

Les flavonoïdes du Pin maritime : une approche chimiotaxinomique

par M. IDRISSE-HASSANI ^(1,2)
et Philippe LEBRETON ^(2,3)

Introduction

Parmi les quelques 150 représentants du genre *Pinus*, le plus riche en espèces parmi les Conifères, le Pin maritime *Pinus pinaster* Ait. (*P. maritima* Lam. non Mill.) appartient à la section II. *Taedoponderosoides* du sous-genre *Eupinus* (Gaussen, 1960), section dont il est d'ailleurs le seul représentant européen.

Le Pin maritime présente une aire fragmentée (voir Jalas et Suominen, 1973), dans les deux domaines bioclimatiques méditerranéen (Toscane et Ligurie, Corse et Provence, Algérie et Maroc) et atlantique (Landes, Portugal). Favorisée par le forestier, l'essence couvre actuellement en France 1,4 millions d'hectares, soit 2,5 % du territoire et 10,5 % des surfaces boisées ; avec près de 30 % des boisements résineux, le Pin maritime se situe maintenant au premier rang de ceux-ci, peu avant le Pin sylvestre, bien avant le Sapin ou l'Epicéa (Minist. Agric. Forêt, 1990).

H. Del Villar (voir Gaussen, *loc.*

cit., p. 113) a proposé de reconnaître une sous-espèce *atlantica* tandis que Gaussen est même allé jusqu'à prendre en compte deux espèces, l'une atlantique (*P. pinaster* au sens strict), l'autre *P. mesogeensis* Fieschi et Gaussen, présente "au pourtour de la Méditerranée occidentale, de la Grèce au Maroc (...). Une race particulièrement belle se développe en Corse et est connue sous le nom de Pin de Corté" (Gaussen, *loc. cit.*, pp. 112-113).

Nous nous proposons ici d'apporter une contribution d'ordre biochimique à la connaissance du taxon, grâce à l'analyse des flavonoïdes, par une démarche comparable à celle précédemment retenue dans le domaine des terpènes (Bernard Dagan *et al.*, 1971 ; Baradat *et al.*, 1972, 1975, 1978 ; Baradat et Marpeau-Bezard, 1988). Il s'agit de résultats tirés pour partie de la thèse de l'un d'entre nous (Idrissi Hassani, 1985).

Partie expérimentale

1. Echantillonnage botanique

Quatre origines représentatives de l'aire de l'espèce ont été retenues et approvisionnées avec le concours de l'I.N.R.A. (Arbez & Baradat, communication personnelle) : Landes, Corse (Vivario), Portugal (Leiria) et Maroc (Tamjoute), à raison de 20 individus pour les trois dernières origines, qualifiables de "populations" au sens génétique du terme. Dans le cas des Landes, les 40 individus étudiés provenaient de l'ensemble de la région (15.000 km²), mais leur étude biochimique (*vide infra*)

a montré que la variabilité inter-individuelle était tout à fait comparable à celle des trois autres origines (Idrissi Hassani, Thèse, pp. 109-113) ; nous parlerons donc ici de "méta-population" comme niveau d'échantillonnage. En outre, pour chaque individu des Landes, deux copies végétatives obtenues par greffe (clones) ont été analysées ; les écarts observés sont de l'ordre de grandeur des erreurs analytiques (3 à 4 %) et le résultat utilisé est la moyenne des deux dosages réalisés.

Pour les quatre origines, les échantillons sont des individus cultivés en plantations comparatives à la station I.N.R.A. d'Amélioration

(1) Département de Biologie de la Faculté des Sciences d'Agadir, Maroc.
(2) Laboratoire de Biochimie Végétale de l'Université LYON-I, F-69622 Villeurbanne

(3) GRECO C.N.R.S. "Ecologie des Forêts méditerranéennes", Faculté Saint-Jérôme, Université Aix-Marseille-III.

des arbres forestiers de Cestas, Pierroton (Gironde). Cette localisation avantage la croissance des individus landais, mais n'est peut-être pas l'optimum pour les individus marocains, d'origine montagnarde, par exemple. A ce sujet néanmoins, la comparaison biométrique d'individus cultivés en Gironde ou prélevés *in natura* n'a pas montré de différences significatives (voir tableau 1, ci-dessous). Pour notre étude, nous avons utilisé les pousses de l'année 1983, prélevées à mi-hauteur de l'arbre sur le verticille 1981, au début de mars 1984.

