



**UNIVERSITE SAAD DAHLEB - BLIDA 1-**



**Faculté des sciences de la nature et de la vie**

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

## **THÈSE DE DOCTORAT**

En Biologie

Spécialité : Biotechnologie végétale

# L'ARGANIER (*Argania spinosa* L.) : CARACTÉRISATION DES PRINCIPES ACTIFS ET DÉTERMINATION DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES

Par

**Hadjira DAKICHE**

Devant le jury composé de :

F. SAIDI	Professeur, USD Blida1	Présidente
N. SMAIL SAADOUN	Professeur, UMM Tizi Ouzou	Examinatrice
A. RIBA	Professeur, UMMB Boumerdes	Examineur
S. CHEMAT	Directeur de recherche, CRAPC	Examineur
H. BOUTOUMI	M.C.A., USD Blida1	Invité
M. KHALI	M.C.A., USD Blida1	Rapporteur
M. BENCHABANE	Professeur, USD Blida1	Co-encadreur

Blida, 2017

## RÉSUMÉ

L'exploration phytochimique des différents organes d'Arganier (*Argania spinosa* L.) tels-que les feuilles, pulpes des fruits et graines, et la détermination de leurs effets biologiques et pharmacologiques font l'objet de ce travail.

La présente étude a été divisée en deux parties consacrées à l'étude de : la feuille et la pulpe de fruits en première partie, et l'huile extraite des graines en deuxième partie.

Dans la première partie, l'étude phytochimique de l'extrait hydro-alcoolique de la feuille et la pulpe a révélé une teneur en polyphénols et flavonoïdes de  $221.393 \pm 3.359 \mu\text{g AGEq/1g}$  et  $66.856 \pm 5.697 \mu\text{g CAEq/1g}$  respectivement dans la feuille, et  $44.86 \pm 0.85 \mu\text{g AGEq/1g}$  de polyphénols et  $34.02 \pm 0.98 \text{ CAEq/1g}$  de flavonoïdes dans la pulpe. L'analyse du profil polyphénolique par UPLC-ESI-QTOF-MS a montré la présence de trois dérivés glycosidiques de Myricétine et de quatre dérivés glycosidiques de Quercétine dans la feuille, et d'un acide phénolique et deux dérivés glycosidiques de Quercétine dans la pulpe.

De plus, les tests biologiques ont indiqué un pouvoir antioxydant avec des IC50 équivalentes à  $125.595 \pm 1.868 \mu\text{g}$  (feuilles) et  $462.182 \pm 21.204 \mu\text{g}$  (pulpe). L'activité antibactérienne sur les six souches de références testées a montré que les feuilles sont dotées d'un pouvoir inhibiteur contre les bactéries Gram (+) et (-) avec des zones d'inhibition de 10 à 17 mm de diamètre. Cependant, l'extrait de pulpe a inhibé uniquement la croissance de deux espèces de *Bacillus*. Le test de cytotoxicité a dévoilé que les extraits de feuilles et de pulpe ont inhibé la prolifération de la lignée cellulaire *PC3* donnant respectivement des IC50 de 600  $\mu\text{g}$  et 1560  $\mu\text{g}$ .

La deuxième partie consacrée à l'étude physico-chimique et pharmacologique de l'huile d'Argan a révélé qu'il s'agit d'une huile non siccative riche en acides gras insaturés, l'analyse par GC-MS a dévoilé la prédominance des acides gras mono et di-insaturés (oméga-9 et oméga-6) avec un taux de 80%, d'autres acides gras saturés ont été détectés comme l'acide palmitique (14.16%) et l'acide stéarique (4.16%). La détermination du taux des polyphénols a révélé une teneur de 60 mg/kg d'huile. La caractérisation de ces composés par UPLC-ESI-QTOF-MS a dévoilé la présence de quatre acides phénoliques et d'un phénol simple.

L'évaluation des activités biologiques a dévoilé que l'huile d'Argan ne possède aucun effet antibactérien sur les souches testées en milieu solide. De plus, la détermination du pouvoir antioxydant a donné une valeur d'IC50 équivalente à 132 mg. En outre, l'évaluation des activités pharmacologiques testées *in vivo* a révélé que l'huile d'Argan est dotée d'un bon pouvoir anti-inflammatoire et un excellent effet cicatrisant avec une efficacité comparable à des produits commercialisés et sans aucun effet irritant.

**Mots clés :** Arganier (*Argania spinosa* L.), graines, feuilles, pulpe, huile, poly phénols, acide gras, pouvoir antioxydant, cytotoxique, antibactérien, anti-inflammatoire, cicatrisant.

## SUMMARY

The phytochemical exploration of the different organs of Argan (*Argania spinosa* L.) such as leaves, pulps of fruits and seeds, and determination of their biological and pharmacological effects are the subject of this work.

The present study was divided into two parts devoted to the study of: leaf and fruit pulp in the first part, and oil extracted from the seeds in the second part.

In the first part, the phytochemical study of the hydroalcoholic extract of the leaf and the pulp revealed a polyphenol and flavonoid content of  $221,393 \pm 3,359 \mu\text{g AGEq} / 1\text{g}$  and  $66,856 \pm 5,697 \mu\text{g CAEq} / 1\text{g}$  respectively in the leaf, and  $44.86 \pm 0.85 \mu\text{g AGEq} / 1\text{g}$  of polyphenols and  $34.02 \pm 0.98 \text{ CAEq} / 1\text{g}$  of flavonoids in the pulp. Analysis of the polyphenolic profile by UPLC-ESI-QTOF-MS showed the presence of three glycosidic derivatives of Myricetin and four glycosidic derivatives of Quercetin in the leaf, and a phenolic acid and two glycoside derivatives of Quercetin in the pulp.

In addition, biological tests indicated an antioxidant capacity with IC<sub>50</sub> equivalent to  $125.595 \pm 1.868 \mu\text{g}$  (leaves) and  $462.182 \pm 21.204 \mu\text{g}$  (pulp). The antibacterial activity on the six reference strains tested showed that the leaves had an inhibitory capacity against Gram (+) and (-) bacteria with zones of inhibition of 10 to 17 mm diameter. However, the pulp extract inhibited only the growth of two species of *Bacillus*. The cytotoxicity test revealed that leaf and pulp extract inhibited the proliferation of the PC3 cell line with IC<sub>50</sub> of 600  $\mu\text{g}$  and 1560  $\mu\text{g}$ , respectively.

The second part devoted to the physico-chemical and pharmacological study of Argan oil revealed that it is a non-drying oil rich in unsaturated fatty acids, analysis by GC-MS revealed the predominance of mono and di-unsaturated fatty acids (omega-9 and omega-6) with a level of 80%, other saturated fatty acids were detected like palmitic acid (14.16%) and stearic acid (%). The determination of the polyphenol content revealed a content of 60 mg / kg of oil. Characterization of these compounds by UPLC-ESI-QTOF-MS revealed the presence of four phenolic acids and one simple phenol.

The evaluation of the biological activities revealed that the Argan oil has no antibacterial effect on the strains tested in a solid medium. In addition, the determination of the antioxidant activity gave an IC<sub>50</sub> equivalent to 132 mg. Furthermore, the evaluation of the pharmacological activities tested *in vivo* revealed that the Argan oil has a good anti-inflammatory power and an excellent healing effect with efficiency comparable to commercial products and without any irritating effect.

**Key words:** Argan (*Argania spinosa* L.), seeds, leaves, pulp, oil, polyphenols, fatty acid, antioxidant power, cytotoxic, antibacterial, anti-inflammatory, wound healing.

## ملخص

الاستكشاف الكيميائي النباتي لمختلف اعضاء شجرة أرغان (أرغانيا سبينوزا L.) كالأوراق، لب الثمار والبذور، وتحديد الآثار البيولوجية والدوائية تشكل موضوع هذا البحث. وقد تم تقسيم هذه الدراسة إلى قسمين خصص لدراسة الأوراق ولب الثمار في الجزء الأول، والزيت المستخرج من البذور في الجزء الثاني.

في الجزء الأول، أظهرت الدراسة الكيميائية ان المستخلص المائي الكحولي للأوراق واللب نسبة البوليفينول والفلافونويدات تعادل  $3.359 \pm 221.393 \mu\text{g} / \text{Eq AG g}$  و  $5.697 \pm 668.56 \mu\text{g} / \text{Eq CA g}$  على التوالي في الأوراق و  $0.85359 \pm 44.86 \mu\text{g} / \text{Eq AG g}$  من مادة البوليفينول و  $0.98 \pm 34.02 \mu\text{g} / \text{Eq CA g}$  من الفلافونويد في اللب. وأظهرت التحاليل الكروماتوغرافية بتقنية UPLC-QTOF-MS لمادة البوليفينول وجود ثلاثة المشتقات غليكوزيدية للمغيسيتين وأربعة المشتقات غليكوزيدية للكيرسيتين في مستخلص الأوراق، أما في مستخلص اللب أظهرت التحاليل وجود حامض الفينول و مشتقتين غليكوزيديتين للكيرسيتين.

وبالإضافة إلى ذلك، أشارت الفحوصات المخبرية المضادة للأكسدة ان قيمة IC50 تعادل  $1.868 \pm 125.595$  ميكروغرام (الأوراق) و  $204.21 \pm 182.462$  ميكروغرام (اللب). كما أظهر اختبار النشاط المضاد للبكتيريا أن الأوراق لها قوة مثبطة ضد GRAM (+) و (-) معطية مناطق تثبيط قطرها بين 10 و 17 ملم. اما بالنسبة لمستخلص اللب فقد ثبت نمو نوعين من البكتيريا فقط، وكشف فحص السمية الخلوية أن مستخلصات الأوراق واللب تحول دون انتشار الخلية السرطانية PC3 مع إعطاء على التوالي قيمة IC50 تعادل 600 ميكروغرام و 1560 ميكروغرام.

كشف القسم الثاني من الدراسة الفيزيائية الكيميائية والدوائية لزيت الأرغان أنها غير جافة غنية بالأحماض الدهنية غير المشبعة، وكشف التحليل عن طريق GC-MS ان غالب الاحماض الدهنية هي احادية وثنائية عدم التشبع (أوميغا 9 و أوميغا 6) وذلك بنسبة 80٪، وقد تم تحديد أحماض دهنية أخرى مشبعة مثل حمض البالمتيك (14.16٪) وحمض ستيريك (4.16٪). تحديد نسبة البوليفينول في الزيت أظهرت محتوى يعادل 60 ملغ / كغ من الزيت. كما كشفت توصيف هذه المركبات بواسطة UPLC-QTOF-MS وجود 4 أحماض فينولية و الفينول بسيط.

وقد كشف تقييم الأنشطة البيولوجية أن زيت الأرغان ليس له تأثير مضاد للجراثيم على اصناف البكتيريا المختبرة في وسط صلب. علاوة على ذلك، فإن تحديد التأثير المضاد للأكسدة قدم قيمة IC50 تقدر ب 132 ملغ. بالإضافة إلى ذلك، كشف تقييم أنشطة الدوائية المختبرة على الحياء أن زيت الأرغان لديه تأثير جيد مضاد للالتهابات و قوة ممتازة في شفاء الجروح مع كفاءة مماثلة لأدوية المسوقة و بدون اي تأثير جانبي.

**كلمات المفتاح:** أركان (أرغانيا سبينوزا L.)، البذور، الأوراق، اللب، الزيت، البوليفينول، الأحماض الدهنية، مضادات الأكسدة، السمية الخلوية، مضاد للجراثيم، المضادة للالتهابات، تضميد الجروح

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord je remercie Allah, le bon Dieu, qui m'a donné la motivation, le défi, la santé et le courage pour terminer cette thèse.

Je tiens également à présenter mes sincères remerciements à Dr. KAHLI Mustapha qui a accepté de m'encadrer et qui m'a fait bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés afin de perfectionner ce travail. Je le remercie pour sa disponibilité et son encouragement durant toute la période de la réalisation de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent également :

A notre Présidente de jury, Madame SAIDI Fairouz Professeur à l'Université Saad Dahleb Blida. Nous vous remercions vivement d'avoir accepté de juger ce travail. Nous sommes particulièrement honoré de vous avoir vu assurer la Présidence de ce Jury de Thèse.

A notre Jury de Thèse :

Madame SMAIL SAADOUN Noria, Professeur à l'Université Mouloud Mammeri Tizi Ouzou. Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous avez fait par votre participation dans notre jury de soutenance. Nous vous remercions d'avoir accepté d'évaluer notre travail et nous tenons à vous assurer de notre grande estime.

Monsieur RIBA Amar, Professeur à l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdès. Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous avez fait d'être l'examineur de ce travail. Nous sommes très honoré d'avoir bénéficié de vos remarques et corrections et tenons à vous exprimer notre profonde gratitude.

Monsieur CHEMAT Smain, Directeur de recherche au centre de recherche scientifique et technique en analyses physico-chimiques CRAPC. Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous avez fait d'être examinateur de ce travail. Soyez convaincu de notre profonde gratitude pour avoir accepté de juger ce travail. Nous tenons à vous dire le plaisir que nous a procuré votre présence, en ce jour.

Monsieur BENCHAAABANE Messaoud, Professeur à l'Université Saad Dahleb Blida, pour l'honneur qu'il nous a fait d'avoir accepté d'examiner ce travail, qu'il soit assuré de notre respectueuse considération et notre profonde gratitude.

Monsieur BOUTOUMI Houcine, Docteur à L'Université Saad Dahleb Blida, pour sa modestie et ses qualités humaines. Je le remercie aussi pour l'honneur qu'il nous fait d'avoir accepté de nous accompagner dans cette dernière étape de travail

Cette thèse doit beaucoup à de nombreuses personnes, qui nous ont encouragé et nous ont soutenus durant ces cinq années. Je voudrais leur adresser ces quelques mots pour les remercier...

Je tiens tout d'abord à remercier la direction du CRAPC, en particulier Monsieur BECHARI Khaldoun directeur du CRAPC, et Madame TAIBI Nadia chef de division santé ; qui m'a permis de réaliser une partie de cette thèse au sein de ses laboratoires et qui m'a donné l'opportunité d'effectuer des stages dans des laboratoires étrangers.

Je remercie chaleureusement l'institut de recherche européen en ingrédients naturels ERINI à Grasse FRANCE, en particulier Dr GRENIER Marie-Florence et Dr. ROY Céline responsables des laboratoires ERINI de m'avoir accordé leur confiance et de m'avoir offert l'opportunité de réaliser mes travaux de thèse au sein de leur institut.

Je suis particulièrement reconnaissante envers le Dr AL-BALAS Qosay Ali, et à travers lui, envers la faculté de Pharmacie de Irbid Jordanie, ainsi que l'Université Jordanienne des Sciences et des Technologies de Irbid JUST, pour ses précieux conseils et son partage de connaissances ainsi que Dr AL-MAAYTAH Ammar pour nous avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche à la faculté de pharmacie pour son intérêt à notre travail, pour ses conseils et l'encadrement de haut niveau qu'il nous a offert. Sans oublier tous les membres de son équipe particulièrement Monsieur ABU-EL-HAIJA Ahmed Khaled qui nous a initié aux techniques de cultures cellulaires et qui était toujours disponible pour nous. Qu'il trouve ici mes sincères gratitude et remerciements.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame NEGUEB Imene, directrice du laboratoire de pharmaco-toxicologie, complexe Antibiotical SAIDAL Medea, et Dr HAMLADJI Laila laboratoire cytologie anatomie-pathologie Bou Ismail, De m'avoir soutenu et de s'être investies dans ce travail de thèse. Merci pour le partage de vos connaissances, nos nombreuses discussions, pour votre gentillesse et votre enthousiasme quotidien.

J'exprime ma profonde gratitude envers la direction des forêts de la wilaya de Mostaghanem en particulier Monsieur CHAHED Abd El-Kader, pour le partage de votre expérience, la confiance que vous m'avez accordée ainsi que votre aide et votre précieuse contribution pour la conservation et la valorisation des espèces endémiques Algériennes telle-que l'Arganier.

Nos remerciements sont aussi dirigés à tous mes enseignants, amis et collègues à l'université de Blida et au CRAPC. La liste est loin d'être exhaustive, donc je tiens à remercier l'ensemble des personnes étant intervenues durant ces cinq années, de près ou de loin, et qui m'ont permis d'avancer pas à pas.

Je termine sur des notes plus personnelles :

À mes chers parents, qu'ils trouvent ici l'expression de mon grand amour et ma plus profonde gratitude. Je vous remercie pour votre soutien vos encouragements et vos prières, mon seul souhait est d'avoir votre bénédiction et de vous voir fières de moi. De même, je remercie mes sœurs et frères, d'être tous là dans les moments de désespoir et de découragement.

Un grand merci plein d'amour et de tendresse, à mon bout de chou et mon ange « WASSIM » que Dieu le protège. Pardonne moi Simou, si je n'étais pas toujours une maman parfaite en sacrifiant du temps censé passé à tes côtés.

Enfin, un merci du fond du cœur à mon cher époux qui est toujours à mes côtés, qui m'a aidé, m'a encouragé et m'a soutenu dans les moments les plus difficiles, Je crois que je peux dire la fameuse phrase : sans toi, cette thèse n'aurait jamais vu le jour !

