

(Manuscrit reçu le 24 juin 2009, accepté le 25 juillet 2009)

COMPOSITION CHIMIQUE DES HUILES ESSENTIELLES DE LA SCIURE DE BOIS ET DE FEUILLES DE *TETRACLINIS ARTICULATA* (VAHL) MASTERS DU MAROC

BOURKHISS M'barek ¹, HNACH Mohamed ¹, PAOLINI Julien ², COSTA Jean ²

et CHAOUCH Abdelaziz ³

¹ Département de chimie, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail BP 4010 Béni M'hamed, 50000 Meknès, Maroc.

² CNRS UMR 6134 - Laboratoire de Chimie des Produits Naturels - Université de Corse – BP 52 – 20250 Corte, France.

³ Laboratoire de biotechnologie microbienne, Département de biologie, UFR Amélioration et transformation microbienne et végétale, Faculté des sciences, Université Ibn Tofail, 14000 Kénitra, BP 133, Maroc.

Résumé

Dans le but de contribuer à la valorisation de la flore marocaine en vue d'identifier de nouvelles substances potentiellement intéressantes sur les plans biologique et thérapeutique, nous avons procédé à l'étude des huiles essentielles de la sciure de bois et de feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters originaire de la région de Khemisset (Plateau Central marocain).

L'étude par CPG et CPG/SM de l'huile essentielle de sciure a permis d'identifier 22 constituants dont les cinq majoritaires sont : l' α -acorénol (20.9 %), le cédrol (17.9 %), le totarol (8.8 %), l' α -cédrene (8.7 %) et le β -acorénol (7,4 %). Dans l'huile essentielle de feuilles, nous avons rapporté la présence de 28 composés représentant 94% de la composition chimique totale avec l'acétate de bornyle (30.6 %), le camphre (18.6 %), l' α -pinène (16.8 %) et le limonène (5.7 %) comme constituants principaux.

L'huile essentielle de sciure a été fractionnée sur colonne ouverte de silice en utilisant un éluant de polarité croissante. Ainsi, cinq fractions ont été recueillies, représentant respectivement 8.6 %, 13.9 %, 13.9 %, 37.2 % et 26.4 % de la masse d'huile essentielle totale. La fraction (FH) éluée avec le pentane est constituée d'hydrocarbures sesquiterpéniques alors que les quatre fractions oxygénées (FO1 à FO4) éluées avec un mélange diéthoxyde/pentane de polarité croissante sont dominées par les alcools terpéniques : le totarol dans la fraction FO1 (42.4 %), l' α -acorénol dans la fraction FO2 (34.9 %) et FO3 (54.0 %) et le cédrol dans la fraction FO4 (58.2 %). Le fractionnement de l'huile essentielle nous a permis de concentrer les constituants susceptibles d'être valorisés pour leurs propriétés biologiques et organoleptiques.

Mots-clés : *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, huiles essentielles, cédrol, α -acorénol, totarol, CC, GPG, GPG-SM

Abstract

In order to contribute to the enhancement of the Moroccan flora to discover potentially new insights into the biological and therapy, we conducted the study of essential oils of sawdust and leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters originating from the region of Khemisset (Morocco).

The study by GC and GC / MS of sawdust essential oil allowed identification of 22 constituents whose five majority are: α -acorérol (20.9 %), cédrool (17.9 %), totarol (8.8 %), α -cédrene (8.7 %) and β -acorérol (7.4 %). In the essential oil of leaves, we have reported the presence of 28 compounds representing 94% of the total chemical composition with bornyl acetate (30.6 %), camphor (18.6 %), α -pinene (16.8 %) and limonene (5.7 %) as major constituents.

The sawdust essential oil was fractionated on silica column using an eluent of increasing polarity. Thus, five fractions were collected, representing 8.6 %, 13.9 %, 13.9 %, 37.2 % and 26.4 % of the total essential oil. The hydrocarbon fraction (FH) eluted with pentane consists of sesquiterpenes hydrocarbons while the four oxygenate fractions (FO1 to FO4) eluted with a mixture diethyloxyde/pentane increasing polarity are dominated by terpene alcohols : the totarol in FO1 (42.4 %), the α -acorérol in FO2 (34.9 %) and FO3 (54.0 %) and cédrool in FO4 (58.2%). The fractionation of the oil has allowed us to concentrate constituents likely to be valued for their biological and organoleptic properties.