2. Etude biométrique

Pour chaque individu (20 x 4 origines) , ont été ici déterminés la longueur moyenne et le poids moyen d'une aiguille, mesurés sur 10 aiguilles. Les moyennes et écarts-types par population sont rapportés dans le tableau joint. Une relation linéaire hautement significative ($p < 0,001$) liant les deux paramètres, le premier a été retenu par commodité expérimentale.

Nous avons également calculé "l'indice de forme" L^2/P (L = longueur, P = poids d'une aiguille) (cf. Lauranson, 1989).

3. Etude biochimique

L'analyse a porté sur des aiguilles séchées à l'air libre, à l'abri de la chaleur et de la lumière vives. Exposé en détail par ailleurs (Idrissi, Thèse, 1985), le mode opératoire est basé sur le traitement acide (HCl 2 N, 160 ml aq., 2 g de poudre végétale ; 45 mn au bain-marie bouillant) des proanthocyanidines (qui génèrent les anthocyanidines homologues, cyanidine et delphinidine) et des glycosides flavoniques (qui libèrent les aglycones correspondants : kaempférol, quercétine, isorhamnétine, etc).

Origine	Maroc			Port.	Corse	Landes		
	Récolté <i>in natura</i> , Atlas			<i>Plantations comparatives</i> I.N.R.A. (Gironde)				Profil de espèce
	a	b	c					
Poids moyen 1 aiguille (mg.)	63 (08)	84 (11)	65 (04)	89 (19)	143 (39)	143 (27)	221 (38)	60 à 250
Long. moyenne 1 aiguille (mm)	102 (16)	120 (07)	113 (15)	143 (19)	178 (24)	180 (19)	216 (20)	90 à 230
Indice de forme L²/P (cm²/g)	—	—	—	2,34 (0,43)	2,28 (0,35)	2,30 (0,37)	2,13 (0,24)	2,2
Proanthocyanidines totales (mg/g)	—	—	—	6,9 (1,1)	6,4 (1,4)	5,8 (1,5)	5,9 (1,8)	6,5
		Prodelphinidine (% du total)		93 (01)	93 (01)	92 (01)	92 (01)	92
Flavonols totaux (mg/g)				1,12 (0,15)	0,97 (0,20)	0,84 (0,18)	0,85 (0,14)	1,0
		Flavonol inconnu (% du total)		3,7 (1,2)	5,6 (1,5)	3,4 (1,1)	4,4 (1,7)	4
		Quercétine (idem)		17,1 (2,6)	17,8 (3,3)	17,4 (3,7)	14,6 (2,1)	17
		Larycitrine (idem)		8,9 (1,1)	10,6 (1,4)	9,1 (1,2)	8,4 (0,9)	9
		Kaempférol (idem)		44,2 (3,3)	43,4 (5,0)	46,2 (4,6)	47,9 (3,9)	46
		Isorhamnétine (idem)		21,4 (1,4)	19,8 (1,2)	21,2 (1,1)	21,5 (1,2)	21
		Syringétine (idem)		4,6 (1,4)	2,2 (1,2)	2,6 (1,1)	3,2 (1,2)	3
		Kaempférol (p.p.m.)		494 (064)	413 (067)	383 (069)	403 (061)	440
Rapport Pro-Anthocyanes / Flavonols				6,3 (1,3)	6,8 (1,4)	6,9 (1,4)	6,9 (1,7)	6,7

Tableau 1 : Résultats biométriques et biochimiques (aiguilles) relatifs au Pin maritime (3 + 4 origines)

Note : les chiffres entre parenthèses accompagnant les moyennes sont les écarts-types

Les anthocyanidines totales sont dosées en phase aqueuse à 535 nm, les flavonols à 425 nm après extraction à l'éther, reprise par l'éthanol et complexation aluminique. Les proportions des substances sont déterminées par C.L.H.P. (C 18 MicroBondapak.

Solvant MeOH/H₂O/AcOH : 30/60/10 pour les anthocyanidines, 40/55/05 pour les flavonols). Le produit de la teneur globale par la teneur relative (mesurée en hauteur de pics) donne la teneur absolue, en mg/g, de chaque flavonoïde.