DAKICHE

22/02/2017

## TABLE DES MATIERES

<b>RESUME</b>	<b>2</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>ملخص</b>	<b>4</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>8</b>
<b>CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>Partie 1.1 : Généralités sur la phytothérapie</b>	
1.1.1- Introduction	11
1.1.2- Définition de la Phytothérapie	11
1.1.3- Types de Phytothérapie	12
1.1.4- Avantages de la phytothérapie	12
1.1.5- Les plantes médicinales et leurs vertus	13
<b>Partie 1.2 : Généralités sur les composés phénoliques</b>	
1.2.1- Introduction	14
1.2.2- Définition des composés phénoliques	15
1.2.3- Biosynthèse des composés phénoliques	15
1.2.3.1- Voie d'acide shikimique	15
1.2.3.2- Voie d'acide acétique	17
1.2.3.3- Voie des phénylpropanoïdes	17
1.2.4- Les principales classes de composés phénoliques	19
1.2.4.1- Les acides phénoliques	19
1.2.4.2- Les flavonoïdes	19
1.2.4.3- Les tanins	21
1.2.5- Propriétés des composés phénoliques	22

1.2.5.1- Effet antioxydant	22
1.2.5.2- Effet antiallergique	22
1.2.5.3- Effet antimicrobien	23
1.2.5.4- Effet anti-inflammatoire	23
1.2.5.5- Un espoir pour le Cancer	23
<b>Partie 1.3 : Généralités sur les huiles végétales</b>	
1.3.1- Introduction	24
1.3.2- Définition de l'huile végétale	24
1.3.3- Composition chimique des huiles végétales	25
1.3.3.1- Les constituants majeurs	25
1.3.3.2- Les constituants mineurs	26
1.3.4- Classification des huiles végétales	27
1.3.5- Intérêts des huiles végétales	28
<b>Partie 1.4 : Généralités sur l'Arganier <i>Argania spinosa</i> L.</b>	
1.4.1- Histoire de l'Arganier	29
1.4.2- Répartition géographique	30
1.4.3- Ecologie de l'Arganier	31
1.4.3.1- Conditions climatiques	31
1.4.3.2- Conditions édaphiques	31
1.4.4- Reproduction de l'Arganier	32
1.4.5- Etude taxonomique	32
1.4.6- Description botanique	33
1.4.7- Utilisation de l'Arganier	35
1.4.8- Composition chimique de l'Arganier	36
1.4.8.1- Feuille	36
1.4.8.2- Bois	37
1.4.8.3- Pulpe	37
1.4.8.4- Tourteau	38
1.4.8.5- Huile	39
<b>CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES</b>	
<b>Partie 2.1 : Feuille et pulpe</b>	
2.1.1- Matériel	42
2.1.1.1- Matériel biologique	42



2.1.1.2- Matériel non biologique	43
2.1.2- Méthodes	43
2.1.2.1- Préparation des feuilles et pulpes d' <i>Argania spinosa</i> L. Skeels	43
2.1.2.2- Extraction par solvant assistée par ultrason	44
2.1.2.3- Etude phytochimique	45
2.1.2.3.1- Dosage des polyphénols totaux	45
2.1.2.3.2- Dosage des flavonoïdes totaux	46
2.1.2.3.3- Caractérisation des polyphénols par UHPLC – QTOF–MS	47
2.1.2.4- Etude des activités biologiques et pharmacologiques	52
2.1.2.4.1- Activité anti-oxydante	52
2.1.2.4.2- Détermination de l'activité antibactérienne	54
2.1.2.4.3- Détermination de l'activité anticancéreuse	56
2.1.2.5- Etude statistique	56
<b>Partie 2.2 : Etude de l'huile d'Argan</b>	
2.2.1- Matériel	59
2.2.1.1- Matériel biologique	59
2.2.1.2- Matériel non biologique	59
2.2.2- Méthodes	60
2.2.2.1- Préparation des amandons d' <i>Argania spinosa</i> Skeels	61
2.2.2.2- Extraction de l'huile d'Argan par solvant assistée par ultrason	61
2.2.2.3- Etude phytochimique de l'huile d'Argan	62
2.2.2.3.1- Indices physico-chimique de l'huile d'Argan	62
2.2.2.3.2- Caractérisation des acides gras par la méthode GC–MS	66
2.2.2.3.3- Dosage des polyphénols totaux dans l'huile d'Argan	68
2.2.2.3.4- Caractérisation des polyphénols par UHPLC – QTOF–MS	68
2.2.2.4- Etude pharmaco-toxicologique	70
2.2.2.4.1- Activité antioxydante	70
2.2.2.4.2- Activité antibactérienne	70
2.2.2.4.3- Activité anti-inflammatoire	70
2.2.2.4.4- Tolérance cutanée	72
2.2.2.4.5- Activité cicatrisante	74
2.2.2.5- Etude statistique	78

## **CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION**

### **Partie 3.1 : Feuille et pulpe**

3.1.1- Résultats	80
3.1.1.1- Rendement d'extraction par solvant assistée par ultrason	80
3.1.1.2- Etude phytochimique	81
3.1.1.2.1- Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes	81
3.1.1.2.2- Caractérisation des polyphénols par UHPLC – QTOF–MS	82
3.1.1.3- Etude des activités biologiques et pharmacologiques	88
3.1.1.3.1- Activité antioxydante	88
3.1.1.3.2- Activité antibactérienne	90
3.1.1.3.3- Activité cytotoxique	92
3.1.2- Discussion	95

### **Partie 3.2 : Huile d'Argan**

3.2.1- Résultats	99
3.2.1.1- Extraction et rendement	99
3.2.1.2- Identification des caractéristiques de la matière première	99
3.2.1.3- Indices physico-chimiques de l'huile d'Argan	99
3.2.1.4- Etude de la composition chimique de l'huile d' <i>A. spinosa</i> L.	100
3.2.1.4.1- Caractérisation des acides gras par la méthode GC–MS	100
3.2.1.4.2- Dosage des polyphénols totaux dans l'huile d'Argan	101
3.2.1.4.3- Caractérisation des polyphénols par UHPLC – QTOF–MS	102
3.2.1.5- Etude pharmaco-toxicologique	104
3.2.1.5.1- Activité antioxydante	104
3.2.1.5.2- Activité antibactérienne	105
3.2.1.5.3- Activité anti-inflammatoire	106
3.2.1.5.4- Tolérance cutanée	107
3.2.1.5.5- Activité cicatrisante	108
3.2.2- Discussion	115

## **CONCLUSION GENERALE** 121

### **APPENDICE**

A. Liste des abréviations	125
B. Matériel non biologique	126
C. Étude statistique	127

## REFERENCES

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

<b>Figure 1.1</b> : Biosynthèse des composés phénoliques par la voie d'acide shikimique.	<b>16</b>
<b>Figure 1.2</b> : Biosynthèses des flavonoïdes par voie d'acide acétique.	<b>18</b>
<b>Figure 1.3</b> : Principaux composés phénoliques des végétaux.	<b>21</b>
<b>Figure 1.4</b> : Structure du glycérol et des triglycérides.	<b>25</b>
<b>Figure 1.5</b> : Exemples d'acide gras saturé, mono-insaturé et poly-insaturé.	<b>26</b>
<b>Figure 1.6</b> : Aire de répartition de l'Arganier au Maroc et en Algérie.	<b>30</b>
<b>Figure 1.7</b> : Arbre d' <i>Argania spinosa</i> L.	<b>33</b>
<b>Figure 1.8</b> : Système racinaire de l'Arganier.	<b>34</b>
<b>Figure 1.9</b> : Feuille d'Arganier.	<b>34</b>
<b>Figure 1.10</b> : Fleur d'Arganier.	<b>34</b>
<b>Figure 1.11</b> : Rameau d'Arganier et fruits a maturité.	<b>35</b>
<b>Figure 1.12</b> : Structure chimique des flavonols isolés des feuilles d'Arganier.	<b>37</b>
<b>Figure 1.13</b> : Structure chimique des saponosides du bois de l'Arganier.	<b>37</b>
<b>Figure 1.14</b> : Structure chimique des Saponosides du tourteau de l'Arganier.	<b>38</b>
<b>Figure 1.15</b> : Structure chimique des tocophérols, des polyphénols et des principaux stérols de l'huile d'Argan ( <i>Argania spinosa</i> L.).	<b>40</b>
<b>Figure 2.1</b> : Feuilles et pulpes de fruits d' <i>Argania spinosa</i> L.	<b>43</b>
<b>Figure 2.2</b> : Principe de fonctionnement de la chromatographie phase liquide.	<b>48</b>
<b>Figure 2.3</b> : Source électrospray.	<b>49</b>
<b>Figure 2.4</b> : Configuration de l'analyseur à temps de vol XEVO G2 QToF Waters.	<b>50</b>
<b>Figure 2.5</b> : Fruit, noyau, amande et huile d' <i>Argania spinosa</i> L.	<b>60</b>
<b>Figure 2.6</b> : Test de l'activité anti-inflammatoire de l'huile d' <i>Argania spinosa</i> L. sur l'oreille de souris.	<b>71</b>
<b>Figure 2.7</b> : Test d'irritation primaire cutanée sur peaux non scarifiée et scarifiée.	<b>73</b>
<b>Figure 2.8</b> : Test de cicatrisation sur incisions linéaires.	<b>75</b>
<b>Figure 2.9</b> : Test de cicatrisation sur excisions circulaires.	<b>76</b>
<b>Figure 3.1</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour dosage des polyphénols.	<b>81</b>
<b>Figure 3.2</b> : Courbe d'étalonnage de la catéchine pour dosage des flavonoïdes.	<b>81</b>
<b>Figure 3.3</b> : Chromatogramme UPLC-PDA à 280 nm (a), chromatogramme UPLC-ES+ en mode d'ionisation positive (b), et chromatogramme UPLC-ES- en mode d'ionisation négative (c) de l'extrait méthanolique de feuilles d' <i>A. spinosa</i> L.	<b>83</b>
<b>Figure 3.4</b> : Chromatogramme UPLC-PDA à 280 nm (a), chromatogramme UPLC-ES+ en mode d'ionisation positive (b), et chromatogramme UPLC-ES- en mode d'ionisation négative (c) de l'extrait méthanolique de pulpe d' <i>A. spinosa</i> L.	<b>86</b>
<b>Figure 3.5</b> : Courbe représentative des pourcentages de réduction du radical libre DPPH par l'extrait de feuille d' <i>A. spinosa</i> L.	<b>88</b>

<b>Figure 3.6</b> : Courbe représentative des pourcentages de réduction du radical libre DPPH par l'extrait de pulpe d' <i>A. spinosa</i> L.	<b>88</b>
<b>Figure 3.7</b> : Courbe représentative des pourcentages de réduction du radical libre DPPH par l'antioxydant de référence TROLOX.	<b>89</b>
<b>Figure 3.8</b> : Courbe représentative des pourcentages de réduction du radical libre DPPH par l'antioxydant de référence Acide ascorbique.	<b>89</b>
<b>Figure 3.9</b> : Antibiogramme sur milieu solide de l'extrait de feuilles d' <i>Aspinosa</i>	<b>91</b>
<b>Figure 3.10</b> : Antibiogramme sur milieu solide de l'extrait de pulpe de fruits d' <i>Argania spinosa</i> L.	<b>92</b>
<b>Figure 3.11</b> : Activité cytotoxique de l'extrait de feuilles d' <i>Argania spinosa</i> L. par le test MTT.	<b>94</b>
<b>Figure 3.12</b> : Activité cytotoxique de l'extrait de pulpe d' <i>Argania spinosa</i> L. par le test MTT.	<b>94</b>
<b>Figure 3.13</b> : Chromatogramme GC-MS de la composition en acide gras méthyle ester de l'huile d' <i>A. spinosa</i> L.	<b>101</b>
<b>Figure 3.14</b> : Chromatogramme UPLC-PDA à 280 nm (a) et chromatogramme UPLC-ES+ en mode d'ionisation positive (b) de l'extrait phénolique de l'huile d' <i>A. spinosa</i>	<b>L102</b>
<b>Figure 3.15</b> : Courbe des pourcentages de réduction du radical libre DPPH par l'huile d' <i>A. spinosa</i> L.	<b>104</b>
<b>Figure 3.16</b> : Antibiogramme sur milieu solide de l'huile de graines d' <i>A. spinosa</i> L.	<b>105</b>
<b>Figure 3.17</b> : Pourcentage de réduction d'inflammations traitées par Indometacine <sup>®</sup> , huile d' <i>A. spinosa</i> L. et eau physiologique (Placebo).	<b>106</b>
<b>Figure 3.18</b> : Scores de l'évolution de la cicatrisation des incisions linéaires selon l'outil d'évaluation de blessure de Bates-Jensen (Bates–Jensen Wound Assessment Tool).	<b>109</b>
<b>Figure 3.19</b> : Évolution du processus de cicatrisation des incisions linéaires.	<b>109</b>
<b>Figure 3.20</b> : Examen microscopique des coupes histologiques des incisions linéaires cicatrisées après 12 jours de traitement au grossissement X100 et X400.	<b>110</b>
<b>Figure 3.21</b> : Surfaces des excisions circulaires.	<b>112</b>
<b>Figure 3.22</b> : Évolution du processus de cicatrisation des excisions circulaires.	<b>112</b>
<b>Figure 3.23</b> : Pourcentage de réduction des surfaces des excisions circulaires après 6 et 12 jours de traitement.	<b>113</b>
<b>Figure 3.24</b> : Examen microscopique des coupes histologiques des excisions circulaires cicatrisées après 12 jours de traitement au grossissement X100 et X400.	<b>114</b>
<b>Tableau 2.1</b> : Échelle numérique utilisée pour le calcul du l'I.P.C.	<b>74</b>
<b>Tableau 2.2</b> : Classification de DRAIZE des produits selon leur I.P.C.	<b>74</b>
<b>Tableau 2.3</b> : Outil d'évaluation de blessure de Bates-Jensen (BWAT, Bates–Jensen Wound Assessment Tool).	<b>76</b>
<b>Tableau 3.1</b> : Teneurs en extraits alcooliques dans la feuille et la pulpe d' <i>Argania spinosa</i> L.	<b>80</b>
<b>Tableau 3.2</b> : Teneur en composés phénoliques et flavonoïdes dans les extraits de feuille et pulpe d' <i>Argania spinosa</i> L.	<b>82</b>
<b>Tableau 3.3</b> : Résultats des spectres de masse en modes positif et négatif des composées phénoliques identifiés par analyse UPLC–PDA-ESI-QTOF-MS dans l'extrait	

méthanolique de feuilles d' <i>Argania spinosa</i> L. La colonne de références rapporte les travaux antérieurs sur les métabolites dans différentes plantes.	84
<b>Tableau 3.4 :</b> Résultats des spectres de masse en modes positif et négatif des composés phénoliques identifiés par analyse UPLC–PDA-ESI-QTOF-MS dans l'extrait méthanolique de pulpe d' <i>Argania spinosa</i> L. La colonne de références rapporte les travaux antérieurs sur les métabolites dans différentes plantes.	87
<b>Tableau 3.5:</b> Les valeurs IC <sub>50</sub> de l'extrait de feuilles d' <i>Argania spinosa</i> L., Trolox et Acide Ascorbique.	89
<b>Tableau 3.6:</b> Activité antibactérienne des extraits de feuilles et de pulpe d' <i>Argania spinosa</i> L. par la méthode de diffusion sur milieu solide.	90
<b>Tableau 3.7 :</b> Pourcentage d'inhibition de la croissance de cellules tumorales PC3 par les extraits de feuilles et de pulpe de fruits d' <i>Argania spinosa</i> L.	93
<b>Tableau 3.8 :</b> Caractères morphologiques et organoleptiques de l'huile d'Argan.	99
<b>Tableau 3.9 :</b> Caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'Argan.	100
<b>Tableau 3.10:</b> Résultats d'analyse des acides gras de l'huile grains d'argan par GC-MS.	100
<b>Tableau 3.11 :</b> Résultats des spectres de masse en modes positif des composés phénoliques obtenus par extraction liquide-liquide de l'huile d' <i>Argania spinosa</i> L. et identifiés par analyse UPLC–PDA-ESI-QTOF-MS.	103
<b>Tableau 3.12:</b> Les valeurs IC <sub>50</sub> de l'extrait de l'huile d' <i>Argania spinosa</i> L., Trolox et Acide Ascorbique.	104
<b>Tableau 3.13 :</b> Activité antibactérienne de l'huile de graines d' <i>Argania spinosa</i> L. par la méthode de diffusion sur milieu solide.	105
<b>Tableau 3.14 :</b> Moyennes des pourcentages de réduction de l'inflammation des œdèmes traités par l'Indométacine <sup>®</sup> , huile d' <i>Argania spinosa</i> L. et eau physiologique.	106
<b>Tableau 3.15 :</b> Valeurs numériques de cotation des érythèmes et œdèmes enregistrées sur les flancs scarifiés et non scarifiée de lapins.	107
<b>Tableau 3.16 :</b> Moyennes des scores de l'évolution du processus de cicatrisation des incisions chez les souris selon l'outil d'évaluation de blessure de Bates-Jensen aux jours 0, 6 et 12.	108
<b>Tableau 3.17 :</b> Moyennes des surfaces des excisions circulaires calculées planimétriquement en mm <sup>2</sup> aux jours 0, 6 et 12.	111
<b>Tableau 3.18 :</b> Moyennes des pourcentages de contraction des surfaces des excisions circulaires aux jours 0, 6 et 12.	113

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

## INTRODUCTION GENERALE

L'Algérie est considéré parmi les pays connus pour leur diversité taxonomique vue sa position biogéographique privilégiée et son étendue entre la Méditerranée et l'Afrique subsaharienne. La flore algérienne est potentiellement riche en plantes médicinales et aromatiques, dont beaucoup d'espèces endémiques [1]. Ces espèces constituent pour notre pays une véritable richesse qui doit être préservée et valorisée dans le but de la recherche de nouveaux métabolites et principes actifs [2]. Malheureusement, il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents thérapeutiques de ces plantes. D'où notre choix d'une espèce endémique du sud ouest de l'Algérie appelée *Argania spinosa* L. (Skeels).

