

(manuscrit reçu le 5 février 2010, accepté le 21 mai 2010)

PRODUCTION ET CARACTÉRISATION DE L'HUILE ESSENTIELLE DE LA SCIURE DE BOIS DE *TETRACLINIS ARTICULATA* (VAHL) MASTERS

M. BOURKHISS¹, M. HNACH¹, T. LAKHLIFI¹, B. BOURKHISS²,
M. OUHSSINE² et B. SATRANI³

¹ Département de chimie, Faculté des Sciences, Université Moulay Ismail, BP 4010 Béni M'hamed, 50 000 Meknès, Maroc.

² Laboratoire de biotechnologie microbienne, Département de biologie, UFR Amélioration et transformation microbienne et végétale, Faculté des sciences, Université Ibn Tofaïl, 14000 Kénitra, BP 133, Maroc.

³ Centre National de la Recherche Forestière, BP 763, Rabat Agdal, 1005, Maroc.

Résumé

Plusieurs villes marocaines, notamment Essaouira, sont connues par la transformation artisanale du bois de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters utilisé surtout en marqueterie et ébénisterie. Cette industrie génère des quantités énormes de sciures qui sont brûlées pour servir essentiellement de source d'énergie aux bains maures. Ce travail vise la valorisation de ce sous-produit par la production d'huiles essentielles, la caractérisation chimique et l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique de ces essences.

Le rendement en huiles essentielles de la sciure de tronc est de 1,63%. Il est relativement élevé par rapport à certaines plantes exploitées industriellement comme source d'huiles essentielles. Ces huiles sont constituées principalement par α -acorénol (20,9%), cédrol (17,9%), totarol (8,8%), α -cédrene (8,7%) et β -acorénol (7,4%).

L'huile essentielle est très active *in vitro* contre les bactéries *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus* et les champignons *Penicillium parasiticus*, *Aspergillus niger* et *Trametes pini*.

Mots-clés: *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, production, caractérisation, valorisation, sciure de bois, huiles essentielles, composition chimique, activité antimicrobienne.

Abstract

Several Moroccan cities, Essaouira in particular, are known for the artisanal processing of sawdust of *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters mainly used in marquetry and cabinet making. The industry generates huge amounts of sawdust that are burnt to serve primarily as an energy source for the Moorish baths. This work is focused on the valorization of this byproduct in the production of essential oils, the chemical characterization and the study of the antibacterial and antifungal activity of these species.

The yield of essential oils of sawdust is 1.63%. It is relatively high compared to some plants that are used industrially as a source of essential oils. These oils are composed mainly of α -acorenenol (20.9%), cedrol (17.9%), totarol (8.8%), α -cedrene (8.7%), and β -acorenenol (7.4%).

The essential oil is very active *in vitro* against the bacteria *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* and the fungi *Penicillium parasiticus*, *Aspergillus Niger* and *Trametes pini*.

Keywords: *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters, production, characterization, valorization, sawdust, essential oils, chemical composition, antimicrobial activity.

1. INTRODUCTION

De la famille des Cupressacées, *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters (Thuya de Berberie) est géographiquement lié aux trois pays du Maghreb (Maroc, Algérie et Tunisie). Il se rencontre aussi dans quelques secteurs très ponctuels, au Sud-est de l'Espagne (région d'Almeria) et sur l'île de Malte [1].

Au Maroc, le Thuya de Berberie est par excellence l'arbre du bioclimat semi-aride tempéré et chaud. Les principaux massifs s'observent sur le versant méditerranéen depuis Tétouan jusqu'à Al Hoceima, le Rif oriental, les monts de Bni Snassène et de Debdou, le Moyen Atlas surtout Central, les vallées du Plateau Central, la Meseta Occidentale, les Haha et les Ida-ou-Tanane, le Haut-Atlas et l'Anti-Atlas (figure 1). C'est une essence de basse altitude dépassant rarement 1400 m. Le Thuya occupe la troisième place, en terme de superficie, après le chêne vert. Cependant, la superficie occupée par ce résineux n'a cessé de régresser au fil du temps à cause de son exploitation par l'Homme d'une manière régulière ou clandestine. En effet, il ne représente actuellement que 560.670 ha, soit une diminution de 174.280 ha en 44 ans [2].