Résultats et discussion

L'ensemble des résultats biométriques et biochimiques (moyennes et écarts-types par origine) est fourni dans le tableau. Les résultats détaillés pour chacun des 4 x 20 individus figurent dans la thèse précitée, de même que les critères d'identification des flavonoïdes.

La distribution des deux proanthocyanidines, procyanidine et prodelfphinidine, quasiment identique chez tous les individus, ne permet aucune discrimination : contrairement au Pin sylvestre (Laracine-Pittet & Lebreton, 1985), nous avons affaire ici à une espèce particulièrement monomorphe.

L'analyse multivariée (A.C.P. normée) de la matrice (4 populations x 20 individus) x 6 flavonols montre que le kaempférol porte à lui seul la moitié de la variabilité inter- et intra-populationnelle (67 % de l'information portée par le premier axe, lui-même porteur de 73 % de la variance), la quercétine le quart. L'utilisation du premier flavonol (en % du total flavonique) comme "marqueur unidimensionnel" permet en effet de discriminer globalement les Landes du Portugal et du Maroc (t = 3,16 et 3,09 ; d.d.l. = 38, p = 0,005), moins nettement le Portugal du Maroc et de la Corse, et cette dernière des Landes (t = 1,78 et 1,80 ; p = 0,08), mais non la Corse du Maroc (voir schéma).

L'appel aux proanthocyanidines (teneur globale) ne fournit pas d'indication supplémentaire, mais les flavonols totaux sont plus utiles : à l'exception du couple Landes/Corse, toutes les comparaisons de populations se révèlent positives (voir fig. 1) y compris pour le couple Corse/Maroc. Il est néanmoins plus opportun de ne pas se confiner aux seuls critères flavoniques, et de faire appel, non seulement à un autre critère bio-

chimique (celui des terpènes), mais à un critère biométrique (celui des aiguilles).

Une première représentation, plane (pourcentage du kaempférol combiné au poids moyen d'une aiguille), discrimine parfaitement Landes, Corse et Maroc ; mais le Portugal est pratiquement superposé à la Corse et empiète assez largement sur le Maroc (Thèse, pp. 114-116) ; l'appel aux teneurs absolues en kaempférol améliore quelque peu la résolution (voir fig. 2). Par contre, l'indice de forme (L²/P), de bonne efficacité taxonomique pour l'analyse de l'espèce collective *Pinus nigra* Arn. (Lau-

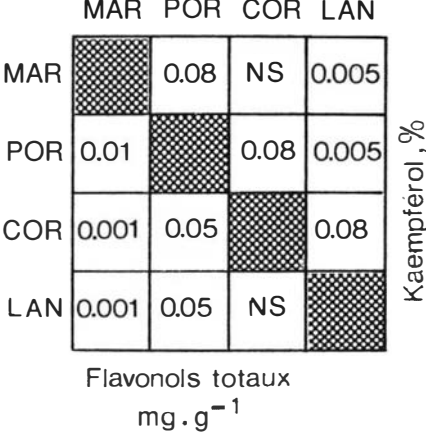


Figure 1 : Distinction biochimique (risque p, test t) des 4 populations de Pin maritime étudiées.

ranson, 1989), est ici inopérant, les quatre populations présentant des moyennes (et des écarts-types) tout à fait comparables, reflétant probablement l'homogénéité de l'espèce *Pinus maritime*.

En ce qui concerne les monoterpènes, l'étude de près de 3500 individus provenant de plus de 100 origines couvrant l'aire naturelle de l'espèce, a permis à Baradat et Marpeau-Bezard (1988) de distin-