Keywords : *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, essential oils, cédrool, α -acorérol, totarol, CC, GPG, GPG-SM

1. Introduction

Tetraclinis articulata (Vahl) Masters, communément appelé Thuya de Berberie, est endémique de la Méditerranée Sud occidentale. En dehors de son aire Nord-africaine, on ne rencontre que deux stations limitées, l'une dans la province de Carthagène en Espagne et l'autre à Malte [1]. Cet arbre constitue un élément important de la végétation magrébine (Maroc, Algérie et Tunisie) puisqu'il couvre plus d'un million d'hectares [2]. Au Maroc, sa superficie actuelle est estimée à 560 670 ha [3], soit plus de la moitié de la réserve forestière mondiale.

Le Thuya de Berberie est réputé dans la médecine traditionnelle marocaine. Il est principalement utilisé contre les infections intestinales et respiratoires, le diabète et l'hypertension [4].

Dans le but de contribuer à une meilleure valorisation de cette essence en vue d'identifier de nouvelles substances potentiellement intéressantes tant au plan biologique que thérapeutique, nous nous proposons dans ce travail de caractériser la composition chimique des huiles essentielles de la sciure de bois et de feuilles de *Tetraclinis articulata* du plateau central marocain.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel végétal

Les échantillons de Thuya ont été prélevés dans la région de Khemisset. La récolte a été effectuée de façon aléatoire en Mars 2007. Les échantillons de bois ont été transformés en sciure à l'aide d'une raboteuse.

2.2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle de la sciure de bois et de feuilles a été réalisée par hydrodistillation dans un appareil de type Clevenger. La distillation dure trois heures après récupération de la première goutte de distillat. L'huile essentielle est séchée avec du sulfate de sodium anhydre et stockée à 4 °C dans l'obscurité. Les rendements sont exprimés par rapport à la matière sèche (en ml/100 g de matière sèche). Le pourcentage de matière sèche est estimé par séchage de 5 g de chaque échantillon 4 heures à l'étuve à 102 °C. Le rendement moyen en huile essentielle de sciure et de feuilles, calculé à partir de la matière végétale sèche, est de 1,63 % et de 0,22 % respectivement.

2.3. Chromatographie sur colonne de silice

Un fractionnement de l'huile essentielle de sciure de bois a été effectué par Chromatographie sur Colonne de silice (CC) en utilisant comme phase stationnaire de la silice de forte granulométrie, ICN 200-500 µm, 60A et comme éluant un gradient de pentane/oxyde de diéthyle de polarité croissante. Ainsi, nous avons recueilli une fraction hydrocarbonée (FH) et quatre fractions oxygénées (FO1, FO2, FO3 et FO 4). Le fractionnement est schématisé sur la Figure 1.

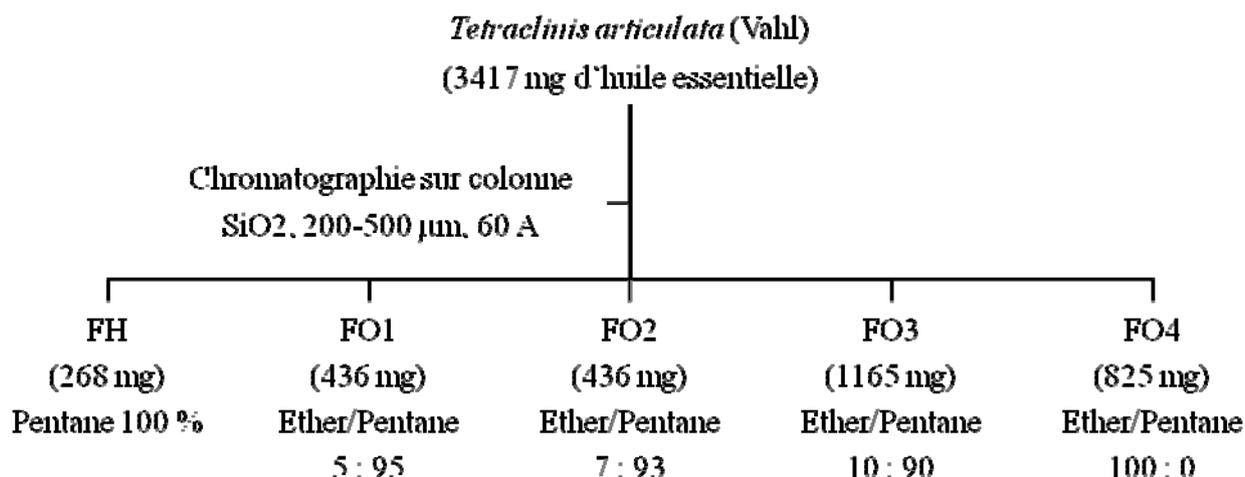


Figure 1: Schéma de fractionnement de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters

