent un intérêt économique et sont utilisés dans les préparations pharmaceutiques. L' α -pinène contenu dans l'huile essentielle est employé dans la fabrication des sirops pour son pouvoir antitussif.

Dans l'industrie des peintures, l'essence de térébenthine extraite de la résine joue également un rôle important dans la fabrication des peintures, des vernis, et des désinfectants (TAZEROUTI, 1991). *Pinus halepensis* Mill., a fait l'objet de plusieurs monographies d'ordre écodendromorphologique (KADIK, 1986; YESSAD, 1988 MAIRE, 1922; MEDDOUR, 1993) montrant l'existence d'une variabilité morphologique fonction des zones géographiques.

Cependant, l'approche chimiotaxinomique par des marqueurs génétiques tels que les terpènes n'avait pas encore été utilisée en Algérie. Les terpènes, dans la plupart des

cas ont permis de déterminer l'origine phylétique d'une espèce donnée (Baradat, 1972 ; YANI, 1989; FADY, 1990; LOCKHART, 1990; SHILLER, 1990).

Ces marqueurs peuvent être également employés pour l'étude de la variabilité entre espèces (ADAMS, 2000; ROUSSIS, 2000). Le présent travail vise l'étude et la comparaison des profils terpéniques de deux provenances situées dans des régions écologiques contrastées.

MATERIEL ET METHODES

Matériel végétal

Les échantillons de tissus (écorce et liber) proviennent de deux forêts naturelles correspondant à deux zones géographiquement distinctes. La première est située dans l'étage bioclimatique sub-humide, à Bouchaoui (P1), à une altitude de 115 m, la seconde se trouve dans l'étage semi-aride à Bordj-Bou-Arréridj (P2), entre 1025 et 1089 m d'altitude.

Le prélèvement du matériel végétal a eu lieu en hiver 2002-2003 sur des rameaux latéraux de l'année, aoûtés, situés sur le tiers supérieur de l'arbre.

Préparation des échantillons de tissus

Les deux populations de pin d'Alep comportent des sujets adultes d'âges différents, mais suffisamment éloignés du stade juvénile pour que la teneur relative en terpènes ne soit pas influencée par l'âge (HANOVER, 1966a in FADY, 1990; YANI, 1989).

Chaque provenance a été représentée par un échantillon moyen issu d'un mélange en quantité égale de rameaux (un rameau/arbre) provenant de 30 individus différents. La récolte a été effectuée sur des arbres sains, ne présentant pas des coulées de résine ou de piqûres d'insectes.

Les rameaux excisés ont été placés dans des sacs en plastique hermétiquement clos et conservés au froid (+ 2°C).

Extraction

Après enlèvement des aiguilles, un anneau de tissus extérieurs au bois (écorce + liber) sur chaque rameau (poids égal) pour chaque individu a été prélevé. Tous les échantillons individuels ont ensuite été mélangés, coupés en fines lamelles et broyés dans un mortier avec l'azote liquide. De 10 à 15 g de chaque échantillon ont ensuite été macérés pendant trois heures dans 30 ml de pentane à 99%.

L'extrait obtenu a été desséché au sulfate de sodium anhydre (1 g).

Le filtrat contenait des carbures mono- et sesqui-terpéniques, des terpènes oxygénés, des lipides, des acides résiniques, et des pigments. Ces constituants pouvant interférer avec l'analyse en chromatographie phase gazeuse ou nuire à leur sensibilité, un pré-fractionnement a été ainsi réalisé.

Pré-fractionnement de l'essence totale

L'extrait a été fractionné sur gel de silice 60 (Merck 70-230 mesh, dans une colonne

chromatographique (Longueur = 15 cm, diamètre = 1 cm.).

L'élution par un mélange pentane éther diéthylénique (98:2), ayant un volume de 30 ml, avait permis l'isolement d'un éluat ou essence de couleur jaune. Pour éviter toute oxydation l'essence a ensuite été réduite à un faible volume (1 à 2 ml) sous azote.