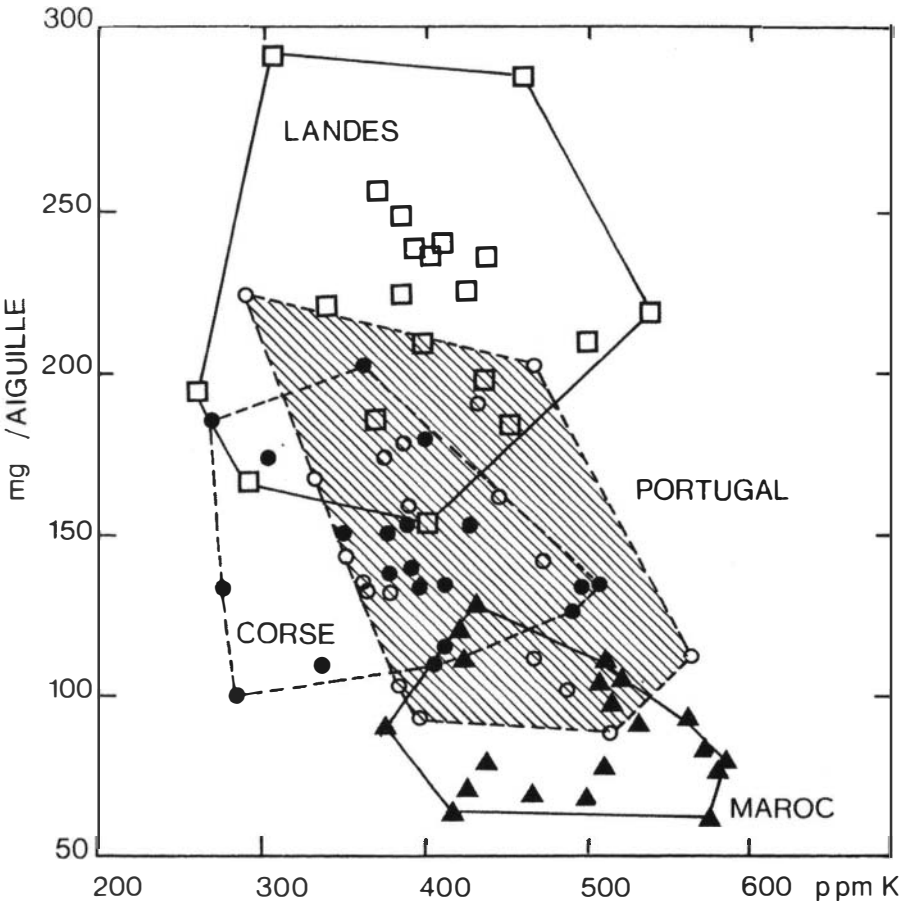


Figure 2 : Représentation biochimique et biométrique des 4 populations de Pin maritime étudiées.

guer trois sous-ensembles respectivement qualifiés de maghrébin, atlantique et péri-méditerranéen. Quatre des six molécules retenues sont systématiquement moins abondantes chez les individus du Maghreb que chez les autres, le 3-carène assurant à lui seul une discrimination quasi parfaite, en raison de son absence générale (un seul spécimen maghrébin sur 587 analysés connaît cette molécule). La discrimination des deux autres groupes est moins nette, individus ibériques et corses demeurant ainsi proches sur les 3 premiers axes d'une analyse en composantes principales portant sur les 6 monoterpènes envisagés.

Des études ont été également conduites sur "les isozymes et les protéines totales ; 17 et 117 loci polymorphes ont été respectivement utilisés pour caractériser 7 provenances différentes" (R. Petit et N. Bahrnmann, non publié ; Baradat, communication personnelle).