Les forêts de Thuya assurent un rôle très important dans la vie économique et sociale des populations riveraines. Son bois, caractérisé par sa résistance à la pourriture, est utilisé surtout dans le secteur artisanal pour la marqueterie, l'ébénisterie et aussi comme bois de feu. La gomme sandaraque produite par *Tetraclinis articulata* est totalement exportée à l'étranger. Elle est utilisée dans la fabrication de vernis de luxe et en industrie pharmaceutique [3,4]. En médecine populaire, différentes parties sont utilisées principalement pour le traitement des infections intestinales et respiratoires, le diabète et l'hypertension [5, 6].

L'industrie du bois de Thuya génère jusqu'à 50% de déchets de la quantité consommée [7]. À Essaouira, ville marocaine connue pour son activité artisanale très importante, cette quantité est estimée annuellement à 2330,4 tonnes. Ce sous-produit de *Tetraclinis articulata* est brûlé pour servir de source d'énergie essentiellement pour les bains maures alors qu'il pourrait constituer une matière première pour la production des huiles essentielles. Les huiles de Thuya sont largement utilisées en pharmaceutique et en cosmétique.

Cette étude vise la production des huiles essentielles de la sciure de bois de tronc, la détermination de la composition chimique et l'étude de l'activité antimicrobienne de ces huiles afin de contribuer à une meilleure valorisation de cette essence forestière.

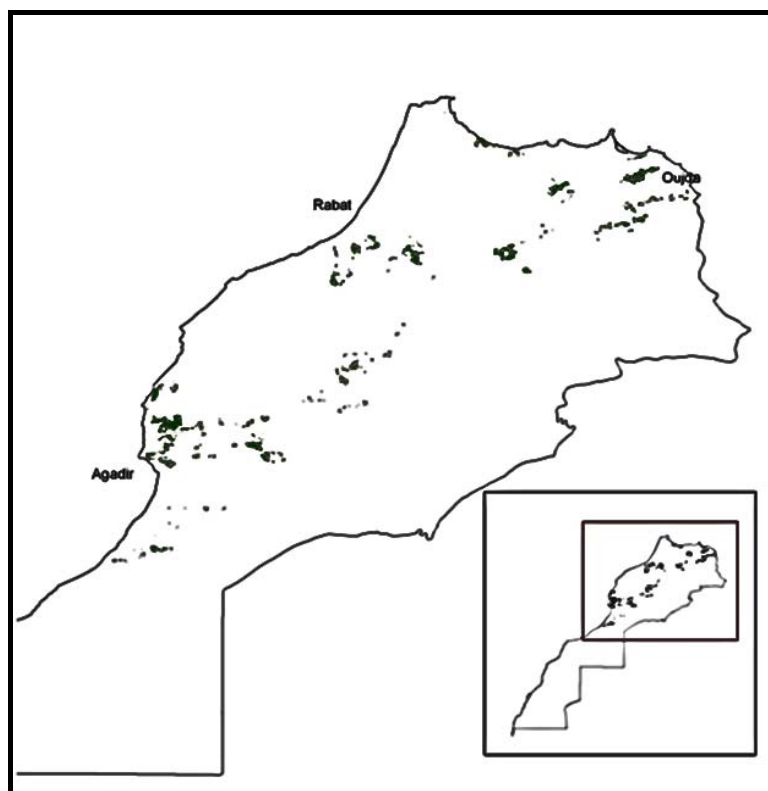


Figure 1 : Carte de localisation de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters à l'échelle du Maroc

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

Les échantillons de *Thuya* ont été prélevés dans la région de Khemisset (Plateau Central Marocain). 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. Matériel bactérien et fongique

Six souches microbiennes ont été choisies pour leur pathogénicité et pour leur implication fréquente dans la contamination des denrées alimentaires : quatre souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*) et trois souches fongiques (*Penicillium parasiticus*, *Aspergillus niger* et *Trametes pini*).