Les échantillons ont ensuite été conservés dans des flacons au froid (- 4°C).

ANALYSE EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La séparation des terpènes a été réalisée à l'aide d'un chromatographe phase gaz de type HP 6890 Hewlett Packard muni d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne capillaire utilisée est apolaire : HP 5 MS (5% de diphényle, 95% de diméthylpolysiloxane), de 30 mètres de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,25µm d'épaisseur. Le gaz vecteur est l'azote (débit de 0.62 ml/mn).

Après une temporisation de 8 minutes, l'analyse chromatographique a été effectuée selon un gradient de température.

La température initiale est de 60°C ; elle augmente à un rythme de 2°/mn jusqu'à une température finale de 280°C. La température de l'injecteur est de 250°C et celle du détecteur a été définie à 280°C. Le volume injecté est de 1µl.

La surface des pics sur les chromatogrammes obtenus a été exprimée en

pourcentage de chaque constituant par rapport à l'essence totale (hydrocarbures mono-, sesqui- et diterpéniques), par intégration automatique.

COUPLAGE CHROMATOGRAPHIE PHASE GAZEUSE - SPECTROMETRIE DE MASSE

L'appareil utilisé est de type Hewlett Packard 6890 à détecteur MSD 5973, ayant une tension d'ionisation équivalente à 70 eV (I.E). La colonne utilisée est du type HP 5 MS de 30 mètres de longueur, 0,25mm de diamètre et 0,25 μ m d'épaisseur. Le débit du gaz vecteur (Hélium) est de 0.5 ml/mn, le volume injecté de 0.2 ml et la température de l'injecteur de 250°C.

Les constituants des essences ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention et de leurs spectres de masse à ceux de la littérature (NIST, Terpene Library of Finningan, MAT).

RESULTATS

Il est à remarquer que les essences des deux provenances présentent des quantités en monoterpénoides, sesquiterpénoides et en diterpénoides assez voisines.

La provenance P1 a moins de monoterpènes que la provenance P2. La fraction en monoterpènes oxygénés est sept fois plus grande en P1 qu'en P2. Les sesquiterpènes présentent un taux inférieur

dans la provenance Bouchaoui par rapport à la provenance de BBA (Tableau I).

Dans l'essence de Bouchaoui 51 composés ont été identifiés. Les composés majoritaires sont représentés par le trans-caryophyllène (65.3 %) et l' α -caryophyllène (12.36 %).

Les monoterpènes oxygénés sont largement présents mais à des taux très faibles sauf pour le benzaldehyde (2.55%).

L' α -pinène, terpène couramment présent dans l'essence de pin, n'apparaît pas dans la fraction monoterpénique de P1 (Tableau II). Par contre dans l'essence de BBA, 43 composés ont été identifiés. Les composés majoritaires sont le tricyclène (26.61%), le pinane (48.1%), le caryophyllène (12.7%) et le trans-caryophyllène (2%) (Tableau II). La famille des cadinènes est toujours présente dans les deux provenances. Cependant la quantité est moindre dans P2 que dans P1. Pour les sesquiterpènes oxygénés beaucoup d'entre eux n'ont pas été identifiés par manque de spectres de références dans la banque des données (NIST, Terpene Library of Finningan, MAT). Dans les deux provenances, le phényl ethyl isovalérate, l'humulène époxide II, le farnesol ainsi que les diterpénoides sont faiblement représentés (Tableau II).

Les proportions en ces deux diterpènes sont plus fortes dans les pins de Bouchaoui (0.5% et 2.3% respectivement) que dans les pins de BBA (0.01% et 0.22% respectivement).

Tableau I. Groupes de composés des essences de Bouchaoui (P1) et de Bordj-Bou-Arréridj (P2) exprimés en %.