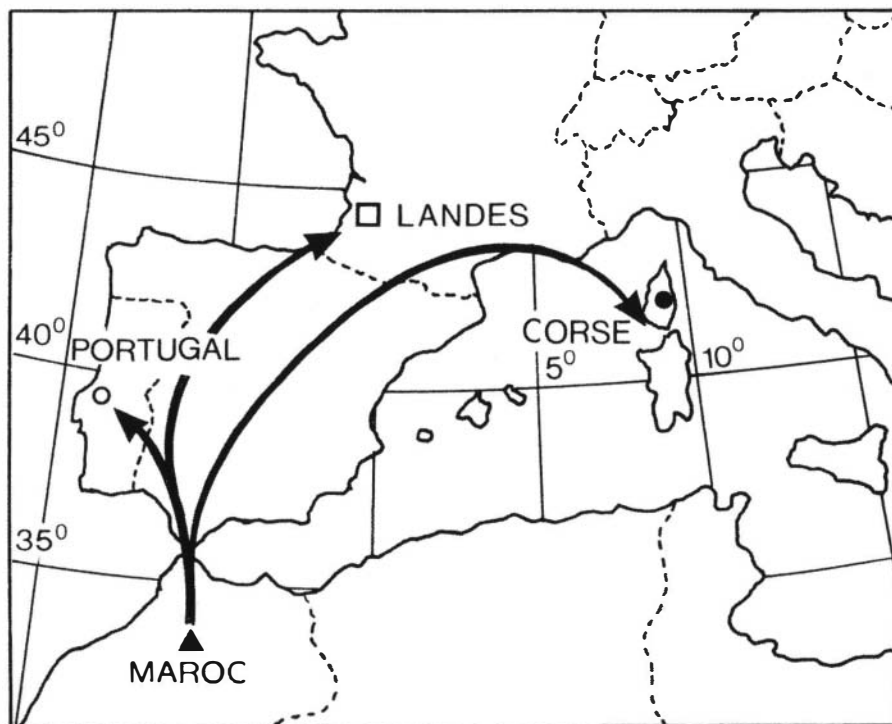


Figure 3 : Schéma évolutif proposé pour les 4 populations de *Pin maritime* étudiées

Conclusions générales

La recherche de critère(s) permettant de distinguer entre elles les différentes populations ou "origines" du *Pin maritime* n'est pas seulement d'ordre académique : ayant reboisé leurs massifs incendiés dans les années 50 avec des graines (fraudemment) importées du Portugal - en raison d'une demande supérieure à l'offre locale -, des sylviculteurs landais ont eu la désagréable surprise de perdre à nouveau une partie importante de leurs boisements quelque 30 ans plus tard, suite aux gels intenses de février 1985. La "vieille" discipline qu'est la systématique peut donc aider l'économie ; et la (jeune) discipline qu'est la chimiotaxinomie peut donc aider la systématique, et l'économie.....

Mais pour réels - et utiles à déterminer - qu'ils soient, ces critères sont ici peu discriminants : entre Maroc et Landes - que l'on peut donc considérer comme les deux pôles de l'espèce - les différences sur le kaempférol ne portent que sur 10 % à peine de la teneur relative (20 % sur la teneur absolue) ! La biochimie flavonique, si elle peut aider à qualifier l'origine marocaine, n'apporte donc certainement pas d'argument en faveur de la reconnaissance

d'un pin mésogéen *Pinus mesogeensis* Fieschi et Gaussen, distinct d'un "pin maritime" alors restreint au secteur atlantique (cf. Gaussen, 1960, p. 59) ; la variabilité flavonique au sein du taxon collectif *Pinus maritime* est en fait très réduite, bien moindre que celle notée chez d'autres Pins étudiés au Laboratoire (Pin noir et Pin à crochet - Lauranson, 1989 - et surtout Pin sylvestre, espèce qualifiable de polymorphe pour les proanthocyanes comme pour les flavonols ; Laracine-Pittet et Lebreton, 1988). Le *Pin maritime* est un taxon quasi monomorphe, voire monotypique, que ne marquent que modérément les écarts biochimiques et biométriques ci-dessus décrits.

On peut néanmoins admettre, par opposition au Pin des Landes, la variété *maghrebiana* H. del Villar, d'autant que cette origine, non seulement est dépourvue de - 3 carène (nous sommes alors en présence d'un caractère tranché), mais présente les plus faibles coefficients de variation sur les constituants flavoniques parmi les 4 origines étudiées (+/- 16 % sur les proanthocyanidines, +/- 13 % sur les flavonols totaux et +/- 7 % sur le kaempférol ; cf. tableau p. 4).

En ce qui concerne la proximité flavonique et biométrique des deux origines corse et ibérique ici étudiées, non seulement les plus récentes données de Baradat confirment le fait pour les terpènes, mais elles proposent une explication originale de ce rapprochement ; les peuplements corses pourraient en effet résulter du transport de graines (à l'époque romaine, ou même postérieurement) : "Ainsi, la race Corse aurait été façonnée à la suite de l'intervention humaine, à partir d'hybrides de pins du sud-est de l'Espagne et du nord de l'Italie" (Baradat et Marpeau-Bezard, 1988, p. 269). D'après les études polliniques (ibid., p. 31 et 288, citant Reille, Thèse, 1975), le *Pin maritime* ne serait d'ailleurs apparu en Corse qu'il y a environ 2000 ans. Un schéma général peut être fourni (voir fig. 3), voyant dans les populations marocaines le "réduit" de l'espèce lors d'une phase glaciaire, avec repeuplements ultérieurs, spontanés ou anthropiques, vers le nord et vers l'est.