2.4. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG)

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem GC, équipé de deux détecteurs à ionisation de flamme (FID) permettant la détection des composés, d'un injecteur diviseur et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 µm) respectivement polaire (Rtx-Wax, polyéthylène glycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthyl-siloxane). Le gaz vecteur est l'hélium (1 ml/mn) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250 °C et celle du détecteur de 280 °C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à

230°C, à 2 °C/mn, puis en un palier de 45 mn à 230 °C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/50. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2 µl. Pour les analyses MEPS, un liner de 0,75 mm d.i. est utilisé et l'injection se fait en mode splitless. Pour chacun des composés, les indices de rétention polaires et apolaires sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme d'étalon d'alcane de C₅ à C₃₀.

2.5. Couplage CPG/Spectrométrie de Masse (SM)

Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22 mm d.i. ; épaisseur du film : 0,25 µm) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Le gaz vecteur est l'hélium (1 ml/mn) avec une pression en tête de colonne de 25 psi. La température de l'injecteur est de 250 °C. La programmation de la température consiste en une élévation de 60 à 230 °C, à 2° C/mn, puis en un palier de 35 mn à 230 °C. L'injection se fait par mode split avec un rapport de division de 1/80. La quantité d'huile essentielle injectée est de 0,2 µl. La détection se fait par un analyseur à filtre quadripolaire. Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70 eV. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da. La température de la source est de 150 °C.

2.6. Identification et quantification des constituants des huiles essentielles

La méthodologie du laboratoire est basée sur l'utilisation conjointe (i) de la CPG associée à la détection par ionisation de flamme (FID) permettant le calcul des indices de rétention sur colonne polaire et sur colonne apolaire ainsi que la quantification des composés (les indices de rétention I_r sont déterminés par rapport aux indices de rétention d'une gamme étalon d'alcane C₅-C₃₀, par interpolation linéaire, en utilisant l'équation de Van den Dool et Kratz (1963) et (ii) du couplage en ligne CPG/SM qui permet d'obtenir le spectre de masse des composés individualisés. Les indices de rétention et les spectres ainsi obtenus sont comparés avec les données contenues dans une bibliothèque « Arômes » propre au laboratoire ou dans des bibliothèques commerciales (ou encore littérature) [5-11].

3. Résultats et discussion

L'analyse par CPG et CPG/SM de l'huile essentielle collective de sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) a permis de mettre en évidence cinq constituants majoritaires : l' α -acorénol (20,9 %), le cédrol (17,9 %), le totarol (8,8 %), l' α -cédrene (8,7 %) et le β -acorénol (7,4 %) (Figure 2).