Composés terpénoidiques	P1 (%)	P2 (%)
Monoterpénoides	45.82	41.52
Monoterpènes	15.86	26.23
Hydrocarbures	7.05	8.74
Monoterpènes oxygénés	22.91	6.55
Sesquiterpénoides	38.76	43.71
Sesquiterpènes	29.96	37.16
Hydrocarbures	3.52	4.37
Sesquiterènes oxygénés	5.28	2.18
Diterpénoides	5.28	8.74
Diterpènes	3.52	4.37
Diterpènes oxygénés	1.76	4.37

Tableau II. Indice de rétention (IR) et composition exprimée en % (CG) de l'écorce de l'essence des deux provenances Bouchaoui et Bordj-Bou-Arréridj.

	Composés	(P1)		(P2)	
		IR	%CG	IR	%CG
MONOTERPENOÏDES	Nonane	899	1	900	0.01
	Tricyclène	923	0.74	930	26.61
	α -Pinène	-	-	939	0.4
	Camphène	955	0.11	950	0.04
	Pinane	973	tr	979	48.1
	Sabinène	976	0.01	981	0.1
	β Pinène	982	0.12	985	0.02
	β Myrcène	991	0.1	989	1.72
	Decane	999	0.34	999	0.01
	α Phellandrène	-	-	1002	0.06
	δ -3 carène	1015	0.07	1015	1
	p- cymen	1024	0.02	1020	0.04
	β Phellandrène	-	-	1034	1.04
	β Ocimène	1039-	0.05	1048	0.13
	Ocimène allo	1125	0.03	1134	0.02
	α Terpinolène	1081	0.42	1089	0.42
	1.3.8	-	-	1104	0.11
	menthatriène			-	-
Dodecane	1199	0.1	-	-	

	Composés	(P1)		(P2)	
		IR	%CG	IR	%CG
MONOTERPENES OXYGENES	Benzaldehyde	967	2.55	961	1.02
	Linalool	1099	0.06	-	-
	Terpin-4-ol	1118	0.04	-	-
	Camphor	1143	0.01	-	-
	Menthone	1152	0.01	-	-
	Menthol	1159	0.1	-	-
	p-cymen-8-ol	1181	0.01	-	-
	α terpinéol	1190	0.02	-	-
	Citronellyl formate	1278	0.01	-	-
	Bornyl acétate	1292	0.01	1289	0.01
	Menthyl acétate	1297	0.13	-	-
	Geranyl formate	1303	0.03	1302	0.03
	Terpinyl acétate	1349	0.1	-	-
SESQUITERPENOIDES	δ Elémène	1337	0.1	1340	0.02
	α Cubébène	-	-	1353	0.01
	Cyclosativène	1367	0.24	1368	0.04
	α Copaène	1377	1.23	1379	0.16
	β Bourbonène/ β Elémène	1385	0.03	1388	0.02
	Tetradecane	1394	0.24	1396	0.01
	Caryophyllène	1438	65.3	1430	12.7
	β Gurjunène	1443	0.01	1434	0.02
	Aromadendrène/ α Guaiène	1449	0.12	1447	tr
				-	-
	α Caryophyllène	1465	12.36	1460	2
	β Farnésène	1468	0.01	-	-
	Caryophyllène 9	1470	0.15	1470	0.03
	épi	1473	0.24	1481	0.04
	γ Muurolène	1481	0.31	1486	0.07
	Germacrène D	1486	1.1	1491	0.04
	β Sélinène	1498	0.1	1499	0.01
	Pentadecane	1506	3	1505	0.2
	α Farnésène	1517	0.1	1513	0.02
	γ Cadinène	1527	1	1519	0.01
	δ Cadinène	1535	0.05	1528	0.07
	α Cadinène				

		Composés	(P1)		(P2)	
			IR	%CG	IR	%CG
SESQUITERPENOÏDES	SESQUITERPÈNES OXYGÈNES	Phényl ethyl isovalérate	1490	0.06	1495	0.26
		Humulène	1603	0.01	-	-
		epoxide II	1698	0.01	-	-
		Farnesol				
DITERPENOÏDES	DITERPÈNES	Cembrene	1937	0.5	1937	0.01
		Néo cembrene A	1959	2.3	1956	0.22
	DITERPÈNES OXYGÈNES	Farnesyl acétate	1833	0.08	-	-
		2 Phényl ethyl benzene acétique	1937	tr	1901	0.02
		Abiétol néo	-	-	2453	0.1

Trace (tr), concentration inférieure à 0.01%.