Par ailleurs, le profil flavonique du *Pin maritime* le distingue bien de 3 autres espèces étudiées de manière approfondie dans notre laboratoire (voir fig. 4), relevant toutes trois de la section IV, *Khasyosilvestroides*, du même sous-genre *Eupinus*.

M.I.H., Ph. L.

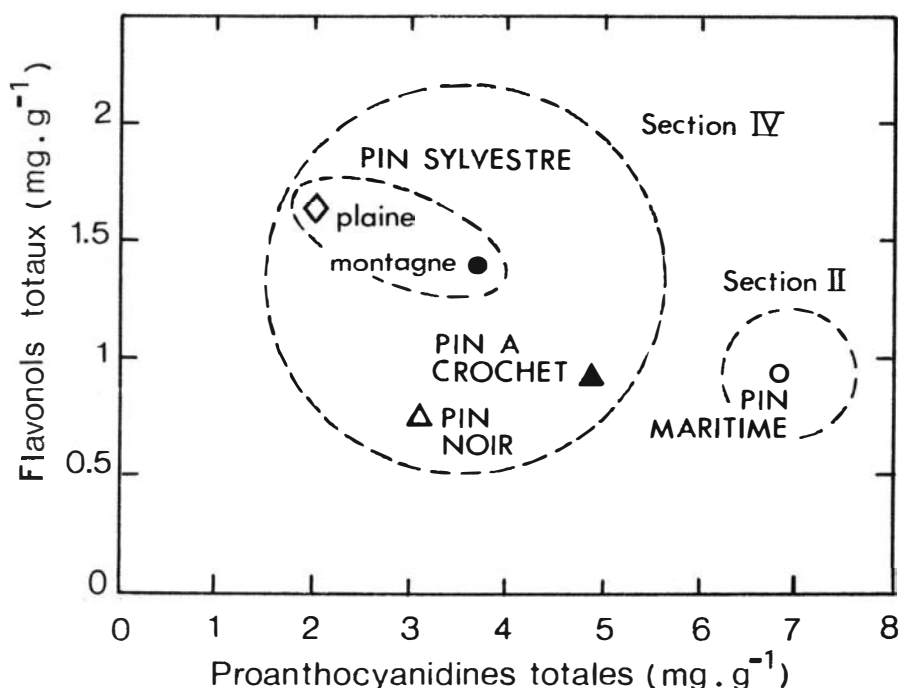


Figure 4 : Proximités flavoniques de 4 espèces (2 sections) du genre *Pinus*.

Références bibliographiques

BARADAT Ph., BERNARD-DAGAN C., FILLON C., MARPEAU A. & PAULY G., 1972 - Les terpènes du Pin maritime : aspects biologiques et génétiques. II. Hérité de la teneur en monoterpènes. *Ann. Sci. For.*, 29, 307-334.

BARADAT Ph., BERNARD-DAGAN C., PAULY G. & ZIMMERMANN-FILLON C., 1975 - Les terpènes du Pin maritime : aspects biologiques et génétiques. III. Hérité de la teneur en myrcène. *Ann. Sci. For.*, 32, 29-54.

BARADAT Ph., BERNARD-DAGAN C. & MARPEAU A., 1978 - Variation des terpènes à l'intérieur et entre populations de Pin maritime. *Proc. Conf. Biochem. Genet. For. Trees*, 7, 151-169.

BARADAT Ph. et MARPEAU-BEZARD A., 1988 - Le Pin maritime *Pinus maritima* Ait.. Biologie et Génétique des terpènes pour la connaissance et l'amélioration de l'espèce. Thèse Doct. Sci. Univ. Bordeaux-1, 1988, 444 + 66 p.

BERNARD-DAGAN C., FILLON C., PAULY G., BARADAT Ph. & ILLY G., 1971 - Les terpènes du Pin maritime : aspects biologiques et génétiques. I. Variabilité de la composition monoterpénique dans un individu, entre individus et entre provenances. *Ann. Sci. For.*, 28, 223-258.