Les souches bactériennes sont des lots de « American Type Culture Collection » ATCC ; elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance. Les moisissures sont cultivées sur le milieu nutritif « Potato Dextrose Agar » (PDA).

2.3. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle de la sciure de bois de tronc a été réalisée par hydrodistillation dans un essencier 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. Le rendement en huile essentielle est

exprimé 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.

2.4. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les analyses ont été réalisées grâce à 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, polyéthylèneglycol) et apolaire (Rtx-1, polydiméthylsiloxane).

Le gaz vecteur est l'hélium 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.

2.5. Couplage CPG/ spectrométrie de masse (SM)

Les analyses ont été réalisées grâce à un chromatographe Perkin Elmer Autosystem XL, doté d'un injecteur automatique et de deux colonnes (60 m x 0,22mm d.i. épaisseur du film : 0,25 µm) polaire (Rtx-Wax) et apolaire (Rtx-1), couplé à un détecteur de masse Perkin Elmer TurboMass. Les molécules sont bombardées par un faisceau électronique de 70 eV, la détection se fait par un analyseur quadripolaire constitué d'un assemblage de quatre électrodes parallèles de section cylindrique. La température de la source est de 150°C. Les spectres de masse obtenus par impact électronique ont été acquis sur la gamme de masse 35-350 Da.

Le gaz vecteur est l'hélium avec une pression en tête de colonne de 43 psi. Le débit dans chaque colonne est de 1 ml/mn. La programmation de la température est identique à celle utilisée précédemment pour la CPG. 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.

2.6. Procédure microbiologique

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles essentielles ont été déterminées selon la méthode rapportée par Remmal *et al.* [8]. et Farah *et al.* [9]. Du fait de la non miscibilité des huiles essentielles à l'eau donc au milieu de culture, la mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'agar à 0,2 % afin de favoriser le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au 1/10e, 1/25e, 1/50e, 1/100e, 1/200e, 1/300e et 1/500e dans cette solution d'agar. Dans des tubes à essais contenant chacun 13,5 ml de milieu gélosé à l'extrait de malt (2 %), stérilisés à l'autoclave (20 min à 121 °C) et refroidis à 45 °C, on ajoute 1,5 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000 (v/v). Puis on agite convenablement les tubes avant de les verser dans des boîtes de Pétri. Des témoins, contenant le milieu de culture et la solution d'agar à 0,2 % seule, sont également préparés.

L'ensemencement se fait par stries à l'aide d'une anse de platine calibrée afin de prélever le même volume d'inoculum. Ce dernier se présente sous forme de bouillon de culture de 24 heures pour les bactéries et sous forme d'une suspension dans l'eau physiologique de spores provenant d'une culture de sept jours dans le PDA pour les moisissures. L'incubation se fait à l'obscurité 24 heures à 37 °C pour les bactéries et sept jours à 25 °C pour les champignons. Chaque essai est répété trois fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le rendement moyen en huile essentielle de la sciure de bois de tronc de *Tetraclinis articulata* (Vahl) de la région de Khemisset (Plateau Central Marocain) est de 1,63 %. Il est plus important que celui obtenu à partir des feuilles et des rameaux non feuillus respectivement 0,22% et 0,41% [10, 11] et relativement élevé par rapport à certaines plantes qui sont exploitées industriellement comme source des huiles essentielles [12].

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle de la sciure de bois de tronc de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters

Composés	Ir l	Ir a	Pourcentage (%)
carvacrol	1278	1278	0,8
α -funebrène	1385	1378	0,2
α-cédrène	1418	1413	8,7
β -cédrène	1434	1419	3,1
Widdrène	1434	1426	0,3
α -acoradiène	1464	1459	4,9
β -acoradiène	1465	1461	3,9
β -alaskène	1495	1490	0,9
cuparène	1498	1492	0,4
α -alaskène	1512	1507	1,9
oxyde d'italicène	1538	1521	0,8
cédrol	1601	1589	17,9
épi-cédrol	1619	1601	0,8
α-acorénol	1633	1621	20,9
β-acorénol	1637	1623	7,4
isopimar-9(11),15-diène	1906	1901	0,5
pimara-8(14),15-diène	1955	1653	0,3
oxyde de manoylène	1998	1974	0,2
isopimar-7,15-diène	1981	1980	0,4
abietatriène	2046	2032	0,7
sandaracopimarinol	2270	2243	0,4
totalol	2314	2280	8,8
Total			83,24
Monoterpènes oxygénés			0,8
Sesquiterpènes hydrocarbonés			24,3
Sesquiterpènes oxygénés			47,8
Diterpènes hydrocarbonés			1,9
Diterpènes oxygénés			9,4

Ir a : indices de rétention 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 co-élution sur cette dernière.