IR = Indice de rétention déterminé à partir de Trace (tr), concentration inférieure à 0.01%.

IR = Indice de rétention déterminé à partir de l'équation de Van den Dool et Kratz (1966).

DISCUSSION

Les études sur la composition terpénique en hydrocarbures dans les deux provenances de *Pinus halepensis* Mill. font apparaître des proportions assez voisines entre les monoterpénoïdes, sesquiterpénoïdes et diterpénoïdes. Les hydrocarbures monoterpéniques et sesquiterpènes ont des teneurs plus importantes au niveau de P2 que de P1. Les hydrocarbures majoritaires et communs sont représentés par le caryophyllène et l' α -caryophyllène.

Toutefois nous ne disposons pas de données portant sur la composition de l'huile essentielle du cortex pour pouvoir faire une comparaison. Des travaux établis sur plusieurs espèces de pin mentionnent la présence des sesquiterpènes en grande proportion au niveau des aiguilles de *Pinus halepensis* et *P. canariensis* (48,33% et 60,34% respectivement). Le caryophyllène et l' α -caryophyllène sont les composés majoritaires dans les aiguilles (Roussi, 1994).

Sur le plan chimiotaxonomique en se basant sur la composition en huile essentielle, il a été remarqué que le genre *Pinus* se divise en deux groupes (Chalchat et coll., 1994; Chalchat et Gorunovic, 1995). Le premier groupe contient les espèces riches en hydrocarbures mono terpéniques (α - et β -pinène, limonène, Δ -3 carène, β -caryophyllène et le germacrène D). Le deuxième groupe concerne les espèces riches en mono-terpenes oxygénés.

CONCLUSION

Ces résultats préliminaires montrent des différences de composition sur le plan qualitatif et quantitatif. Par ailleurs, cette étude nous a permis d'individualiser certains terpènes qui pourraient être considérés comme des marqueurs génétiques, c'est le cas du tricyclène, le pinane, le benzaldehyde, le trans-caryophyllène et l' α -caryophyllène.

L' α -pinène qui est un monoterpène très représenté dans l'huile essentielle, caractérise dans cette étude un chémotype pour la provenance la plus continentale. Il serait intéressant d'approfondir ce travail pour vérifier la valeur taxonomique des composés que nous avons caractérisé en considérant un échantillon de provenances représentatif de la variabilité du pin en Algérie.

ABSTRACT

The analysis of *Pinus halepensis* Mill. essential oil in cortical tissues was achieved using the coupling GLC-SM with an electronic impact mode. Among the identified components, sesquiterpenes

prevail, with a difference in quantity between the two sources. The major components are the trans-caryophyllene (65.3 %), a caryophyllene (12.36 %) and the Benzaldehyde (2.55%) for the bark of Bouchaoui. For Bordj-Bou-Arréridj, we found an amount of 26.61 % for the tricyclene, 48.1% for the pinane, 12.7 % for the trans caryophyllene and 2 % for the α caryophyllene. Much of oxygenated derivatives of sesquiterpenes were not identified. Many heavy compounds such as the diterpenes have been detected but only the cembrene and the neocembre A, have been identified through an extrapolation of the finger-prints obtained by GLC with that of GLC-SM.