*Argania spinosa* L. n'a plus besoin d'être présentée. C'est un arbre aux multiples usages qui joue un rôle socio-économique et environnemental très important dans le sud Marocain où il constitue la deuxième essence forestière avec plus de 800 000 ha. Mentionné en 1219 par Ibn El-Beïthar dans son « Traité des simples » [3], puis en 1510 par Jean-Léon L'Africain dans sa « Description de l'Afrique » [4], il est considéré comme un arbre spécifiquement Marocain, malgré qu'il en existe en Algérie. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés spécialement à cette espèce endémique, afin de démontrer que cette plante est bel et bien présente dans notre pays et avec une aire de répartition qui ne cesse d'augmenter grâce aux efforts des spécialistes.

Connue aussi sous le nom d'arbre d'Arganier, longtemps utilisé au Maghreb et précisément au Maroc dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des diverses maladies, qui aurait, dit-on, des vertus miraculeuses grâce aux propriétés nutritionnelle, cosmétique et thérapeutique de l'huile si précieuse extraite à partir des graines de son fruit [5].

Ces dernières années, l'huile extraite du fruit d'Arganier dite huile d'Argan connaît un regain d'intérêt très important dans l'industrie cosmétique grâce à sa composition chimique riche qui la rend spéciale et la classe parmi les soins naturels les plus efficaces pour la peau et les cheveux [6]. Cette huile est très utilisée, industrialisée et surtout commercialisée à



l'échelle nationale et internationale au Maroc, reste une source économique inexploitée voire négligée en Algérie.

Plusieurs travaux scientifiques ont porté sur l'Arganier du Maroc tels que les travaux de Farine et *al.* (1984) [7], Maurin (1992) [8], Charrouf et *al.* (2007) [9] et beaucoup d'autres, par contre très peu d'études ont été consacrées à l'Arganier Algérien.

C'est dans ce contexte que nous sommes intéressés à l'étude de la composition chimique non seulement de l'huile d'Argan mais aussi des sous-produits d'Arganier tels-que la feuille et la pulpe du fruit, exploitées uniquement en alimentation de bétail. L'utilisation très limitée de ces sous-produits représente une vraie perte économique puisqu'ils offrent une matière première prometteuse pour l'extraction des molécules bioactives.

Notre étude avait aussi pour objectif principal, l'utilisation de nouvelles méthodes d'extraction et d'analyse, et la détermination de nouvelles propriétés pharmacologiques des extraits étudiés.

Ce travail s'inscrit donc dans le cadre de la recherche sur les plantes médicinales et a pour modeste ambition de promouvoir l'espèce *Argania spinosa* L. Algérienne et de participer à l'enrichissement des connaissances sur cette plante qui reste à l'heure actuelle encore méconnue.

Pour cela, cette thèse est scindée en trois chapitres :

- Le premier chapitre regroupe un ensemble de données bibliographiques de base, divisées en quatre parties portant sur la phytothérapie, les métabolites secondaires et les huiles végétales en général et sur l'Arganier en particulier.
- Le deuxième chapitre de cette thèse est consacré au matériel utilisé et aux différentes méthodes et techniques utilisées au cours de notre travail expérimental. Ce chapitre est partagé en deux parties la première est consacrée à l'étude des feuilles et la pulpe des fruits d'Arganier et la deuxième pour l'étude de l'huile d'Argan.
- Le troisième chapitre divisé en deux parties, feuille et pulpe en première partie et huile en deuxième partie, expose l'ensemble des résultats obtenus ainsi que leur interprétation avec à la fin de chaque partie une discussion générale.

Et nous terminons par une conclusion générale.

**CHAPITRE 1**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **Partie 1.1**

### **Généralités sur la phytothérapie**

#### **1.1.1- Introduction :**

Depuis la période préhistorique, l'utilisation des plantes faisaient partie de la vie quotidienne de nos ancêtres. L'homme en recherchant dans son environnement découvrait très tôt que ces plantes ne représentaient pas uniquement une source d'alimentation mais pouvaient également soulager voire guérir certaines maladies.

Cette médecine dite traditionnelle est à l'heure actuelle toujours très largement utilisée dans les pays du Sud, où elle génère par ailleurs des revenus non négligeables [10, 11]. En effet, sur les 300 000 espèces végétales recensées sur la planète plus de 200 000 espèces vivent dans les pays tropicaux ont des vertus médicinales [12].

Selon OMS (Organisation Mondiale de la Santé) plus de 80% de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé [13], elle l'a défini comme « l'ensemble des connaissances, compétences et pratiques basées sur les théories, croyances et expériences auxquelles différentes cultures ont recours pour entretenir la santé ainsi que pour prévenir, diagnostiquer, soulager ou soigner des maladies physiques et mentales » [14].

Aujourd'hui, il y a un net regain d'intérêt vis-à-vis de cette médecine dite phytothérapie. Les populations des pays riches et pauvres l'utilisent respectivement malgré les multiples progrès de la médecine moderne.

#### **1.1.2- Définition de la Phytothérapie :**

La phytothérapie est l'utilisation des plantes pour la prévention ou le traitement d'une pathologie, ces plantes sont traditionnellement reconnues comme ayant des vertus thérapeutiques. Elle consiste à soigner des maladies, souvent des petits maux, à l'aide de plantes en évitant les dangers et les effets secondaires de l'allopathie. Elle peut aussi être utilisée, dans le cas de pathologies trop lourdes, pour soulager le patient des douleurs qu'elles peuvent engendrer en réduisant donc la prise de médicaments synthétisés [15].

### 1.1.3- Types de Phytothérapie :

Il existe plusieurs types de phytothérapie [15]:

➤ **Aromathérapie** : Utilise les essences des plantes aussi appelées huiles essentielles. Ces substances aromatiques sont extraites par distillation. Il faut cependant utiliser l'aromathérapie avec précaution et respecter les doses prescrites. L'utilisation la plus fréquente est l'application par voie cutanée.

➤ **Gemmothérapie** : Consiste à utiliser les extraits alcooliques et glycerinés de jeunes pousses de végétaux ou de bourgeons. Ces extraits sont alors dilués au dixième pour pouvoir être utilisés en tant que plantes médicinales.

➤ **Herboristerie** : Ce type de phytothérapie est le plus classique et le plus ancien. Elle se sert de la plante fraîche ou séchée, soit entière, soit en partie. Une préparation d'herboristerie repose sur des méthodes simples, le plus souvent avec de l'eau comme les infusions, les décoctions ou les macérations. Le principal avantage est que cela permet de préserver les principes actifs.

➤ **Homéopathie** : A recours aux plantes mais pas uniquement. On peut aussi trouver, en plus petites quantités, des produits d'origines animale ou minérale. Les plantes fraîches sont utilisées après une macération alcoolique.

➤ **Phytothérapie pharmaceutique** : Utilise des produits d'origine végétale, obtenus après extraction et par dilution. Cette phytothérapie consiste à se servir de doses suffisamment importantes de végétaux pour avoir une action soutenue et rapide. Les concentrations sont alors élevées, parfois proches de la limite assurant que le médicament n'est pas toxique pour l'organisme.

### 1.1.4- Avantages de la phytothérapie :

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, cette dernière provoque souvent des effets néfastes. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques contrairement à la phytothérapie qui ne présente quasi pas d'effets indésirables [16].

Les plantes utilisées en phytothérapie sont testées scientifiquement, ainsi, les remèdes sont plus efficaces mais aussi sans danger. Le corps humain est mieux adapté à un traitement à base de plantes qu'à une thérapie essentiellement chimique.

Aujourd'hui, la médecine par les plantes connaît un renouveau exceptionnel en occident, spécialement dans le traitement des infections graves, car l'efficacité des médicaments tels

que les antibiotiques décroît, les bactéries se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus [16].

### **1.1.5- Les plantes médicinales et leurs vertus :**

La définition d'une plante médicinale est très simple. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [13].

Ces plantes possèdent un ou des principes actifs très puissants qui lui confèrent ses propriétés thérapeutiques, Ces composants sont souvent en faible quantité dans la plante : ils représentent seulement quelques pour-cent du poids total de celle-ci. Ils se trouvent soit dans les racines, l'écorce, les feuilles, les sommités fleuries, les fruits, la résine [13].

Les parties utilisées de la plante varient d'une espèce à l'autre, ou pour une même plante selon l'effet désiré, en fonction de ces vertus. On peut les utiliser par exemple [17] :

- Comme purifiant, on peut utiliser l'arbre à thé, la bergamote, la cannelle, le clou de girofle, l'eucalyptus, la lavande officinale, le niaouli, le romarin ou le thym.
- Comme soins de la peau, on retrouve les vertus nécessaires dans l'arbre à thé, la camomille romaine, le cèdre Atlas, le citron, le jasmin, le laurier noble, le myrte, le niaouli, la sauge sclérée ou le thym.
- Comme antistress, on peut alors se soigner avec la bergamote, la camomille romaine, le citron, l'estragon, le jasmin, la lavande, le lavandin, la mandarine rouge, le néroli, la verveine exotique ou le vétiver.
- Dans le cas de problèmes respiratoires, on peut alors se servir de l'arbre à thé, de la feuille de la cannelle de Ceylan, de l'eucalyptus, du niaouli, du pin sylvestre ou du romarin.
- Dans le cas de problèmes circulatoires, l'écorce de cannelle de Ceylan, le cèdre atlas, le citron, le cyprès, la sauge sclérée ou le vétiver peuvent alors être prescrits.
- Pour les soucis articulaires ou musculaires, on peut les soigner avec la gaulthérie, le laurier noble, la lavande aspic, le lavandin super, la menthe poivrée ou le patchouli.
- Pour faciliter la digestion, on peut se servir de l'estragon, la mandarine rouge, la marjolaine à coquilles ou l'orange douce.

## **Partie 1.2**

### **Généralités sur les composés phénoliques**

#### **1.2.1- Introduction :**

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à cote des métabolites primaires classiques (glucides, protides, lipides, acides nucléiques) ils accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais qui représente une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [18, 19].

Les métabolites primaires sont directement impliqués dans la croissance, le développement et la reproduction normale de toutes les plantes, par opposition les métabolites dits « secondaires » diffèrent en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires [19].

La diversité des espèces utilisées et des métabolites secondaires déjà isolés laisse présager de l'ampleur de ce qui reste à découvrir. On considère effectivement que, jusqu'à ce jour, moins de 10 % des espèces de végétaux supérieurs qui peuplent actuellement la planète ont été explorées pour leurs propriétés chimiques et biologiques [20].

Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires produits par les plantes, classés selon leur appartenance chimique en trois classes en l'occurrence : les alcaloïdes, les terpènes et les composés phénoliques [21].

Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés et possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine [22, 23]. Mais celles qui prennent

aujourd'hui une importance croissante, c'est la classe des composés phénoliques notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique [18].

### 1.2.2- Définition des composés phénoliques :

Le terme *polyphénol* a été introduit en 1980, en remplacement au terme ancien de Tanin végétal (vegetal tannin). Cette classe chimique de métabolites secondaires constitue une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal rencontrées dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits.

L'expression de « composés phénoliques » est utilisée pour toutes substances chimiques possédant dans sa structure un ou plusieurs cycles benzéniques, portant un ou plusieurs groupements hydroxyles [24].

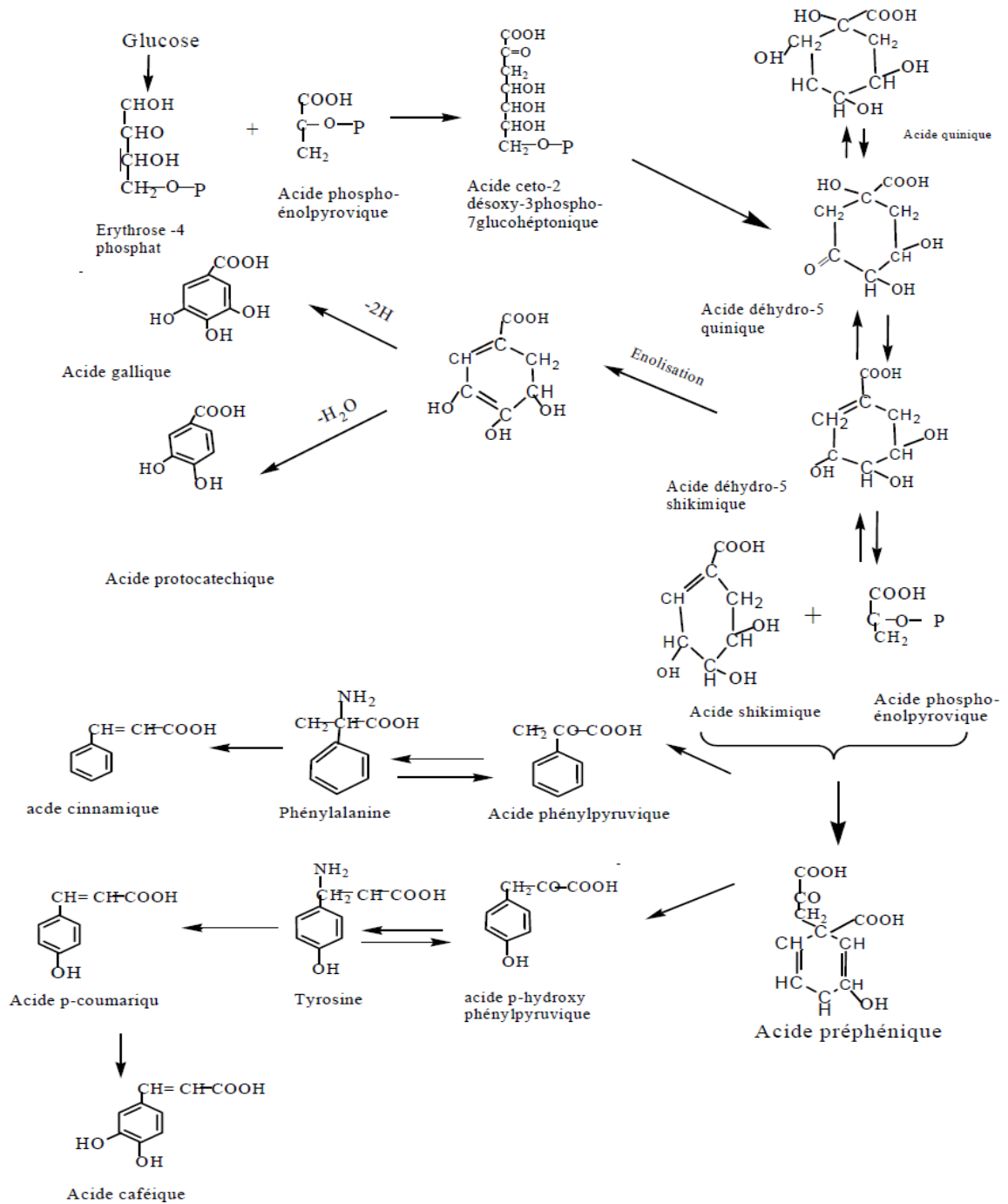
Les polyphénols présentent une structure très variée. Il existe des molécules de structure simple, de forme phénolique avec un cycle benzénique sur lequel sont fixés des groupements hydroxyles comme les acides phénoliques. Il existe également des composés plus complexes qui sont les flavonoïdes et les anthocyanes. Leur structure est toujours constituée de par des groupements OH [25].

### 1.2.3- Biosynthèse des composés phénoliques :

La biosynthèse des polyphénols permet la formation d'une grande diversité de molécules qui sont spécifiques d'une espèce de plante, d'un organe ou d'un tissu particulière. Selon Harborne, 1993 [26] on peut distinguer les différentes voies de biosynthèses :

#### 1.2.3.1- Voie d'acide shikimique :

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont à l'origine de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux. Ces acides aminés sont formés à partir des sucres simples issus du métabolisme primaire par la voie de l'acide shikimique. La désamination de la phénylalanine donne naissance au précurseur direct des phénols : l'acide cinnamique (Figure 1.1).