Vingt-deux composés représentant plus de 83% de la composition chimique totale ont été identifiés (Tableau 1). Les constituants majoritaires sont : l' α -acorénol (20,9%), le cédrol (17,9%), le totarol (8,8%), d' α -cédrène (8,7%) et le β -acorénol (7,4%). Cette composition est largement dominée par les sesquiterpènes oxygénés (47,8%) suivi des sesquiterpènes hydrocarbonés (24,3%) et des diterpènes oxygénés (9,4%). On note également la présence en faible proportion de diterpènes hydrocarbonés (1,9%), de monoterpènes oxygénés (0,8%) et l'absence totale de monoterpènes hydrocarbonés.

L'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* (Vahl) présente une forte activité inhibitrice vis-à-vis de tous les germes testés (Tableau 2). Cependant, les microorganismes étudiés n'ont pas manifesté la même sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle. Chez les bactéries, *Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus* sont inhibés à partir de la plus faible concentration utilisée (1/1000), par contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* ont manifesté une certaine résistance jusqu'à 1/5000 (v/v). Pour les souches fongiques, *Penicillium parasiticus* et *Aspergillus niger* sont inhibés à 1/2000 alors que *Trametes pini* n'est inhibé qu'à partir de 1/1000 (v/v).

Tableau 2 : Activité antibactérienne et antifongique de l'huile essentielle de la sciure de bois de tronc de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters

Concentration V/V	1/100	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/5000	1/10000	T
Bactéries								
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
Champignons								
<i>Trametes pini</i>	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Penicillium parasiticus</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	+	+	+

T : témoin

- : inhibition

+ : croissance.

Le pouvoir bactéricide et fongicide élevé de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* (Vahl) est dû essentiellement à sa composition chimique très riche en alcools terpéniques. Plusieurs auteurs [13, 14, 15] ont travaillé sur l'activité antimicrobienne des composés majoritaires des huiles essentielles qu'ils ont classés dans l'ordre décroissant suivant : phénols > alcools > aldéhydes > cétones > éthers > hydrocarbures. Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont rapporté que les alcools possèdent une activité microbicide plutôt que bactéricide.

Les bactéries ont été plus vulnérables à l'huile essentielle que les champignons. Ce résultat est à rapprocher du fait que les terpénols sont abondants par rapport aux hydrocarbures terpéniques. En effet, il a été signalé que les terpénols sont plus efficaces contre les bactéries que contre les champignons [16]. Le totarol (phénol diterpénique) en particulier est connu par son efficacité antibactérienne très élevée [17, 18, 19, 20, 21].

4. CONCLUSION

Cette étude consacrée à la valorisation de la sciure de bois de Thuya de Berberie, sous-produit de cette essence par la production d'huiles essentielles, la détermination de la composition chimique et l'étude de l'activité antimicrobienne de ces huiles.

Le rendement en huiles essentielles obtenu est industriellement intéressant (1,63%). L'analyse qualitative et quantitative de l'huile a permis d'identifier 22 constituants. Elle est caractérisée par la dominance de l' α -acorénol (20,9%), le cédrol (17,9%), le totarol (8,8%), d' α -cédrene (8,7%) et le β -acorénol (7,4%).

L'huile essentielle étudiée a montré une forte activité antibactérienne et antifongique contre toutes les bactéries et tous les champignons testés. Le pouvoir inhibiteur élevé de l'huile pourrait s'expliquer par teneur élevée en phénols terpéniques particulièrement le totarol.