REMERCIEMENTS

Cette recherche a été financée dans le cadre des PNR1 (MERS) (code projet 15097 EXIRFM). Nous exprimons nos vifs remerciements à Mrs. Harfouche A et Kolai L, chercheurs à l'INRF. Bainem, pour leurs conseils et suggestions. Nous remercions également le personnel technique de la circonscription des forêts de Bouchaoui, Bordj Bou-Arreridj de l'INRF ainsi que celui du laboratoire du CRAPC/USTHB. Bab Ezzouar pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

REFERENCES

Adams R. P, 2000. Systematics of smooth leaf margin of the western hemisphere based on leaf essential oils and RAPD-DNA "fingerprinting". *Biochemical Systematic and Ecology*, 28, 149-162.

- Baradat P., Bernard-Dagan C., Marpeau A. et Pauly J., 1972. Les terpènes du Pin maritime: aspects biologiques et génétiques. I : variabilité de la composition monoterpénique dans un individu, entre individu et entre provenances. Ann. Sci. Forest., 29(3), 307-334.
- Chalchat J. C., Garry R.P. and Gorunovic M.S. 1994. Chemotaxonomy of Pines native to the Balkans: Composition of the essential oil of *Pinus Heldreichii* Christ. Pharmazie 49, 852-854.
- Chalchat J. C. et Gorunovic M.S. 1995. Chemotaxonomy of pines native to the Balkans (IV): Variations in the composition of essential oils of *Pinus omorika* Pancic according to plant part and age of specimens. Pharmazie 50, 640-641.
- Document interne: Le patrimoine forestier en Algérie. Direction Générale des Forêts, 2002. Ministère de l'Agriculture et du développement rural
- Fady B, 1990. Variabilité génétique du sapin de Grèce. Thèse de Doctorat es sciences. Université de Bordeaux I.115 p.
- Kadik B, 1988. Contribution à l'étude de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Ecologie-dendrométrie-morphologie. O.P.U. 581p
- Maire R, 1926. Carte phytogéographique de l'Algérie et de la Tunisie. Alger, Baconnier, 78.
- Meddour H, 1992. Contribution à l'étude dendrochronologique de deux provenances de pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) en Algérie. Cas d'une station littorale et d'une autre continentale. Thèse de magister en sciences agronomiques. INA. Alger.
- Nahal I, 1962. Le pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.). Etude chimiotaxonomique, phytogéographique, écologique et sylvicole. Extr. Annal. Etude nationale Eaux et forêts. Nancy 19, n4, pp 1-207, 1962.
- Lockhart L.A, 1990. Chemotaxonomic relationships within the central American closed-cones pines. *Silvae Genetica*.V 39 (5-6)p. 173-184.
- Roussis V, Petrakis P, Ortiz A, Mazomenos B.E, 1994. Volatile constituents of needles of five *Pinus* species grown in Greece. *Phytochemistry*, Vol.39, N°. 2 pp, 361
- Roussis V, Tsoukatou M, Petrakis P, Chinou I, Skoula M, Harborne J, 2000. Volatile constituents of four *Helychrysum* species growing in Greece. *Biochemical Systematics and Ecology* 28 163-175.
- Schiller G, 1990. Variation in resin composition of Italian cypers (*Cupressus sempervirens* L.) grown in Israel. *Silvae Genetica*. V 39 (3-4)p. 89-96
- Tazerouti F, 1991. Etude d'huile essentielle de pin d'Alep de différentes régions d'Algérie. Thèse de magister en chimie organique. USTHB. 154 p.
- Van Den Dool H et Kratz P. D, 1966. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 11, 463-466.
- Yani A, 1989. Les terpènes du Cyprès : Etude physiologique lors d'un stress hydrique et utilisation en chimiotaxonomie. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences. Université de Bordeaux. 101 p.
- Yessad s-a., 1988. Contribution à l'étude écodendrométrique de *Pinus halepensis* Mill. dans la zone sub-humide littorale centre. Cas de la forêt de Taourira-Cherchell. Thèse de magister. INA.