**Figure 1.1 :** Biosynthèse des composés phénoliques par la voie d'acide shikimique [26].



### **1.2.3.2- Voie d'acide acétique :**

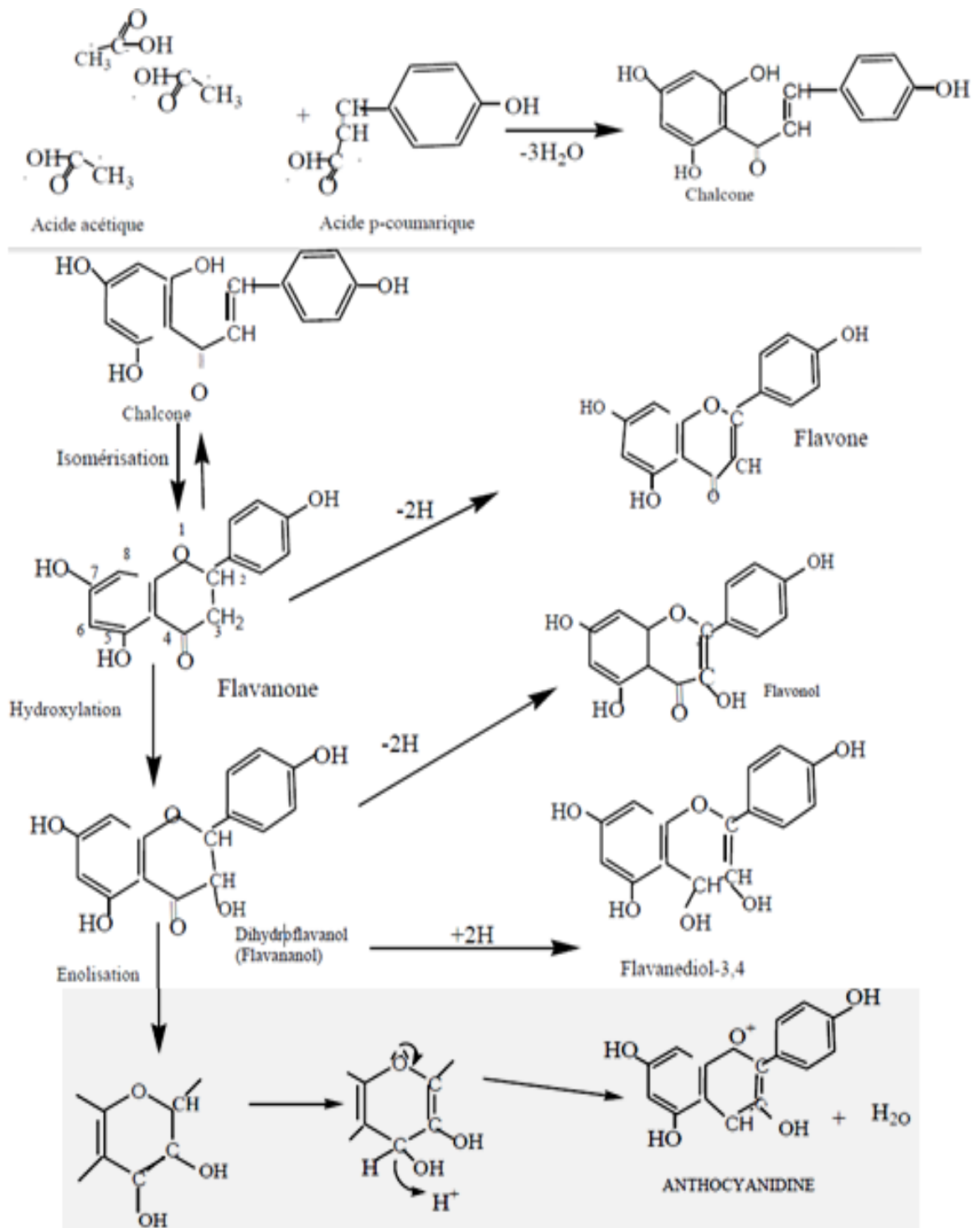
Cette voie donne naissance aux flavonoïdes dont le squelette de base a une double origine [26]:

- 3 molécules d'acétyl COA (cycle A).
- Une molécule de p-coumaryl COA (cycle B et l'hétérocycle C)

La condensation de ces unités donne naissance aux flavonoïdes et particulièrement aux pigments anthocyanes et flavonols ou encore certains monomères de types flavonols dont la polymérisation conduit aux tanins condensés. La figure 1.2 représente les différentes étapes de formation des flavonoïdes par voie acétique.

### **1.2.3.3- Voie des phénylpropanoïdes :**

Cette séquence biosynthétique permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques : acide coumarique, caféique, férulique et sinapique qui se présentent généralement sous forme d'ester ou de glucosides [26].



**Figure 1.2 :** Biosynthèses des flavonoïdes par voie d'acide acétique [26].

#### 1.2.4- Les principales classes de composés phénoliques :

La classe des composés phénoliques renferme plus de 8000 composés. Ils sont divisés en plusieurs catégories qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation et de méthylation, etc.). Enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, etc.) [27, 28, 29].

Trois principales classes sont largement répandues :

- Les acides phénoliques.
- Les flavonoïdes.
- Les lignanes et tanins obtenus par polymérisation des flavonoïdes.

##### 1.2.4.1- Les acides phénoliques :

Les acides phénoliques représentent les formes phénoliques les plus simples avec des structures chimiques allant de simple phénol en C6. Ce sont des dérivés d'acide benzoïque et acide cinnamique [30].

➤ **Acides hydroxybenzoïques :** Ils sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C6 - C1. Ils sont particulièrement représentés chez les gymnospermes et les angiospermes. Les acides hydroxybenzoïques (p-hydroxybenzoïques, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicyclique, gentsique, etc.) [23, 30].

Les acides hydroxybenzoïques existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides [21, 28].

➤ **Acides hydroxycinnamiques :** Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C6 – C3) dérive de celle de l'acide cinnamique grâce à des substitutions au niveau du cycle aromatique [31, 32].

Les molécules de base de la série hydroxycinnamiques sont l'acide p-coumarique (et ses isomères, les acides o- et m-coumariques), l'acide caféique, l'acide férulique et son dérivé 5-hydroxyle et enfin l'acide sinapique [28].

##### 1.2.4.2- Les flavonoïdes :

L'ensemble des flavonoïdes ont une structure générale en C15 (C6-C3-C6), il comprend à lui seul plusieurs milliers de molécules regroupées en plus de dix classes [33]. Ces

composés existent sous forme d'hétérosides [34] dont certains ont une très grande importance biologique et technologique: les anthocyanes pigments rouge ou bleu, les flavones et les flavonols de couleur crème ou jaune clair, les flavanes dont les produits de condensation sont à l'origine d'un groupe important de tanins et les isoflavones qui jouent un rôle dans la santé humaine [28, 35] (Figure 1.3).

➤ **Les chalcones et aurones:** gardent la structure du tétra ou trihydroxychalcone, le noyau central de la molécule n'est pas totalement cyclisé ou se présente sous forme d'un cycle ne présentant que cinq sommets [34]. Les aurones sont caractérisés par un structure de 2- benzylidène coumarone [21, 36].

➤ **Les flavanones:** dérivent des précédentes par une cyclisation au centre du squelette, d'où un hétérocycle. Ils se caractérisent par l'absence de la double liaison entre C2 et C3 par la présence des centres d'asymétrie [21].

➤ **Les flavones:** dérivent des flavanones par une oxydation qui introduit une seconde double liaison dans l'hétérocycle [34]. Dans plus de 90%, le cycle A est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et C7 [21].

➤ **Les flavonols:** se différencient des flavones par la présence d'un OH en C3. Chez les flavonols la position 3 de l'hétérocycle est toujours glycosylée, fréquemment la position 7 mais jamais la position 5 du cycle A ([31, 34].

➤ **Les isoflavones:** dérivent aussi des flavanones mais outre une oxydation centrale, il y a transposition du cycle latéral du C2 au C4 de l'hétérocycle [21, 34].

➤ **Les anthocyanes:** le terme « anthocyanes » a une valeur générale désignant, soit les formes naturelles glycosylées, soit les molécules non glycosylées [28]. Chez les anthocyanes, en plus de la position 3 qui est toujours glycosylée, il y a aussi préférentiellement la position 5 qui est glycosylée.

La partie phénolique seule est désigné sous le nom d'anthocyanidine, alors que l'hétéroside (molécule phénolique + sucre associé) est appelé anthocyanine [21, 28].

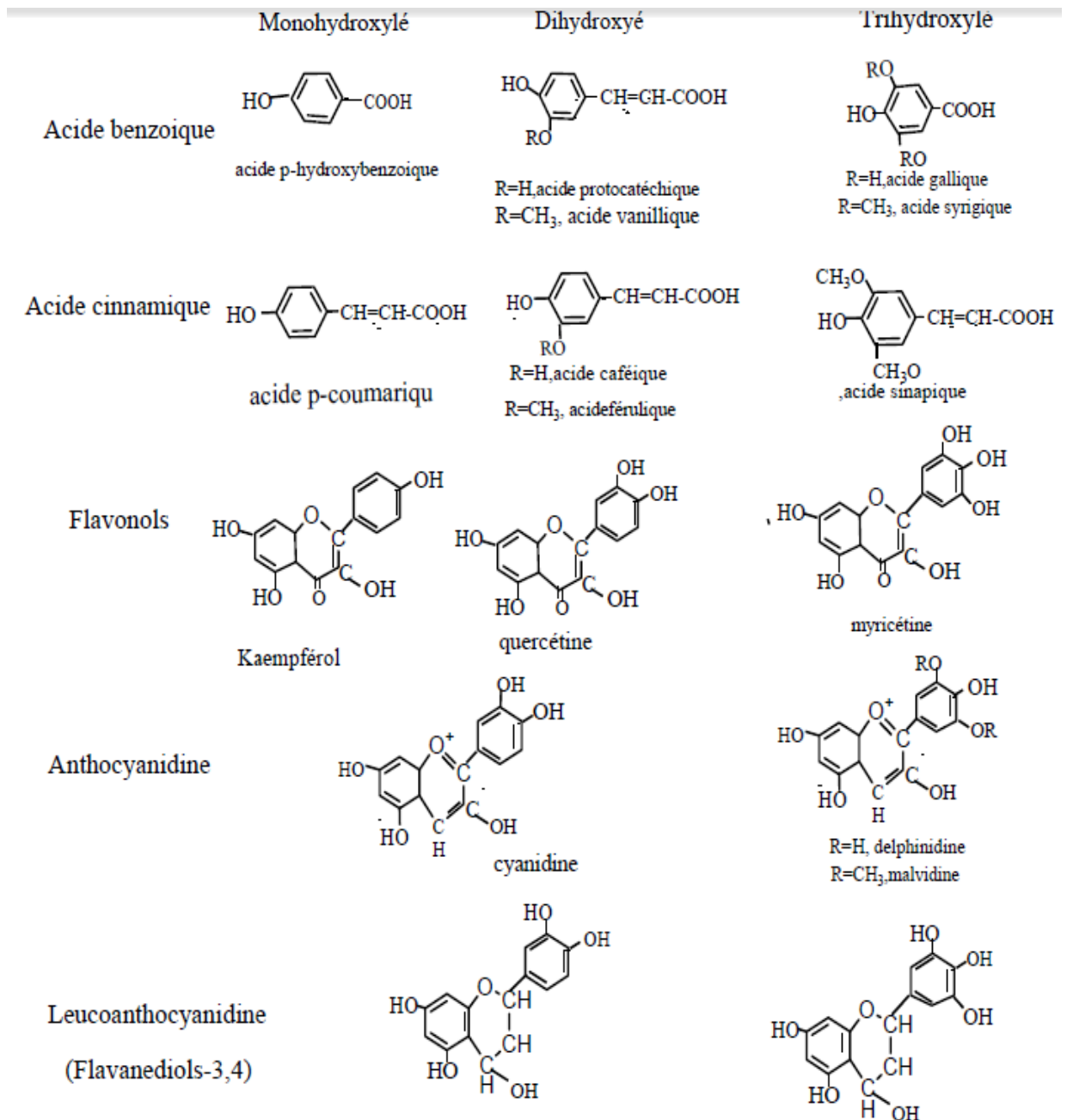


Figure 1.3 : Principaux composés phénoliques des végétaux [24].

#### 1.2.4.3- Les tanins :

Les tanins peuvent être classés en deux grands groupes de tanins, différents à la fois par leur réactivité chimique et par leur composition [37].

➤ **Les tanins hydrolysables:** ce sont des esters de glucose et d'acide gallique [18]. Ils sont d'abord caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par l'hydrolyse chimique (enzymatique). Ils libèrent alors une partie non phénolique (souvent du glucose) et une

partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique, soit un dimère de ce même acide – l'acide éllagique [18].

➤ **Les tanins condensés:** ce sont des oligomères ou des polymères de flavane-3-ol dérivés de la (+) catéchine ou de ses nombreux isomères [26]. Ils ont la propriété de coaguler les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux [18].

### **1.2.5- Propriétés des composés phénoliques :**

De nos jours, les propriétés des composés phénoliques sont largement étudiées dans le domaine médical. Plusieurs études ont démontré que ces composés sont de puissants antioxydants offrant toute une batterie de fonctions biochimiques particulièrement intéressantes pour notre santé, où on leur reconnaît des activités antivirales, anti-radicalaires, antiallergiques, mais aussi anti-inflammatoires et anticancéreuses [13].

#### **1.2.5.1- Effet antioxydant :**

Les composés phénoliques sont des puissants antioxydants, thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants générés par notre organisme en réponse aux agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections, etc.) et qui favorisent le vieillissement cellulaire.

Les composés phénoliques interviennent donc pour renforcer nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires. Des études *in vivo* suggèrent que les polyphénols interrompent le passage du stress oxydatif et interceptent le "message" de l'apoptose (mort cellulaire programmée). D'autres études montrent que ces composés sont aussi des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase, la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase [38].

L'une des premières propriétés reconnue aux polyphénols est d'être veino-actif, c'est-à-dire ayant la capacité de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance.

#### **1.2.5.2- Effet antiallergique :**

Cet effet est attribué à l'influence des polyphénols sur la production de l'histamine. En effet, ces derniers inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca<sup>2+</sup>dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des mastocytes et des basophiles [39].

### **1.2.5.3- Effet antimicrobien :**

Plusieurs études ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobienne des polyphénols. A l'heure actuelle, cet effet est certain et démontré par de nombreuses recherches expérimentales. Les études du pouvoir inhibiteur des polyphénols sur la croissance bactérienne ont démontré que de nombreux composés flavoniques sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram (-) et Gram (+) [40]. Leur mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire [41].

### **1.2.5.4- Effet anti-inflammatoire:**

Sous l'action des la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase, l'acide arachidonique se métabolise respectivement en prostaglandines et leucotriènes induisant ainsi des phénomènes inflammatoires. Des études ont montré que certains polyphénols tels que sont capables de modifier le métabolisme de l'acide arachidonique dans les plaquettes en inhibant ces enzymes [42].

### **1.2.5.5- Un espoir pour le Cancer:**

Certains polyphénols ont montré une activité anti-tumorale. Une telle activité est attribuée à la capacité de ces composés d'inhiber l'activité d'une enzyme, la topo-isomérase II.

Les polyphénols agissent donc en inhibant la croissance cellulaire et en empêchant certaines phases du cycle cellulaire qui joue un rôle essentiel dans l'apparition du cancer. Les polyphénols, ont largement montré leurs effets protecteurs contre plusieurs cancers, dont la prostate, le côlon et le poumon [43].

## **Partie 1.3**

### **Généralités sur les huiles végétales**

#### **1.3.1- Introduction :**

Depuis la plus haute antiquité, les huiles végétales sont intimement liées aux soins de beauté. Les plus grandes civilisations antiques (Égypte, Empire Romain, Grèce, Mésopotamie) ont accordé une place prépondérante aux huiles végétales, considérées alors comme des produits nobles, signes de luxe et de pouvoir [44].

Appliquées en cosmétologie, les huiles végétales sont des substances hypoallergéniques qui procurent à l'épiderme tous les éléments nécessaires à sa structure, son hydratation et sa vitalité. Les acides gras essentiels participent à la structure des membranes des cellules de la peau et la tonifient, l'assouplissent et la régénèrent.

Les huiles végétales sont riches en vitamines liposolubles (vitamines A, D, E et K) qui protègent la peau contre les risques de dégénérescence et d'oxydation qui entraînent son vieillissement prématuré. Ces vitamines favorisent également l'absorption et le métabolisme des acides gras essentiels avec lesquels elles agissent donc en synergie [44]. Enfin, il est important de savoir que notre peau a également besoin d'être nourrie de l'intérieur, via la circulation sanguine. Dans ce cadre, l'ingestion des huiles végétales fournira à l'organisme tout ce dont il a besoin pour assurer la vitalité et l'hydratation de l'épiderme (BOSKOU D, 2002).

#### **1.3.2- Définition de l'huile végétale :**

Les huiles végétales sont extraites des graines, des amandes et des fruits des plantes oléifères. Les oléagineux sont donc ceux qui servent à produire de l'huile et qui sont cultivés dans ce but. Parmi les plantes cultivées pour leur huile, on cite : l'arachide, l'olivier, le colza, le ricin, le soja et le tournesol. L'huile végétale récupérée de ces plantes est généralement liquide à température ambiante, elle peut être destinée à différents domaines agroalimentaire et cosmétique ou à la production de biocarburant [45].