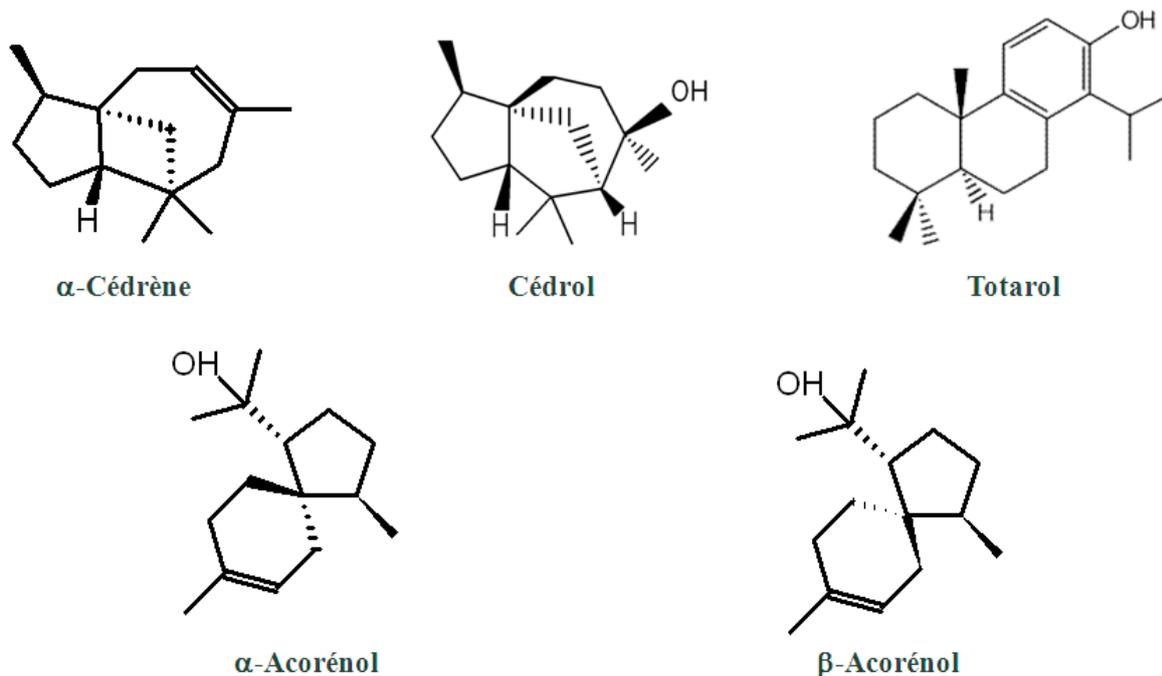


Figure 2: Structure des composés majoritaires de l'huile essentielle de la sciure de bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters

Par la suite, l'huile essentielle (3417 mg) a été fractionnée par chromatographie sur colonne ouverte de silice en utilisant un éluant de polarité croissante (Figure 2). Ainsi, cinq fractions (une fraction hydrocarbonée et quatre fractions oxygénées) ont été obtenues représentant respectivement 8,6 % (268 mg), 13,9 % (436 mg), 13,9 % (436 mg), 37,2 % (1165 mg) et 26,4 % (825 mg) de l'huile essentielle totale. La fraction (FH) est constituée d'hydrocarbures sesquiterpéniques principalement l' α -cédrène (HE: 8,7 %, FH: 34,4 %) alors que les quatre fractions oxygénées (FO1 à FO4) sont dominées par les alcools terpéniques : le totalol (HE: 8,8 % ; FO1: 42,4 %), l' α -acorénol (HE: 20,9 % ; FO3: 54,0%) et le cédrol (HE: 17,9% ; FO4: 58,2%). Ainsi, le fractionnement a permis notamment de séparer et de concentrer les composés majoritaires (l' α -cédrène, le totalol, l' α -acorénol et le cédrol) de l'huile essentielle susceptibles d'être valorisés pour leurs propriétés biologiques ou organoleptiques.

La composition chimique de l'huile essentielle de la sciure de tronc est largement dominée par les sesquiterpènes oxygénés (47,8 %) suivi des sesquiterpènes hydrocarbonés (24,3 %) et des diterpènes oxygénés (9,4 %) (Tableau 1). Nous constatons également la présence en faibles proportions de diterpènes hydrocarbonés (1,9 %), de monoterpènes oxygénés (0,8 %) et l'absence de monoterpènes hydrocarbonés. Ce travail vient compléter et enrichir les études réalisées sur les huiles essentielles de bois de *Tetraclinis articulata* du Maroc. En effet, Barrero *et al.* [12] ont identifié le cédrol, le 1,7-di-épi-cédrol et le 1,7-di-épi-isocédrol comme constituants majoritaires. Dans une autre étude, Zrira *et al.* [13] ont reporté une composition chimique dominée par le carvacrol, l' α -cédrène, le cédrol et le terpinèn-4-ol. Une troisième composition présente, en plus du carvacrol et du cédrol, d'autres composés majoritaires à savoir : le para-méthoxythymol et la thymohydroquinone [14]. À notre connaissance, cette étude est la première indiquant des abondances importantes en α -acorénol, β -acorénol et totalol dans les huiles

essentiels de bois de Thuya de Berberie. Ainsi, il semblerait qu'une forte diversité chimique existe entre les huiles essentielles de populations différentes.