GAUSSEN H., 1960 - Les Gymnospermes actuelles et fossiles. Fasc. VI, Chap. XI. Fac. Sci. Toulouse, 272 p.

IDRISSI-HASSANI M., 1985 - Etude de la variabilité flavonique chez deux Conifères méditerranéennes : le Pin maritime *Pinus pinaster* Ait. et le Genévrier thurifère *Juniperus thurifera* L. Thèse Doct. 3ème Cycle Univ. Lyon-I, 180 p.

JALAS J. & SUOMINEN J., 1973 - *Atlas Florae Europaeae*, 2. Gymnospermae., 17.

LARACINE-PITTET Cl. & LEBRETTON Ph., 1988 - Flavonoid variability within *Pinus sylvestris*. *Phytochem.*, 27, 2663-2666.

LAURANSON J., 1989 - Exploration de la diversité biochimique et biométrique chez les Conifères : contribution à l'étude de l'hybridation *Pinus uncinata* Ram. x *Pinus sylvestris* L., et à la connaissance du complexe infraspécifique *Pinus nigra* Arn. Thèse Doct. Univ. Lyon-I, 180 p. MINISTERE AGRICULTURE FORET, 1990 - Orientations de la Politique de Boisement/Reboisement. Doc. trav. Comm. perman. Cons. Sup. Forêt Prod. forest., annexe III, p. 2., 22 sept. 1989 et 13 mars 1990.

Remerciements

MM. M. Arbez et Ph. Baradat nous ont fourni les échantillons référencés cultivés à Pierroton (Gironde) par le Laboratoire I.N.R.A. d'Amélioration des arbres forestiers.

Résumé

La biométrie des aiguilles discrimine bien les populations landaise et marocaine du Pin maritime, mais ne sépare pas les échantillons corses et portugais. L'analyse des monoterpenes oppose encore Landes et Maroc et discrimine même généralement les diverses origines (Baradat & Marpeau-Bézard, 1988), mais la dispersion des teneurs peut rendre hasardeuse toute attribution individuelle.

Les flavonoïdes ne sont pas en eux-mêmes plus performants, bien que l'analyse des flavonols (teneur absolue et pourcentage en kaempférol) autorise des conclusions générales allant dans le même sens que précédemment. Ce n'est en fait qu'en combinant ces trois critères que l'on pourrait qualifier avec sécurité les différentes provenances d'une espèce qui, en tout état de cause, demeure relativement homogène sur l'ensemble de son aire. Cette "synsystème" biochimique et biométrique paraît donc opportune pour permettre, par exemple, une sylviculture plus rationnelle.

Summary

The biometry of the Cluster Pine's needles differentiates well the Landes and Morocco populations, but not the Corsican and Portuguese. The analysis of monoterpenes separates also Landes and Morocco, and even other origins, but the dispersion of the results makes any individual determination uncertain.

The use of flavonoids as chemotaxonomic markers is not more efficient, although the analysis of flavonols (absolute and relative values of kaempferol) leads to general conclusions in good agreement with these previously described.

In fact, only the combination of these three criteria can definitively determinate the correct origin within the species, which nevertheless remains relatively homogenous. This biochemical and biometric systematics seems useful for a more rational forestry.

Key words : Cluster Pine. Flavonoids. Chemotaxonomy.

Resumo

A biometria das agulhas discrimina bem as populações Landesas e Marroquinas do Pinheiro marítimo, mas não separa as amostras Córsegas e Portuguesas.

A análise dos monoterpenes opõe uma vez mais as Landes e Marrocos e geralmente discrimina até as diversas origens (Baradat & Mapeau-Bezard, 1988), mas a dispersão dos teores pode tornar ocasional qualquer atribuição individual.

Os flavonoides não dão por eles próprios melhores resultados, se bem que a análise dos Flavonols (teor absoluto e percentagem em Kaempferol) autorise as conclusões gerais que vão no mesmo sentido que precedentemente.

De facto é só combinando estes três critérios que podem classificar-se com segurança as diversas proveniências de uma espécie que, de todos os modos, é relativamente homogênea no conjunto da sua área.

Esta "Synsistemática" bioquímica e biométrica parece portanto oportuna para permitir, por exemplo, uma silvicultura mais racional.