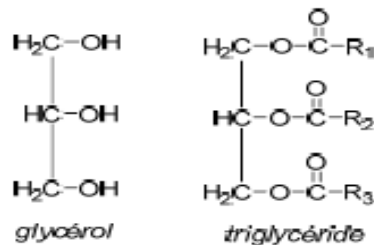
### 1.3.3- Composition chimique des huiles végétales:

Les huiles végétales se composent essentiellement d'esters de glycérol d'acides gras appelés triglycérides, le reste étant l'insaponifiable (cires, glucides, stérols, vitamines, antioxydant, polyphénols) [44].

#### 1.3.3.1- Les constituants majeurs :

##### ➤ Les triglycérides et les acides gras :

Les triglycérides représentent au moins 98 % du poids des huiles. Ils résultent de l'estérification des 3 fonctions alcool du glycérol par 3 molécules d'acides gras, ce sont donc des mélanges contenant des esters naturels (Figure 1.4) [46].



**Figure 1.4 :** Structure du glycérol et des triglycérides

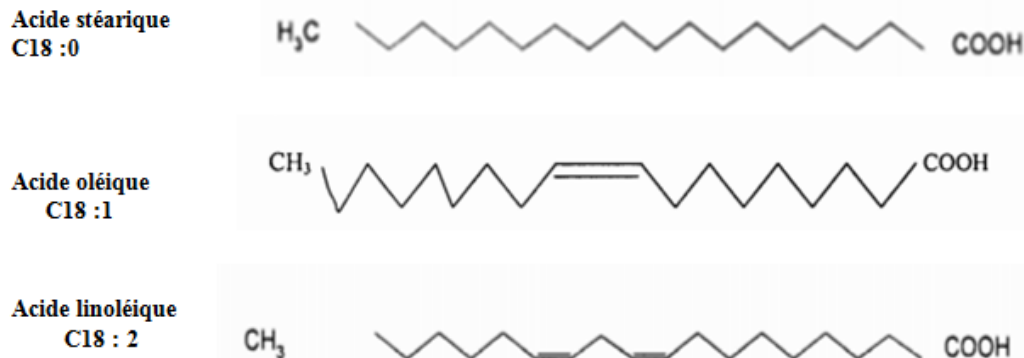
(R1, R2, et R3 correspondent aux chaînes alkyles des acides gras) [46].

Les acides gras les plus souvent rencontrés dans les huiles végétales sont formés de 16 à 18 atomes de carbone, mais toujours en nombre pair. On distingue donc [46]:

Les acides gras saturés : dans lesquels chaque atome de carbone a ses 4 valences engagées dans des liaisons avec d'autres atomes de carbone ou d'hydrogène (ou d'oxygène pour le carbone du groupement carboxyle). Les principaux acides gras saturés dans les huiles végétales sont l'acide palmitique (C 16) et l'acide stéarique (C 18) (Figure 1.5), accessoirement les acides myristiques (C 14) et lauriques (C 12).

Les mono-insaturés : il s'agit d'acides gras dans lesquels deux atomes de carbone adjacents de la chaîne ont chacun une valence libre, non saturée, qu'ils mettent en commun de telle sorte que deux atomes de carbones soient réunis par une double-liaison. Les principaux acides gras mono-insaturés dans les huiles végétales sont l'acide palmitoléique (C16) et surtout l'acide oléique (C18) qui représente 30 % des acides gras fournis par l'alimentation (Figure 1.5).

Les polyinsaturés : dits essentiels, ce sont les acides gras à 18, 20, et 22 atomes de carbone qui présentent dans leurs chaînes deux ou plusieurs double liaisons séparées par un groupement méthylène (CH<sub>2</sub>). Les principaux acides gras polyinsaturés sont l'acide linoléique (18 : 2) (Figure 1.5), l'acide linoléique (18 : 3) et l'acide arachidonique (20 : 4).



**Figure 1.5** : Exemples d'acide gras saturé, mono-insaturé et poly-insaturé [46].

### 1.3.3.2- Les constituants mineurs : [46]

Outre les triglycérides, les lipides alimentaires contiennent une gamme de constituants qui sont importants pour le maintien de la santé. Ces constituants non glycéridiques des huiles, encore appelés constituants mineurs, ne sont mineurs que du point de vue de leurs concentrations par rapport aux triglycérides.

- **Les vitamines liposolubles** : les vitamines rencontrées dans les huiles végétales sont :

Vitamine E: beaucoup d'huiles végétales et de produits tirés de ceux-ci contiennent des concentrations appréciables de vitamine E (tocophérol) que certaines méthodes de traitement risquent de réduire. Cette vitamine E se compose d'un mélange de phénols liposolubles caractérisés par un chromosol aromatique en bout de chaîne et une chaîne latérale de 16 atomes de carbone (tocophérol).

Vitamine A et caroténoïdes: les caroténoïdes sont des hydrocarbures poly-isopréniques hautement insaturées, liposolubles. Plus de 75 caroténoïdes sont présentes dans les matières grasses dont les plus courants sont les carotènes alpha, bêta et gamma, le lycopène, la lutéine et les xanthophylles.

- **Les antioxydants** : Il existe des substances autres que la vitamine E qui agissent comme antioxydant, mais le tocophérol est le principal antioxydant présent dans l'organisme. Parmi ces substances, nous avons :

Tocotrienol: c'est un analogue structure du tocophérol qui a certaines propriétés physiologiques qu'on n'observe pas chez le tocophérol, par exemple son activité hypocholestérolémiant.

Phytostérols : ce sont des stérols de produits végétaux; Les esters de l'acide férulique, d'alcool triterpénique et de stérols végétaux (méthylstérol) exercent des effets hypocholestérolémiant par inhibition de l'absorption du cholestérol et renforcement de l'excrétion du stérol et des sels biliaires. C'est le cas de l'oryzanol, ester de l'acide férulique qui constitue jusqu'à 20 % de la fraction non saponifiable de l'huile de son de riz. En outre, l'acide férulique est un antioxydant puissant qui stabilise les huiles végétales.

#### 1.3.4- Classification des huiles végétales : [47].

Les huiles végétales sont classées en fonction du nombre d'insaturation :

- **Les huiles siccatives** : composées d'acides gras estérifiés et libres présentant de nombreuses insaturations. C'est le cas de l'huile de lin, utilisée comme vernis dans le domaine de la peinture.
- **Les huiles semi-siccatives** : présentent des propriétés intermédiaires, par exemple les huiles de sésame, amande, qui sont utilisées dans l'industrie alimentaire et cosmétique.
- **Les huiles non-siccatives** : composées d'acides gras présentant peu d'insaturations (essentiellement de l'acide oléique). C'est le cas des huiles d'olive, moringa et ricin, utilisées dans le domaine alimentaire et cosmétique.

Il est également possible de classer les huiles végétales en fonction de leur profil en acide gras, on distingue :

- **Les huiles riches en acides gras saturés** : composé essentiellement d'acides gras saturés, on peut citer par exemple les huiles lauriques, riches en  $C_{12}$ , telle que l'huile de palmiste, extraite des graines de palmier à l'huile.
- **Les huiles oléiques** : elles sont caractérisées par une teneur élevée en  $C_{18:1}$ . C'est le cas des huiles carthame, d'olive, de colza et de sésame.
- **Les huiles linoléiques** : il s'agit des huiles riches en  $C_{18:2}$ , telles que les huiles de coton, de soja, de pépins de raisin et de sésame.
- **Les huiles linoléiques** : il s'agit des huiles riches en  $C_{18:3}$ , telles que l'huile de lin.

### 1.3.5- Intérêts des huiles végétales :

Les propriétés bénéfiques des huiles végétales sont connues depuis l'antiquité, elles nourrissent, protègent et hydratent le corps.

➤ **Nutritionnel et thérapeutique :** Les huiles végétales ont donc un intérêt nutritif, d'abord par l'apport en vitamine F dite aussi facteur F. Cette vitamine excellente pour la peau et ses irritations se trouve dans les corps gras, elle se décline en acides gras polyinsaturés dits essentiels regroupant les trois principaux acides : arachidonique, linoléique et linoléique.

Elle intervient également dans la régulation du métabolisme des graisses néfastes, régule le taux de cholestérol, diminue les risques de thrombose, prévient des maladies coronariennes, participe à la régulation de la température du corps, favorise la régénérescence de la peau et sa protection, stimule les défenses immunitaires, permet la formation des prostaglandines et intervient dans la fertilité sexuelle. En fin, il est indispensable à la nutrition des neurones et du système nerveux constitué tout de même par les lipides.

Les acides gras polyinsaturés assurent également la perméabilité modulable des parois de l'intestin [48].

➤ **Cosmétique :** En plus de servir à diluer les huiles essentielles et permettent de les faire cheminer dans l'organisme à travers la peau, les huiles végétales sont incontournables en cosmétique. Riches en acides gras insaturés, elles pénètrent bien l'épiderme, le protègent en reconstituant le film lipidique, lui redonnent finesse, éclat et souplesse. Grâce à leur action adoucissante, assouplissante, tonifiante et régénérante, elles préservent la peau d'un vieillissement prématuré. Elles ne présentent pas d'incompatibilité avec l'organisme (bien au contraire) et jouent un rôle prépondérant dans la protection et l'hydratation de la peau [49].

## Partie 1.4

### Généralités sur l'Arganier *Argania spinosa* L.

#### 1.4.1- Histoire de l'Arganier :

L'arbre de l'Arganier est très anciennement connu et utilisé par l'homme puisque les premiers écrits sur l'Arganier sont ceux de géographes et médecins arabes qui ont étudié la région du Maghreb. En effet, au Xe, XIe et XIIe siècle, les usages du fruit de l'Arganier ont été relatés respectivement par *EL Bekri*, *EL Idrissi* et *Ibn Radhom* [50]. En 1219, *Ibn al Baythar*, médecin égyptien, décrit dans son "Traité des simples" l'arbre et la technique d'extraction de l'huile [6].

De même certaines sources indiquent que les Phéniciens ont connu l'arbre et l'ont exploité pour en extraire ses huiles (particulièrement dans la région d'Essaouira au Maroc), ils auraient utilisé l'huile qu'ils produisent dans leurs comptoirs installés le long de la cote atlantique [4].

En 1515, *Hassan El Wazzam* dit le Léon l'Africain évoque dans son livre 'Description de l'Afrique, l'existence d'arbres épineux produisant un fruit dénommé «Argan» à partir duquel on extrait une huile servant pour l'alimentation et l'éclairage.

Ce n'est qu'en 1737, que la première description spécifique fut donnée par *Carl Von Linnee* à partir seulement de rameaux séchés et sans fleurs dans son « *Hortus Clifortianus* » sous le nom de *Sidéroxylon spinosum* L. (Bois de fer) [51].

En 1791, *Hosst* mentionna l'utilisation de l'huile d'Argan dans les usines, notamment à Marseille, dans la fabrication du savon [52].

En 1906, *Coton* isole un principe actif du tourteau du fruit de l'arbre et l'identifie comme un mélange de saponines et l'appelle Arganine [52].

En 1926, *Lemaire*, publie à la suite de ses missions dans le Souss un premier article sur la végétation du Sud-ouest marocain, citant deux types d'Arganeraies : Celle à *Euphorbia Echinus* du littoral atlantique et celle à *Hesperola Barnum Platycarpum* (Maire) des montagnes d'Adar-ou-Amane ébauchant la première classification d'Aganeraie des plaines et des montagnes.

En 1929, *Battino* s'intéresse à l'huile et aux d'autres produits d'Arganier notamment l'Arganine isolée par *Cotton* et laquelle il prête une action hémolytique *in vivo* et *in vitro* [53].

En 1999, l'UNESCO a ajouté cet arbre à la liste de l'héritage mondial [54].

#### 1.4.2- Répartition géographique :

L'Arganier (*Argania spinosa* L. Skeels), arbre endémique du sud marocain et sud-ouest algérien.

Au Maroc, son aire de répartition située entre 29° et 32° de latitude Nord. Réparti sur une surface de 828000 ha selon les chiffres de la direction des eaux et des forêts Marocaine [55]. Actuellement des études ont déterminé l'existence d'un peuplement de l'Arganier au nord oriental du Maroc dans le Rif oriental [56].

En Algérie, les populations d'Arganier restantes sont localisées dans la région de Hamada wilaya de Tindouf (Figure 1.6), plus précisément le long des berges des oueds et de ses affluents du Djebel Ouarkziz entre 28° N et 8° W. Son aire de répartition est restreinte et couvre une superficie avoisinante les 3000 hectares [57].

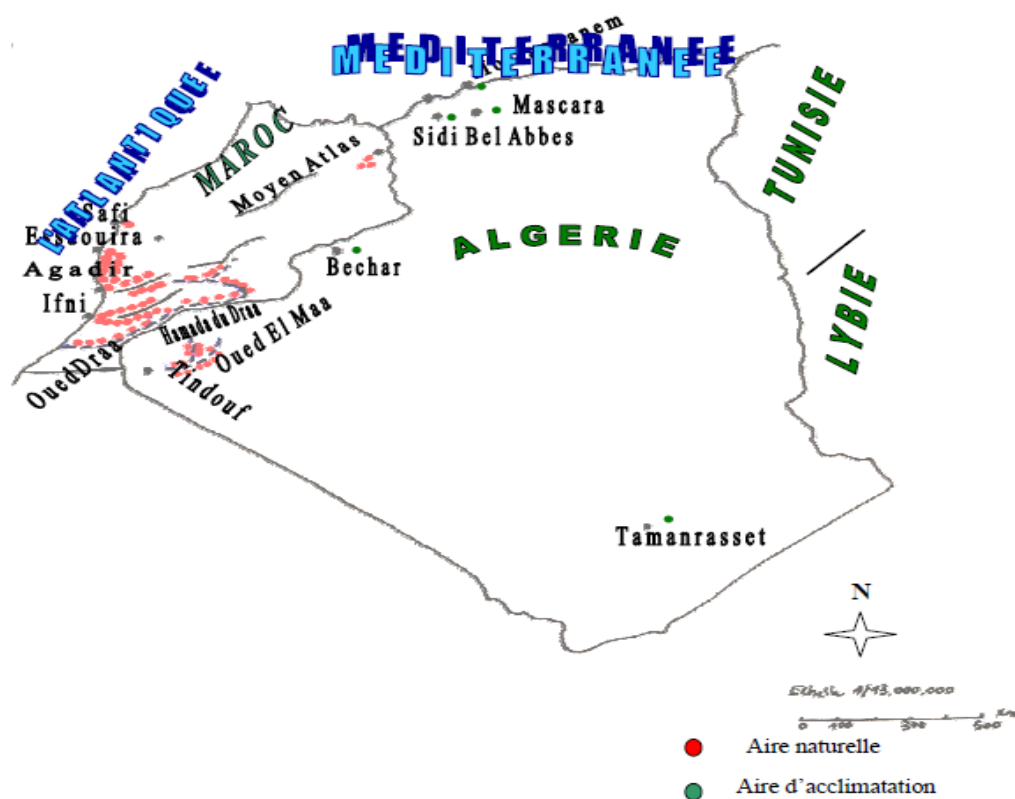


Figure 1.6 : Fiche technique de la conservation des forêts de la wilaya de Tindouf, 2002.

### 1.4.3- Ecologie de l'Arganier :

L'Arganier est une espèce thermoxérophyle résistante, admirablement adaptée aux conditions climatiques et édaphiques rudes [52]. Des études biologiques, physiologiques et génétiques, réalisées sur l'Arganier ont confirmé que cette espèce peut résister à des conditions écologiques d'une extrême sévérité. Son aire de répartition chevauche avec les bioclimats sahariens, arides et semi-arides [58].

#### 1.4.3.1- Conditions climatiques :

➤ **Pluviométrie** : L'Arganier peut supporter des régimes de précipitation très faibles et variable selon les régions qu'il occupe. En semi-aride, la pluviométrie est en moyenne comprise entre 250 et 400 mm/an et dans les zones sahariennes les pluies descendent au dessous de 100 mm/an [59].

➤ **Humidité** : Les Arganiers exigent une atmosphère humide surtout en période estivo-automnale, ce qui explique sa présence au niveau des zones littorales de l'océan atlantique où nous enregistrons une forte saturation en humidité par les brumes, brouillards et rosées [59].

➤ **Température** : De point de vue thermique, l'Arganier essence thermoxérophile, peut supporter les périodes chaudes avec des températures très élevées pouvant dépasser 50°C (Tindouf), et des températures extrêmement minimales inférieures à -2,6°C [59].

➤ **Altitude** : L'Arganier peuple les tronçons altitudinaux allant du littoral à 1600-1700 m d'altitude sur le versant sud du haut Atlas occidentale et l'Anti-Atlas [58].

#### 1.4.3.2- Conditions édaphiques

L'Arganier est une essence qui semble être indifférente à la structure physico-chimique des substrats du sol, il pousse sur tous types de sols, y compris les sols salés [55].