Tableau 1 : Composition chimique des fractions de l'huile essentielle de sciure de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters

Composés	Ir l	Ir a	HE	FH	FO1	FO2	FO3	FO4
Carvacrol	1278	1278	0,8			2,9		
α -Funebrène	1385	1378	0,2	0,8				
α-Cédrène	1418	1413	8,7	34,4				
β -Cédrène	1434	1419	3,1	14,6				
Widdrène	1434	1426	0,3	1,8				
α -Acoradiène	1464	1459	4,9	10,6				
β -Acoradiène	1465	1461	3,9	3,9				
β -Alaskène	1495	1490	0,9	5,6				
Cuparène	1498	1492	0,4	2,6				
α -Alaskène	1512	1507	1,9	11,5				
ether d'italicène	1538	1521	0,8		4,8	1,2		
Cédrool	1601	1589	17,9				9,5	58,2
épi-Cédrool	1619	1601	0,8					5,1
α-Acorénool	1633	1621	20,9			34,9	54	12,6
β-Acorénool	1637	1623	7,4			1,1	9,4	
Isopimar-9(11),15-diène	1906	1901	0,5	1,7				
Pimara-8(14),15-diène	1955	1653	0,3	0,9				
Oxyde de Manoyl	1998	1974	0,2		0,5			
Isopimar-7,15-diène	1981	1980	0,4	0,5				
Abietatriène	2046	2032	0,7	4,6				
Sandaracopimarinool	2270	2243	0,4					1,5
Totarol	2314	2280	8,8		42,4	6,4		
Total			83,4	93,5	47,7	46,5	72,9	77,4
Monoterpènes oxygénés			0,8			2,9		
Sesquiterpènes hydrocarbonés			24,3	85,8				
Sesquiterpènes oxygénés			47,8		4,8	37,2	72,9	75,9
Diterpènes hydrocarbonés			1,9	7,7				
Diterpènes oxygénés			9,4		42,9	6,4		1,5

Ir a : indices de rétentions mesurées sur colonne apolaire (Rtx-1)

Ir l : indices de rétention de la littérature

Les abondances sont données sur colonne apolaire sauf en cas de coélution sur cette dernière.

Nous avons voulu comparer l'huile essentielle de sciure de bois à celle des feuilles d'une même population d'arbres. Les deux types d'huiles essentielles diffèrent fortement aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif. En effet, nous reportons la présence de 28 composés représentant 94% de la composition chimique totale avec l'acétate de bornyle (30,6 %), le camphre (18,6 %), l' α -pinène (16,8 %) et le limonène (5,7 %) comme constituants majeurs. Ainsi, et contrairement à celle du bois, la fraction volatile des feuilles est riche en monoterpènes hydrocarbonés (30,8 %) et oxygénés (60,9 %) (Tableau 2). On note aussi que l'huile essentielle des feuilles de *Tetraclinis articulata* provenant de Khemisset

contient les mêmes molécules principales que celles des essences originaires de Tétouan [12], d'Oued Cherrat [15] et de Tensift-Al Haouz (région de Marrakech) [16].

Tableau 2 : Composition chimique des fractions de l'huile essentielle de feuilles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters

Composés	Ir l	Ir a	HE
Tricyclène	927	921	2,0
α -Pinène	936	931	16,8
Camphène	950	943	2,2
Thuja-2,4(10)-diène	946	946	0,6
Sabinène	973	965	0,2
β -Pinène	978	970	0,4
Myrcène	987	982	2,0
para-Cymène	1015	1012	0,6
Limonène	1025	1022	5,7
γ -Terpinène	1051	1048	0,3
α -Campholénal	1105	1107	0,6
Camphre	1123	1127	18,6
trans-Verbénol	1136	1133	0,6
Pinocarvone	1137	1136	1,0
Bornéol	1150	1154	4,7
Terpinèn-4-ol	1163	1165	1,0
Myrtenal	1172	1173	0,3
α -Terpinéol	1176	1176	0,4
Verbénone	1183	1190	1,3
trans-Carvéol	1200	1202	0,7
Carvone	1214	1220	0,4
Acétate de bornyle	1270	1276	30,6
Acétate d' α -terpinyle	1335	1334	0,6
α -Copaène	1379	1372	0,5
Germacrène D	1479	1472	0,3
γ -cadinène	1507	1503	0,4
δ -cadinène	1520	1511	0,3
epi-cubénol	1623	1614	0,8
Total			94,0
Monoterpènes hydrocarbonés			30,8
Monoterpènes oxygénés			60,9
Sesquiterpènes hydrocarbonés			1,5
Sesquiterpènes oxygénés			0,8

Ir a : indices de rétentions mesurées sur colonne apolaire (Rtx-1)

Ir l : indices de rétention de la littérature

Les abondances sont données sur colonne apolaire sauf en cas de coélution sur cette dernière.