RÉFÉRENCES

1. Achhal A., Barrero M., Ech-Chamikh S., (1985), *Productivité du thuya (Tetraclinis articulata (Vahl) Masters) dans le bassin versant du N'fis dans Ecologia Mediterraea*, Tome XI, Fascicule 2/3.
2. Bourkhiss B., Ouhssine M., Hnach M., Amechrouq A., Chaouch A., Satrani B. (2007), Composition chimique de l'huile essentielle de *Tetraclinis articulata* (Vahl) du Maroc Physical & Chemical News (PCN). Vol. 35.
3. Bellakhadar J., (1997), *La pharmacopée marocaine traditionnelle*. Impressions DUMAS, Saint-Etienne.
4. Boudy P.(1952). *Guide forestier en Afrique du Nord*, La maison rustiqu Éd., Paris, 273.
5. Belkhadar J., Claisse R., Fleurentin J. et Yaunos C., (1991), *Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoeia*, Journal of Ethnopharmacology. **35**, 123-143.
6. Ziyyat A., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M., and Benjelloun W. (1997), *Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco*, J. Ethnopharmacol., **58**, 45-54.
7. Fennane M. (1987). *La grande encyclopédie du Maroc : Flore. Présentation du monde végétal*, Cremone, Italie, 17-13.
8. Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T., Rhayour K., and Ettayebi M. (1993). *Improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium*, J. Ess. Oil. Res., **5**, 1179-1184.
9. Farah A., Satrani B., Fechtal M., Chaouch A. et Talbi M. (2001), *Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles d'Eucalyptus camaldulensis et son hybride naturel (clone 583)*, Acta Bot. Gall., **148**, 183-190.

10. Bourkhiss M., Hnach M. Bourkhiss B., Ouhssine M. et Chaouch A. (2007), *Composition chimique et propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle extraite des feuilles de Tetraclinis articulata (Vahl) du Maroc*. Afrique Science **3**, 232 – 242.
11. Bourkhiss B., Ouhssine M., Hnach M., Bourkhiss M., Satrani B. et Farah A, (2007). *Composition chimique et bioactivité de l'huile essentielle des rameaux de Tetraclinis articulata*, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, **146**, 75-84.
12. Claus E.P., Varro E.T., and Lynn R.B, (1987). Pharmacognosy, sixth edition. LEA and Febiger (éd), 184-187.
13. Cox S.D., Mann C.M., and Markham J.L., (2001), *Interactions between components of the essential oil of Melaleuca alternifolia*, J. Appl. Microbiol., **91**, 492-497.
14. Hammer K.A., Carson C.F., and Riley T.V. (2003), *Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil*, J. Appl. Microbiol., **95**, 853-860.
15. Inouye S., Tsuruoka T., Uchida K., and Yamaguchi H., (2001), *Effect of sealing and tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils*, Microbiol. Immunol, **45**, 201-208.
16. Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H., and Weis N., (1989). *Antibacterial and antifungal properties of essential oil components*, J. Ess. Oil Res., **1**, 119-128.
17. Smith E.C.J., Kaatz G.W., Seo S.M., Wareham N., Williamson E.M., and Gibbons S., (2007), *The Phenolic Diterpene Totarol Inhibits Multidrug Efflux Pump Activity in Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **51**, 4480-4483.
18. Kubo I., Muroi H., and Himejima M., (1992). *Antibacterial activity of totarol and its potentiation*, J. Nat. Prod. **55**, 1436-1440.
19. Becerra J, Flores C, Mena J, Aqueveque P, Alarcón J, Bittner M, Hernández V, Hoeneisen M, Ruiz E, and Silva M., (2002) *Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of chilean podocarpaceae*, Bol. Soc. Chil. Quím., **47**, 151-157.
20. Jaiswal R., Beuria T.K., Mohan R., Mahajan S.K., and Panda D., (2007), *Totarol Inhibits Bacterial Cytokinesis by Perturbing the Assembly Dynamics of FtsZ*, Biochemistry, **46**.
21. Sato K., Sugawara A.K., Takeuchi A.H., Park A.H., Akiyama B.T., Koyama B.T., Aoyagi B.Y., Takeya A.K., Tsugane A.T., and Shimurac C.S., (2008). *Antibacterial Novel Phenolic Diterpenes from Podocarpus*