On le retrouve également sur les schistes, les roches calcaires et les alluvions. Cependant, il semble exclure les dunes [60]. Par ailleurs, l'Arganier semble supporter une large gamme de pH allant de 4.6 à 7.5 [55].

#### 1.4.4- Régénération de l'Arganier :

La régénération de l'Arganier peut se faire de plusieurs manières [59].

- **Reboisement** : Opération consistant à récolter les graines et à les semer en pépinière pour avoir des plants qu'il faut planter ultérieurement.
- **Germination naturelle** : Technique s'effectuant par le biais des graines qui tombent sur le sol.
- **Rejet de souches** : Ce sont des pousses qui démarrent des plantes mères ayant subi une taille ou suite à un incendie.
- **Bouturage** : Technique consistant à multiplier l'Arganier par des boutures. Ces dernières peuvent être récoltées à partir de jeunes plants et/ou de rameaux d'arbres adultes.
- **Micropropagation *in vitro*** : Opération visant à reproduire des plantes semblables à la plante-mère. C'est une technique efficace et rapide dans la reproduction des plants d'Arganier. Elle comprend deux phases : la première consiste à produire des plantules d'arbre, et la deuxième permet d'initier et développer des racines sur ces plantules, avec cette méthode on peut produire des plantes maîtrisés enracinés pendant 3 à 4 mois [61].

#### 1.4.5- Taxonomie :

Appartenant à la famille tropicale et subtropicale de *Sapotaceae* qui regroupe près de 600 espèces, L'Arganier (*Argania spinosa* L. Skeels) est la seule espèce de genre *Argania* et de l'ordre des *Ebenales*.

L'Arganier en français tire son nom de l'arbre « Argan », l'origine du nom d'Arabe se trouve probablement dans le mot « irgen » qui désigne en berbère le noyau en bois dur de fruit de l'arbre, d'où les berbères tirent une huile réputée huile « d'argan ».

Il existe deux formes d'Arganier l'une dite pleureur, l'autre dressé [62], ceci supposerait l'existence de deux variétés, ou races biologiques au sein de l'espèce.

L'arbre présente une structure typique de dicotylédone, de la famille des « *Sapotaceae* », le genre « *Argania* » est très polymorphe, il présente quelques analogie avec l'olivier, mais on ne le trouve que sur des vastes étendues dans le sud du Maroc et d'Algérie.

L'Arganier appartient selon Skeels au:



<b>Règne</b>	Plantae
<b>Embranchement</b>	Phanérogame
<b>Sous-embranchement</b>	Angiosperme
<b>Division</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliposida
<b>Ordre</b>	Ebenale
<b>Famille</b>	Sapotaceae
<b>Genre</b>	<i>Argania</i>
<b>Espèce</b>	<i>Argania spinosa</i> L. Skeels [63].

#### Noms vernaculaires : [63]

**Français :** Arganier, Bois de fer.

**Arabe:** Louz el ber

**Tamazight:** Argane

#### 1.4.6- Description botanique :

L'Arganier est un arbre épineux de taille pouvant atteindre 8 à 10 mètres de haut, sa caractéristique de polymorphisme est très frappante. En effet, on trouve des formes extrêmement variées selon les secteurs et le stade de développement de l'arbre. Parfois, il présente l'apparence majestueuse d'un chêne, d'autres fois son tronc noueux et ses rameaux le font ressembler à un olivier. [53, 64, 65].

➤ **Couronne :** Elle est largement étendue. Quand elle n'est pas altérée (Figure 1.7), la cime est dense et arrondie [60].

➤ **Tronc :** Court (2 à 3 mètres) et tortueux présente un aspect du type « peau de serpent » (Figure 1.7), formé par plusieurs tiges entrelacées [60]. Son bois est très dur, mais ne possède pas de cernes annuels nettement caractérisés, dont la difficulté de déterminer la longévité de l'Arganier [53].



**Figure 1.7 :** Arbre d'*Argania spinosa* L. [9].

➤ **Système racinaire :** Puissant et très profond (jusqu'à 30m), mais les radicelles n'ont pas de poils absorbants. Il profite d'une symbiose avec différents types de champignons pour pallier cette déficience, seuls ces derniers pouvant apporter les différents nutriments à l'arbre [66]. (Figure 1.8).



**Figure 1.8 :** Système racinaire de l'Arganier de la région du Maroc [67].

➤ **Rameau :** Garnis de petites feuilles, longs à croissance continue tandis que les courts se terminent par une pointe épineuse [66].

➤ **Feuille :** Sub-persistantes, souvent réunies en fascicules, en forme de spatule ou lancéolées, longues de 2 à 3 cm atténuées ou plus ou moins nettement pétiolées, de couleur verte sombre à la face supérieure et plus claire en dessous glabres, avec une nervure médiane très nette et des nervures latérales très fines et ramifiées [60]. (Figure 1.9)



**Figure 1.9:** Feuille d'Arganier [68].

➤ **Fleur :** La floraison commence généralement au printemps entre Mai et Juin [69]. Elle est hermaphrodite se regroupe en inflorescence axillaire (Figure 1.10). Ce sont des fleurs pentamères composées par deux bractées et un calice avec sépales arrondie de couleur blanche et garnis de courts et fins poils. La corole est de couleur jaune est en forme de coupe. L'androcée est formé par 5 étamines et 5 staminodes à filet court ; entoure un pistil à ovaire supère et style et court et conique [60].



**Figure 1.10:** Fleur d'Arganier [69].

➤ **Fruit :** Baie de forme ovale ou arrondie qui atteint à maturité la grosseur d'une noix de couleur jaune parfois veiné de rouge (Figure 1.11), formée d'un péricarpe charnu

ou pulpe qui représente 55 à 75% du poids frais du fruit, ce dernier recouvre un noyau très dur à tégument lignifié très épais qui représentent environ un quart du poids du fruit frais. La noix contient un complexe de plusieurs graines concrescentes. Cette graine composée ne possède habituellement qu'un ou deux embryons ; elle est albuminée et gorgée d'huile [60].



**Figure 1.11** : Rameau d'Arganier et fruits a maturité [69].

#### **1.4.7- Utilisation de l'Arganier :**

L'Arganier a des propriétés écologiques et physiologiques adaptées aux régions arides et semi-arides où il pousse. Dans ces zones, il est pratiquement irremplaçable pour la conservation des sols et des pâturages et pour la lutte contre la désertification. Il joue un rôle très important en s'opposant à l'érosion pluviale grâce à ses racines, qui peuvent atteindre plusieurs mètres de long. Cet arbre est très rustique participe à la fixation des sols, qu'il enrichit par ailleurs en matières organiques issues de feuilles mortes [70].

L'Arganier est un arbre à usage varié offre une triple vocation : forestière, pastorale et fruitière, chaque partie ou production de cet arbre est une source de revenus ou de nourriture pour l'utilisateur :

➤ **Utilisation du bois** : Extrêmement dur, le bois de l'Arganier est fort apprécié comme matériau de charpente et pour la fabrication de toutes sortes d'outils agricoles. Parce qu'il est dense et se consume lentement, il est massivement utilisé en tant que combustible, sous forme de charbon [70].

➤ **Utilisation des feuilles, pulpe et tourteau** : Les feuilles de l'Arganier sont consommées par les camelins et les caprins. La pulpe des fruits représente également une source de nourriture pour les animaux. Le tourteau, résidu d'extraction d'huile, est utilisé comme complément énergétique pour l'engraissement des bovins [70].

➤ **Utilisation de l'huile** : Depuis l'antiquité, l'huile d'Argan a suscité l'intérêt des médecins égyptiens célèbres qui lui ont alors reconnu un certain nombre de propriétés très intéressantes. Actuellement la réputation de l'huile d'Argan revient en fait aux innombrables vertus prodigieuses et sensationnelles qu'elles recèlent (nutritionnelles,

biologiques, diététiques et cosmétiques) [71]. Voici quelques utilisations de cette huile [4, 72]:

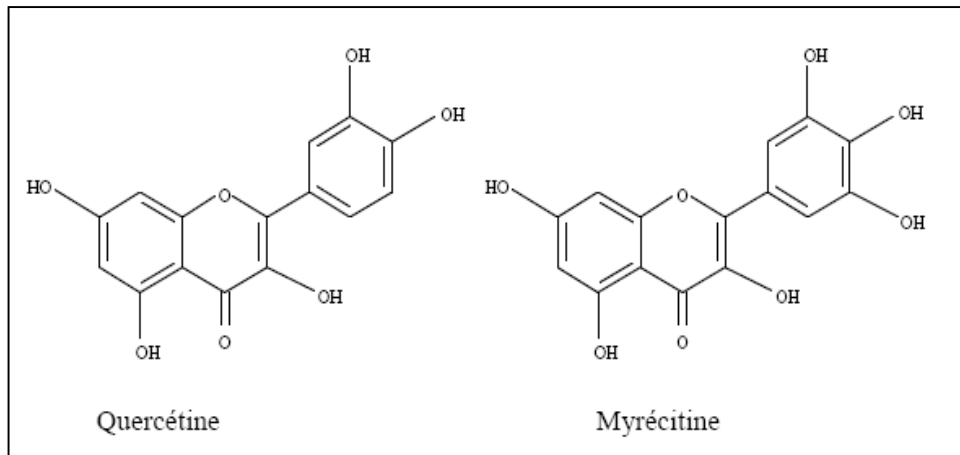
- Complément lipidique, elle peut être consommée seule ou comme ingrédient principale des recettes originales Marocaines comme « Tagoulla », « Lamris », « Toumit », « Amlou ».
- Traitement de l'acné juvénile, l'eczéma et pour soulager les manifestations cutanées de la rougeole et la varicelle et pour le nettoyage et la désinfection des blessures.
- Utilisée dans les maux d'oreilles et atténue les douleurs rhumatismales
- Soulage les enfants présentant des symptômes d'infection respiratoire et des coliques.
- Nourrit les cheveux, empêche leur chute et garde leur éclat, elle est conseillée pour les soins et la fortification des cheveux ternes et cassants.
- Hydrate, nourrit et protège les peaux sèches et fragiles, retardent le vieillissement de la peau et l'apparition de rides.

#### **1.4.8- Composition chimique de l'Arganier :**

##### **1.4.8.1- Feuille :**

D'après El kabouss et *al.*, 1995 ; La feuille d'Arganier est très riche en composés polyphénoliques principalement les flavonoïdes. L'étude de cette fraction a montré la présence de la quercétine, la myricétine (Figure 1.12) et quatre de leurs dérivés glycosylés ont également été identifiés: la myricétine-3-O- galactoside, l'hyperoside (quercétine-3-O-galactoside), la myricitrine (myricétine-3-O-rhamnoside) et la quercitrine (quercétine-3-O-rhamnoside) et des saponosides. Cependant la fraction volatile des feuilles ne représente que 0.03 à 0.05 %, la nature des composés formant cette dernière a été analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. 19 composés ont pu être identifiés dont les majoritaires sont le 14- méthylidène-2, 6,10-triméthylhexadécène, ceci montre que la fraction des huiles essentielles des feuilles d'arganier est principalement composée de sesquiterpénoïdes oxygénés [73].

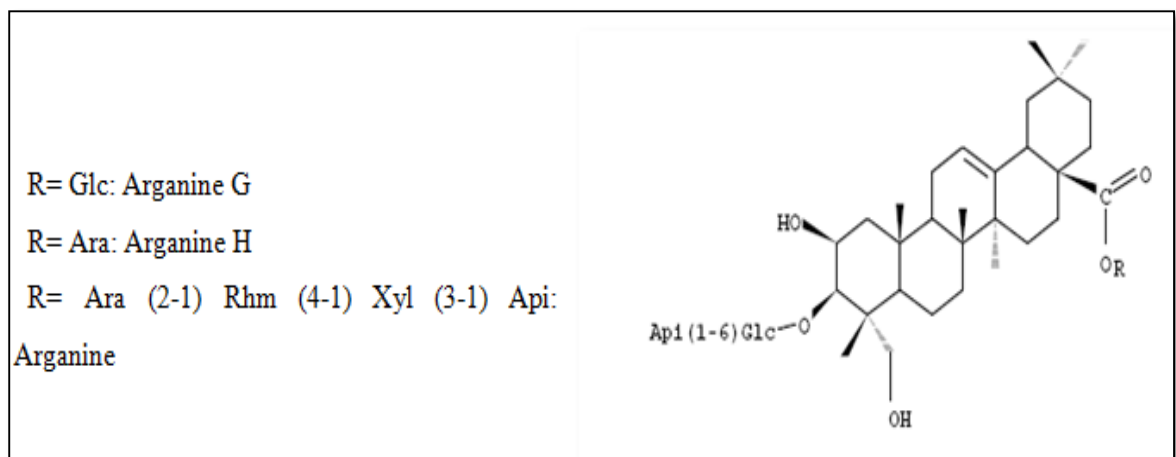
L'extrait lipidique représente 4.4% des feuilles avec un taux d'insaponifiable de 27%. Ce dernier renferme des stérols (5%), des méthylstérols (1%), des triterpènes monohydroxylés (32%) et dihydroxylés (22%) ainsi que des hydrocarbures et des tocophérols (16%). Les principaux composés isolés sont T-amyrine, N-amyrine, lupéol, i- taraxastérol, érythrodiol, spinastérol et schotténol [74].



**Figure 1.12 :** Structure chimique des flavonols isolés des feuilles d'Arganier [6].

#### 1.4.8.2- Bois:

Le bois de l'Arganier est particulièrement riche en saponines, celles-ci étant retrouvées à une concentration d'environ 6 % [75]. L'étude phytochimique du bois de ce dernier a permis d'identifier trois nouvelles Saponines triterpéniques (Figure 1.13) nommées Arganine G, H et J [76]. Récemment, on a pu isoler cinq nouvelles saponines à partir du bois de l'arganier, qui sont les arganines L, O, P, Q et R.



**Figure 1.13:** Structure chimique des saponosides du bois de l'Arganier [6].

#### 1.4.8.3- Pulpe :

Caractérisée par une forte teneur en cellulose, glucides et protide. L'extrait lipidique de la pulpe est constitué de glycérides composés essentiellement d'acide gras myristique et linoléique [77] ; de latex comme le Poly isoprène et d'insaponifiables qui sont triterpènes,

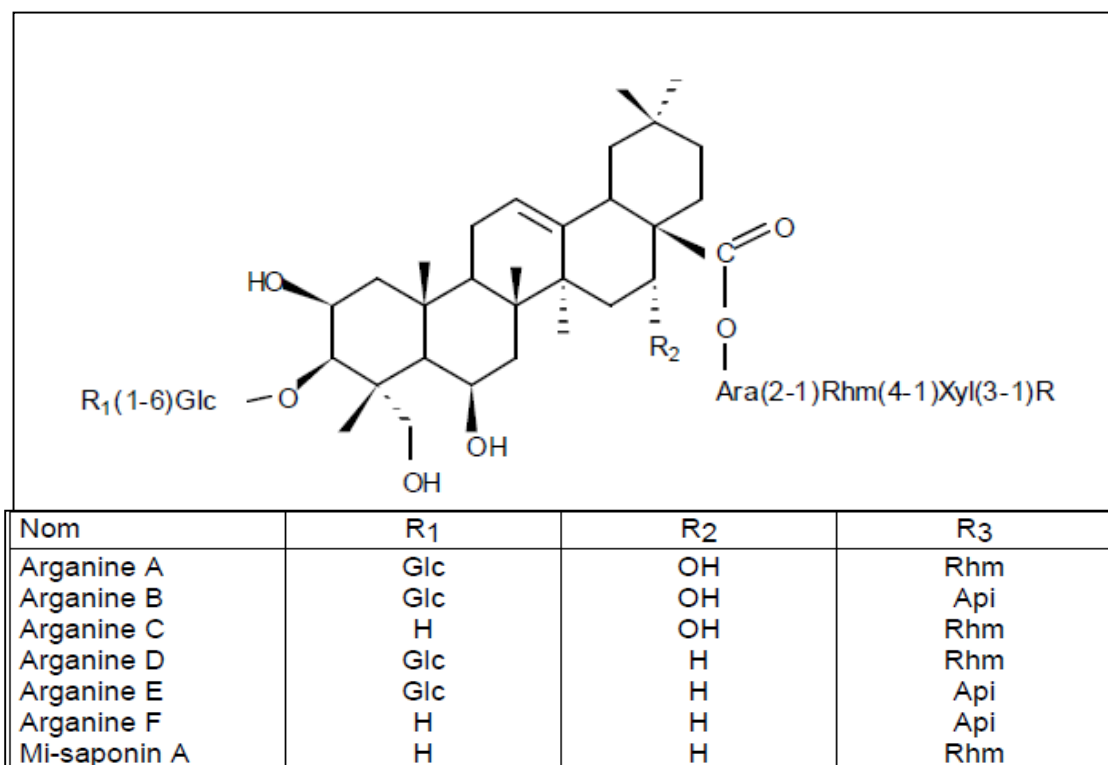
des stérols, et les saponosides [78]. Des poly phénols ont été également mis en évidence dans la pulpe du fruit de l'Arganier, la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, la rutine, l'acide phydroxybenzoïque et les dérivés hydroxycinnamiques. L'érythrodiol, le lupéol, l'T-et la N- amyrine, d'autres triterpènes ont été isolé dans l'insaponifiable de la pulpe; il s'agit du taraxastérol, i- taraxastérol, bétulinaldéhyde et bétuline. Les stérols identifiés dans la pulpe du fruit de l'Arganier sont le schotténol et le spinastérol, leur teneur dans l'insaponifiable est inférieure à 0.4%.