4. Conclusion

Grâce à la complémentarité de la CPG et du couplage en ligne CPG/SM, l'analyse détaillée de l'huile essentielle de sciure de bois de *Tetraclinis articulata* du Maroc a conduit à l'identification de 22 composés représentant 83,4 % de la composition chimique totale. Les constituants majoritaires sont : l' α -acorénol, le cédrol, le totarol, l' α -cédrene et le β -acorénol.

Nos résultats diffèrent notablement de ceux rapportés dans la littérature ce qui nous conduit à supposer une variabilité chimique chez *Tetraclinis articulata* pouvant être due à des facteurs écophysiologiques, génétiques ou encore environnementaux.

En vue de la valorisation de cette espèce, il convient d'envisager une étude plus exhaustive de variabilité chimique intra-station et inter-stations afin de déterminer (i) un éventuel polymorphisme et (ii) l'influence des différents paramètres précités sur cette diversité chimique. Il convient également d'étudier l'activité biologique (bactéries, levures et champignons) de chaque population.

Un fractionnement bio-guidé plus poussé permettra d'isoler et de déterminer les principes actifs de *Tetraclinis articulata* et ainsi, sélectionner les variétés hautement valorisables.

Références

- [1]. Achhal A., Barrero M. et Ech-Chamikh S. (1985). Productivité du thuya (*Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters) dans le bassin versant du N'fis. *Ecologia Mediterranea*. Tome XI. Fascicule 2/3.
- [2]. Haddad A., Lachenal D., Marechal A., Kaid-Harche M. et Janin G. (2006). Caractéristiques papetières de la pâte de bois de Thuya de Berberie (Algérie) (*Tetraclinis articulata* Vahl) obtenue par un procédé soude-anthraquinone. *Ann. For. Sci*, **63**, 493-498.
- [3]. AEFC. (1994). Inventaire National Forestier. Maroc.
- [4]. Ziyat A., Legssyer A., Mekhfi H, Dassouli A., Serhrouchni M. et Benjelloun W. (1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. Ethnopharmacol.*, **58**(1), 45-54.
- [5]. König W.A., Hochmuth D.H et Joulain D. (2001). Terpenoids and Related Constituents of Essential Oils. Library of MassFinder 2.1. University of Hamburg, Institute of Organic Chemistry: Hamburg, Germany.
- [6]. Jennings W. et Shibamoto T. (1980). Qualitative analysis of flavour and fragrance volatiles by glass-capillary gas chromatography. Jovanovitch HB Ed. Academic Press: New-York.
- [7]. Adams R.P. (2001). Identification of Essential Oil Components by Gaz Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing: Carol Stream, IL.

- [8]. McLafferty F.W. et Stauffer D.B. (1994). Wiley Registry of Mass Spectral Data, 6th edn. Mass Spectrometry Library Search System Bench-Top/PBM version 3.10d. Palisade: Newfield.
- [9]. McLafferty F.W. et Stauffer D.B. (1988). The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 4th edn. Wiley-Interscience: New York.
- [10]. National Institute of Standards and Technology. (1999). NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library. PC Version 1.7. Perkin-Elmer Corp: Norwalk, CT, USA.
- [11]. National Institute of Standards and Technology. (2005). NIST WebBook: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>
- [12]. Barréro A. F., Herrador M.M., Arteaga P., Quitz J., Aksira M., Mellouki F. et Akkad S. (2005). Chemical composition of essential oils of leaves and wood of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters; J. Essent. Oil Res., **17**, 166-167.
- [13]. Zrira S., Ben Jilali B. et Elamrani A. (2005). Chemical composition of the Sawdust oil of Moroccan *Tetraclinis articulata* (Vahl); J. Essent. Oil Res., **17**, 96-97.
- [14]. Ait Iggri M., Holeman M., Ilidrissi A. et Berrada M. (1990). Contribution à l'étude chimique des huiles essentielles des rameaux et du bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters; Plantes médicinales et phytothérapie, Tome XXIV, N° 1, p.36-43.
- [15]. Ait Iggri M. (1988). Contribution à l'étude phytochimique et chimiotaxonomique de quelques conifères du Maroc. Thèse de 3eme cycle ; faculté des Sciences, Rabat, Maroc.
- [16]. Achak N., Romane A., Alifriqui M. et Markouk M. (2009). Chemical Composition, Organic and Mineral Contents of Leaves of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters. From the Tensift Al Haouz, Marrakech region (Morocco); Journal of Essential oil-Bearing Plants, Jeobp, **12**(2), 198-204.