Les substances volatiles de la pulpe du fruit de l'Arganier ont été analysées, le résorcinol a été identifié comme étant le composé majoritaire (73,5%) [77].

#### 1.4.8.4- Tourteau :

C'est les résidus d'extraction de l'huile, de couleur blanchâtre très amer. Il est riche en glucides et en protéines, il renferme un important groupe pharmacodynamique à large spectre d'activité biologique constitué de poly phénols et saponosides.

7 saponosides ont été isolées et identifiées dans le tourteau de l'Arganier (Figure 1.14), 5 sont des nouvelles substances naturelles nommées Arganine A, B, C, D, E, F, Mi-Saponine [79].



**Figure 1.14:** Structure chimique des Saponosides du tourteau de l'Arganier. [6].

#### 1.4.8.5- Huile :

La composition chimique de l'huile végétale extraite à partir des amandons du fruit d'Arganier a fait l'objet de nombreuses études [7, 78, 80, 81].

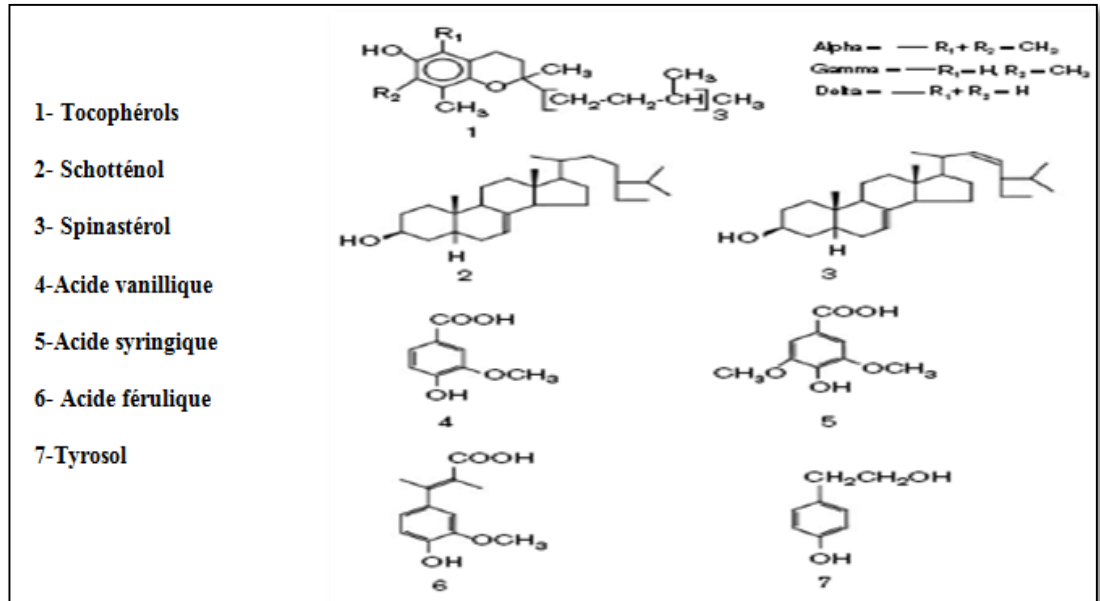
La fraction glycéridique représente 99% de l'huile totale. Les triglycérides sont le composé majoritaire avec un taux de 95 % [82]. Il s'agit d'une huile du groupe oléique-linoléique constituée de 80% d'acide gras insaturés. L'acide oléique (C 18:1) représente 45 % des acides gras suivi par l'acide linoléique (C 18:2 n-6) avec 35 % puis l'acide palmitique (C 16:0) et l'acide stéarique (C 18:0) avec respectivement 12 % et 5 % [7, 80].

La fraction insaponifiable représenté par 1% du poids totale de l'huile contient des hydrocarbures et des carotènes (37%), des alcools triterpéniques (20%), des méthyles-térols et stérols (20%) et des xanthophylles (6.5%) [8, 80].

Les composés phénoliques sont présents dans l'huile d'Argan avec une forme simple comme les acides : vanillique, ferulique et le p-hydroxybenzoïque (Figure 1.15). De même que le tyrosol, le résorcinol, le catéchol, la cathéchine et l'épicathéchine.

Les tocophérols (Figure 1.15), qui sont des agents antioxydants permettant une bonne conservation du produit [83] sont également présents dans l'huile sous forme d'alpha-tocophérol à raison de 440 mg /kg, ce qui fait de l'huile d'Argan une excellente source de vitamine E [7, 80, 81].

La fraction stérolique est composée principalement de Spinastérol et Schottérol [7]. (Figure 1.15). Ces stérols sont rarement rencontrés dans les huiles végétales, le Schottérol semble avoir des propriétés curatives pour le traitement de certaines maladies de la peau [84, 85].



**Figure 1.15** : Structure chimique des tocophérols, des polyphénols et des principaux stérols de l'huile d'Argan (*Argania spinosa* L.) [85].



**CHAPITRE 2**  
**MATERIEL ET METHODES**

## **Partie 2.1**

### **Feuille et pulpe**

#### **2.1.1- Matériel :**

##### **2.1.1.1- Matériel biologique :**

###### ➤ **Matériel végétal :**

Les feuilles et fruits d'Arganier ont été récoltés durant la période allant du mois de Juin à Juillet 2013 de la wilaya de Mostaganem, région de Stidia (Nord ouest de l'Algérie). L'authentification de l'espèce a été confirmée par Pr ABDELKRIM (l'École Nationale Supérieure d'Agromonie) et au niveau de l'Herbier du jardin botanique d'El Hamma, Alger. L'échantillonnage a été réalisé sur 10 arbres.

Cette étude est portée sur les feuilles et la pulpe des fruits d'*Argania spinosa* L. Skeels.

###### ➤ **Matériel bactériologique :**

L'étude bactériologique a été portée sur 6 souches, provenant du laboratoire de contrôle de stérilité du complexe Antibiotical Sidal (Médéa) et qui sont :

*Bacillus subtilis* ATCC 6633

*Bacillus cereus* ATCC 14579

*Yersinia enterocolitica* ATCC 23715

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Escherichia coli* ATCC 25922

L'identification des souches ATCC a été confirmée avec MALDI-TOF-MS spectromètre Microflex LT (Bruker Daltonics, 158 Bremen, Germany).

###### ➤ **Matériel cellulaire :**

L'étude cytotoxique a été testée sur la lignée cellulaire :

*PC3 Cancer cell line*: lignée cellulaire du cancer de la prostate humaine (Human prostate cancer cell line). Provenant d'ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA).

### 2.1.1.2- Matériel non biologique :

Le matériel non biologique utilisé dans la partie expérimentale est rapporté en annexe (Cf. APPENDICE B).

### 2.1.2- Méthodes :

Notre étude expérimentale a été réalisée sur une période allant de l'année 2013 à 2016 au niveau des :

- Centre de recherche scientifique et technique en analyses physicochimiques (CRAPC), Bou Ismail. Algérie.
- Institut recherche européen en ingrédients naturels (ERINI), Grasse, France.
- Centre de recherche en pharmaceutique (PRC), université des sciences et technologies, Irbid, Jordanie.
- Laboratoire de recherche, Faculté de pharmacie, université des sciences et technologies, Irbid, Jordanie (JUST).
- Laboratoire de physicochimie, et de pharmacotoxicologie du complexe Antibiotical, SAIDAL de Médea, Algérie.

#### 2.1.2.1- Préparation des feuilles et pulpes d'*Argania spinosa* L. Skeels :

La préparation des feuilles et pulpes de l'Arganier, a été réalisée selon les étapes suivantes :

- Les feuilles et les fruits arrivés à la saison de récolte ont été cueillis et soigneusement lavés puis séchés à l'ombre et à température ambiante.
- La pulpe séchée a été séparée de la noix par simple écrasement manuel.
- La pulpe et les feuilles d'Arganier ont été finement broyées puis conservées à 4°C jusqu'à utilisation.
- Notre étude a été réalisée sur les feuilles et pulpes broyées directement après séchage.



**Figure 2.1** : Feuilles et pulpes de fruits d'*Argania spinosa* L.

### **2.1.2.2- Extraction par solvant assistée par ultrasons:**

#### **Principe :**

Consiste à des variations de pression du liquide traversé, la succession de compressions dépressions du liquide provoquée par l'onde entraîne la formation de bulles de gaz. Certaines de ces bulles vont croître et brusquement imploser en créant localement des conditions extrêmes provoquant la lésion des membranes des cellules végétales et la libération de leurs contenues [86].

#### **Mode opératoire : [86].**

L'extraction a été réalisée sur la poudre de feuille / pulpe d'Arganier pour obtenir à la fin de l'opération deux extraits, extrait de feuille et extrait de pulpe selon les étapes suivantes :

- Dans un bécher peser 20g de poudre (feuille / pulpe).
- Ajouter 200 ml de solvant d'extraction méthanol.
- Mettre le récipient dans un bain ultrasonique, le traitement par ultrasons à une fréquence de 40 Khz et une puissance de 400W, dure 30 minutes à une température d'environ 40°C.
- Retirer le bécher du bain puis filtrer.
- Filtrat obtenue est ensuite évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif.
- L'extrait obtenu est pesé puis stocké à l'abri de la lumière dans des récipients en verre opaque à 4°C jusqu'à utilisation.

### 2.1.2.3- Etude phytochimique :

#### 2.1.2.3.1- Dosage des polyphénols totaux :

Les polyphénols totaux sont dosés par la méthode colorimétrique de **Slinkard et Singleton, 1977 [87]**.

#### Principe :

Le réactif de Folin Ciocalteu (FCR) est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phospho tungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phospho molybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène [87].

#### Mode opératoire :

Le dosage des composés phénoliques dans la feuille et la pulpe d'Arganier a été comme suit :

##### ➤ Préparation de l'échantillon :

- Peser 1mg d'extrait de feuille / pulpe.
- Ajouter 1 ml de méthanol.
- Introduire la solution obtenue dans un tube à essai.

##### ➤ Préparation de la courbe d'étalonnage :

- Préparer 5 tubes à essais numérotés de 1 à 5,
- Préparer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique avec des concentrations de : 50µg, 40µg, 25µg, 20µg, 12µg par ml de méthanol,
- Ajouter pour tous les tubes (courbe d'étalonnage et échantillon) 46 ml d'eau distillée et 1 ml de FCR,
- Agiter pendant 3 minutes puis ajouter 3 ml de carbonate de sodium (2%),
- Agiter pendant 2 heures à température ambiante,
- La lecture de l'absorbance se fait à 725 nm.
- Le blanc est préparé avec 1ml de méthanol, 46ml d'eau distillée et 3 ml de carbonate de sodium (2%).

#### Lecture:

Calculer la concentration des composés phénoliques selon l'équation de la droite linéaire ;  $Y = ax + b$  obtenue par le tracé de la courbe d'étalonnage. D'après la loi de Beer Lambert, l'absorbance est proportionnelle à la concentration, dont :

$$\text{Absorbance} = a (\text{concentration d'acide gallique en } \mu\text{g}) + b$$

Y : représente l'absorbance, X : représente la concentration en phénols

L'expérience a été réalisée en triplicata (courbe d'étalonnage et échantillons).

#### 2.1.2.3.2-Dosage des flavonoïdes totaux :

La teneur en flavonoïdes dans les extraits bruts de feuille / pulpe a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode décrite par **Kim et al., 2003, [88]**.

#### Mode opératoire : [88].

- Préparation de l'échantillon :
  - Peser 1mg d'extrait de feuille / pulpe,
  - Ajouter 1 ml de méthanol,
  - Introduire la solution obtenue dans un tube à essai.
  
- Préparation de la courbe d'étalonnage :
  - Préparer 5 tubes à essais numérotés de 1 à 5,
  - Préparer la courbe d'étalonnage de la quercétine avec des concentrations de : 300µg, 100µg, 50µg, 25µg, 12.5µg par ml de méthanol,
  - Prenez 0.2 ml de chaque tube (échantillon et courbe d'étalonnage),
  - Ajouter 0.3 ml d'une solution de nitrite de sodium NaNO<sub>2</sub> à 2%,
  - Laisser reposer pendant 5 minutes,
  - Ajouter 0,3ml d'une solution d'AlCl<sub>3</sub> à 10%,
  - Laisser reposer pendant 5 minutes,
  - Ajouter 2ml de solution de NaOH 1M,
  - Ajouter 0,25ml d'eau distillée,
  - Agiter à l'aide d'un vortex,
  - Préparer le blanc avec 0.2ml de méthanol, 0.3ml de NaNO<sub>2</sub> à 2%, 0.3 ml d'AlCl<sub>3</sub> à 10%, 2ml NaOH 1M. et 0.25 ml d'eau distillée.
  - Mesurer l'absorbance à 510 nm.

**Lecture:**

Calculer la concentration des composés phénoliques selon l'équation de la droite linéaire ;  $Y = ax + b$  obtenue par le tracé de la courbe d'étalonnage. D'après la loi de Beer Lambert, l'absorbance est proportionnelle à la concentration, dont :

$$\text{Absorbance} = a (\text{concentration de Quercétine en } \mu\text{g}) + b$$

$Y$  : représente l'absorbance,  $X$  : représente la concentration en flavonoïdes.

L'expérience a été réalisée en triplicata (courbe d'étalonnage et échantillons).

### 2.1.2.3.3- Caractérisation des polyphénols par la méthode chromatographique UHPLC – QTOF–MS :

Les premières analyses par chromatographie liquide ont été effectuées il y a environ un siècle par le botaniste russe Tzvet qui a fait des tests de séparation de divers pigments végétaux, suivi par ceux de Synge et Martin qui ont introduit les débuts du concept de chromatographie liquide haute performance HPLC en suggérant que l'utilisation de petites particules dans la phase stationnaire et de hautes pressions pour améliorer la séparation.

Plus récemment, la Chromatographie Liquide à Ultra Haute Pression (UHPLC) est apparue comme une nouvelle technique d'analyse qui fait appel aux mêmes principes que l'HPLC avec une nette amélioration sur différents points, les travaux se sont donc naturellement orientés vers le transfert technologique de la méthode HPLC/MS vers l'UHPLC-MS. Cette dernière a été rapidement appliquée dans l'identification des composés phénoliques dans les plantes [89].

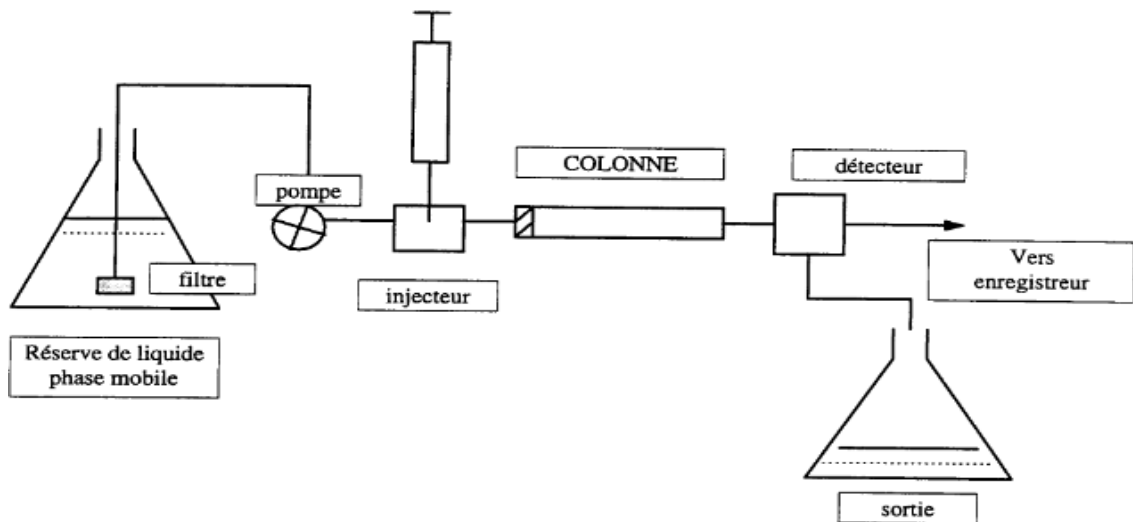
**Principe :**

L'UHPLC-ToF-MS est un couplage entre la chromatographie liquide ultra haute performance et un spectromètre de masse haute résolution à temps de vol (Time of Flight). C'est une technologie développée par WATERS Corporation qui s'appuie sur :

➤ La chromatographie liquide ultra haute performance :

Basée sur l'affinité des composés pour une phase stationnaire (la colonne) et une phase mobile (l'éluant), à laquelle s'ajoutent des innovations en termes de sensibilité et de vitesse d'analyse grâce à l'utilisation de colonnes capables de résister à de très grandes pressions de fonctionnement (Figure 2.2). Ces colonnes contiennent des phases stationnaires composées de petites particules de 1,7  $\mu\text{m}$  de diamètre (entre 3 et 5  $\mu\text{m}$  pour l'HPLC classique)

augmentant ainsi l'efficacité de la séparation (avec une pression plus importante) et la résolution chromatographique tout en réduisant le temps d'analyse [89].



**Figure 2.2:** Principe de fonctionnement de la chromatographie phase liquide [89].

➤ L'analyseur spectromètre de masse à temps de vol (Time of Flight, ToF):

L'analyseur couplé à l'UHPLC doit avoir une vitesse d'acquisition importante pour fournir suffisamment de points nécessaires à l'intégration la plus exacte du pic. Le spectromètre de masse haute résolution à temps de vol présente cette caractéristique avec sa capacité à pouvoir fournir la mesure de la masse exacte d'un composé ionisé. Une ionisation peu énergétique (couramment dite « douce ») en amont est nécessaire pour identifier l'ion moléculaire du composé d'intérêt. Plusieurs sources d'ionisation permettent le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse [90].

L'ionisation par électrospray est détaillée ci-après dans la mesure où ces travaux ont été réalisés avec cette source.

**- Source d'ionisation : l'électrospray**

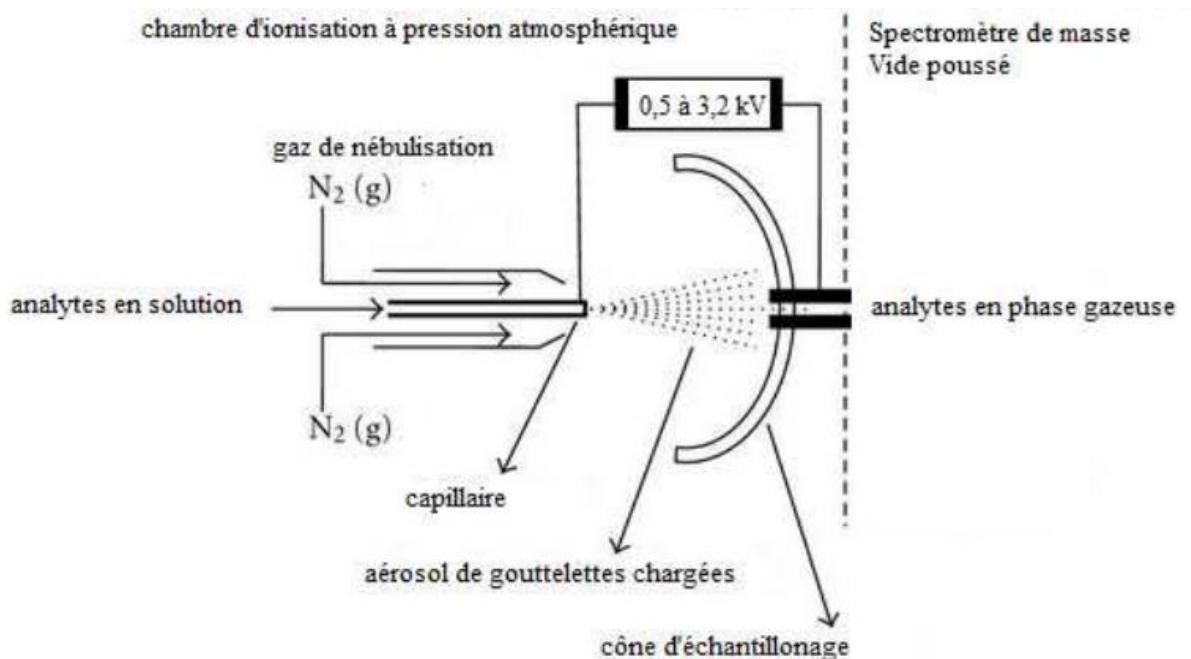
Le principe d'ionisation par source électrospray repose sur le transfert d'analytes ionisés en phase liquide vers une phase gazeuse. Les analytes répondant le mieux en électrospray sont ceux ayant des groupes fonctionnels polaires acides ou basiques. Le processus d'ionisation peut être divisé en trois étapes : la formation d'une gouttelette, sa division, et la formation d'ions à l'état gazeux.

La source électrospray (Figure 2.3) est maintenue à haute température : entre 60 et 120 °C classiquement afin de réduire la formation d'amas de solvants dans cette zone. Les analytes



et l'effluent entre dans la source à travers un capillaire métallique soumis à un fort potentiel positif (de 0,5 à 3,2 kV) ou négatif (de 0,5 à 2,6 kV). Ils ressortent ensuite du capillaire sous forme de spray de gouttelettes fortement chargées. Un flux de gaz (N<sub>2</sub>) coaxial au capillaire améliore la nébulisation, le solvant s'évapore progressivement des gouttelettes chargées (300 à 1000 L/h chauffé à 150-650 °C) produisant ainsi des gouttelettes de plus en plus fines. Les analytes chargés sont peu à peu libérés et transférés vers l'analyseur à travers un cône d'échantillonnage.

L'ionisation par électrospray forme principalement des ions [M+H]<sup>+</sup> en mode positif, et [M-H]<sup>-</sup> en mode négatif [91].

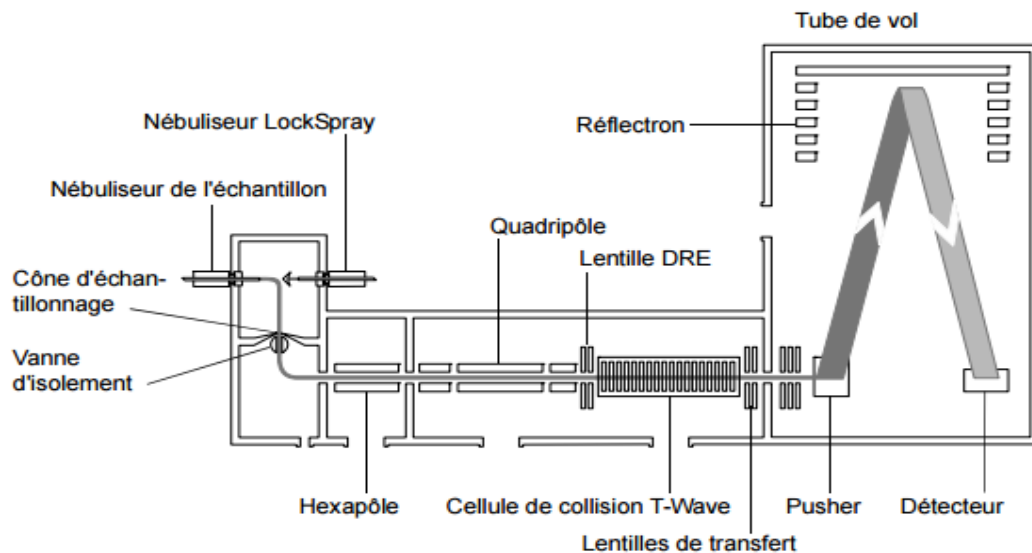


**Figure 2.3 :** Source électrospray [92].

#### - Le détecteur à temps de vol ToF:

Le principe de base d'un analyseur à temps de vol est simple (Figure 2.4). Les ions sont formés par la source électrospray : ceux possédant la même énergie cinétique traversent simultanément une région sans champs électrique ou magnétique appelée tube de vol. Le temps de parcours de l'ion jusqu'au détecteur est proportionnel à la racine carrée du rapport masse/charge. En sortie de source, les ions sont focalisés par un hexapôle et entrent dans le quadripôle. Les ions sélectionnés pénètrent ensuite dans la cellule de collision et peuvent subir une dissociation induite par collision. Une impulsion est indispensable à une séparation par temps de vol (de l'ordre de la nanoseconde) pour avoir une bonne résolution. Les ions

(même  $m/z$ ) doivent avoir un même point de départ et être ainsi regroupés sur une faible largeur spatiale et temporelle. Les ions de  $m/z$  différents atteignent le détecteur à des instants différents, permettant ainsi la constitution d'un spectre de masse [90].



**Figure 2.4:** Configuration de l'analyseur à temps de vol XEVO G2 QToF Waters [90].

### Mode opératoire :

L'analyse par UHPLC – QTOF–MS a été réalisée selon les étapes suivantes :

➤ Préparation de l'échantillon à analyser :

Les résidus secs obtenus après extraction et séchage ont été dilués dans du méthanol pour obtenir une concentration de 150ppm.

➤ Conditions analytiques :

L'identification des composés polyphénoliques a été effectuée en utilisant le système de l'exécution LC d'Acquity ultra (UHPLC) couplé à XEVO-G2-QTOF (Quadrupole-Time of flight) (Waters Corporation, Manchester, United Kingdom) équipé d'une source d'ionisation par electrospray (ESI) fonctionnant en modes positifs et négatifs, avec un manager de solvant binaire (Water Corporation, R-U).

- La colonne chromatographique d'UHPLC HSS T3, C18 (1.8  $\mu$ M, 2.1×100

millimètre, Waters Corporation) a une température de 30°C.

- La phase mobile : solvant (A) (0.1% acide formique, v/v) et solvant (B) (méthanol 100%).
- Le gradient : 0-5 minutes, 0-10% B ; 5-10 minutes, 10-15% B ;10-15 minutes, 15-20% B ;15-20 minutes, 20-30% B ;20-30 minutes, 30-40% B ;30-35 minutes, de 40-0% B.
- Le débit du solvant : 0.4 mL/min.
- Le volume d'injection : 2 µL.
- La longueur d'onde : 280 nm,
- Le balayage des données de fragmentation MS : de m/z 50 à 1500.
- Le mode d'ionisation : positif et négatif (ESI+ et ESI-).
- La température de la source electrospray est de 120°C.
- La température de desolvation : 500°C.
- La tension capillaire : 1kV.
- La tension de cône de prélèvement : 30eV.
- Le gaz de desolvation : N2 fortement pur (99.9995 %).

**Lecture :**

Le contrôle d'instrument et l'acquisition de données sont effectués par le logiciel de MassLynx (version 4.1). Les masses expérimentales exactes et les données de la fragmentation MS ont été comparées aux banques de données de metabolomics : ReSpect for Phytochemicals [92] et Mass Bank [94], et à la littérature afin d'identifier la nature des composés phénoliques.

## 2.1.2.4- Etude des activités biologiques et pharmacologiques :

### 2.1.2.4.1- Activité anti-oxydante :

L'activité anti-oxydante a été évaluée in vitro par la méthode citée dans la littérature [95]:

#### ✓ **Activité d'inhibition du radical DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) :**

Le pouvoir antioxydant des extraits testés a été estimé par comparaison avec un antioxydant de synthèse qui est le Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) et antioxydant naturel Vitamine C (Acide ascorbique) [95].

#### **Principe :**

Consiste à la capacité de céder des hydrogènes par l'extrait testé, elle est mise en évidence par une méthode spectrophotométrique qui suit la disparition de la couleur violette d'un solvant polaire comme le méthanol contenant le radical libre DPPH<sup>+</sup> (2,2-Diphenyl-1-picrylhdrazyl) à température ambiante.

Dans ce test le piégeage du radical DPPH<sup>+</sup> est suivi par la diminution de l'absorbance à 515nm, due à la réduction du radical par l'échantillon testé [96].

#### **Mode opératoire**

Le test du DPPH est réalisé en suivant la méthode décrite par [97]:

##### ➤ Préparation de la solution DPPH :

- Préparer la solution de DPPH à une concentration de 60µM dans le méthanol absolu.
- Conserver la solution obtenue à l'abri de la lumière à -4°C jusqu'à utilisation.

##### ➤ Préparation de la gamme de dilution de l'extrait testé :

- Préparer 6 tubes à essai numérotés de 1 à 6.
- Préparer une série de 6 dilutions de l'extrait testé dans du méthanol absolu.

##### ➤ Préparation de la gamme de dilution des antioxydants de référence :

- Préparer une série de 4 dilutions de l'antioxydant de synthèse (Trolox) et l'antioxydant naturel (Vit C) dans du méthanol absolu.

##### ➤ Prélever 0.3ml de chaque dilution (extrait testé et antioxydant de référence).

##### ➤ Ajouter 2.7ml de la solution méthanolique de DPPH (60µM).

- Incuber à l'abri de la lumière et à température ambiante pendant 1 heure.
- Préparer un blanc avec 0.3ml de méthanol et 2.7ml de la solution de DPPH.
- Mesurer l'absorbance à 515 nm.

Le test de l'activité anti-oxydante a été réalisé en triplicata.

**Lecture :**

Le pourcentage d'activité antioxydante (I %) est donné par la formule suivante :

$$I (\%) = [(A_{\text{blanc}} - A_{\text{ech}}) / (A_{\text{blanc}})] \times 100$$

$A_{\text{blanc}}$  : Absorbance du blanc (nm).  $A_{\text{ech}}$  : Absorbance de l'échantillon testé.

✓ **Détermination de la concentration inhibitrice de 50% des radicaux (IC50) :**

**Principe :**

Consiste à la définition de la concentration d'échantillon étudié (extrait où antioxydant de référence) nécessaire pour inhiber ou faire disparaître 50% des radicaux libres [96].

**Mode opératoire :**

- Tracer la courbe des pourcentages de l'activité antioxydante I% en fonction des concentrations de l'échantillon testé.
- Déterminer l'équation  $Y = ax + b$  de la droite linéaire obtenue, dans laquelle I% est proportionnelle à la concentration (D'après la loi de Beer Lambert). Dont,  $Y$  : représente I% et  $X$  : représente la concentration de l'échantillon testé.

$$I\% = a (\text{concentration de l'échantillon en } \mu\text{g}) + b$$

**Lecture :**

Calculer la concentration nécessaire pour obtenir une activité en % égale à 50, soit :  
 $50\% = a (\text{concentration de l'échantillon en } \mu\text{g}) + b$ , donc :

$$\text{Concentration de l'échantillon en } \mu\text{g} = (50\% - b)/a$$

#### 2.1.2.4.2- Détermination de l'activité antibactérienne:

Le test antibactérien a été réalisé par la méthode de diffusion sur milieu solide (gélose MH) sur six souches de références : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### Principe :

Cette méthode permet la mise en évidence de l'activité antimicrobienne, qui se traduit par la formation de zone d'inhibition autour du disque contenant la substance à testée (Anonyme, 2005).

#### Mode opératoire : [98]

##### ➤ Préparation de l'extrait testé :

- Préparer une dilution de 50mg/ml de DMSO de l'extrait testé.
- Agiter le mélange à l'aide d'un vortex pendant 5 minutes.
- Filtrer la solution obtenue à l'aide de filtre seringue 0.45µm.
- Conserver la solution à l'abri de la lumière à 4°C jusqu'à utilisation.

##### ➤ Préparation du milieu de culture :

- Faire fondre la Gélose Mueller Hinton (MH) dans un bain marie.
- Couler la gélose MH dans les boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4mm.
- Laisser sécher avant l'emploi.

##### ➤ Préparation de l'inoculum :

- A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.
- Détacher l'anse dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%.
- Homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ou à une DO de 0.08 à 0.10 lue à 625nm.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

➤ Réalisation de l'ensemencement :

- Tromper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en tournant) sur la paroi interne du tube, à fin de le décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas en stries serrées.

➤ Imprégnation des disques :

- Imprégner les disques celluloseux de 6 mm de diamètre avec 25µl de la solution DMSO de l'extrait testé.

➤ Application des disques :

- Déposer et presser les disques chargés par l'extrait à testé à l'aide d'une pince stérile sur la surface gélosée.

➤ Incubation :

- Incuber les boîtes ensemencées pendant 18 h à 37°C.

➤ Dépôt des disques :

- Des disques d'antibiotiques de référence de Tétracycline 30µg/MI (contrôle +) et des disques imprégnés de DMSO (contrôle -) ont été testés afin de comparer leurs activités avec l'extrait testé.

Toutes les étapes ont été effectuées dans des conditions stériles. Le test a été réalisé en triplicata.

**Lecture :**

L'activité antimicrobienne de l'extrait testé est évaluée en fonction du diamètre des zones d'inhibition de la croissance bactérienne formées autour des disques d'antibiogramme (mm ou cm), mesuré à l'aide d'un pied à coulisse.

#### **2.1.2.4.3- Détermination de l'activité anticancéreuse :**

La cyto-toxicité des extraits a été évaluée par le test de viabilité cellulaire MTT (Tétrazolium), afin d'évaluer l'activité cytotoxique des extraits testés, 1 lignée de cellule tumorales (PC3) a été utilisée dans ce test.

#### **Principe :**

Le test MTT consiste à l'étude de la cytotoxicité des échantillons par la mesure de l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules qui sont restées vivantes. Cette enzyme transforme le MTT (bromure de 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) en cristaux bleu de formazan. Après dissolution de ces cristaux, on réalise une lecture spectrophotométrique. Les densités optiques mesurées sont proportionnelles au nombre de cellules vivantes [99]. L'effet cytotoxique d'un échantillon est évalué par le pourcentage de cellules vivantes par rapport aux cellules traitées avec le solvant seul (contrôle).

#### **Mode opératoire :**

La cytotoxicité a été évaluée selon les étapes suivantes [100, 101] :

##### ➤ Décongélation des lignées cellulaires :

Les lignées cellulaires sont conservées dans un milieu de conservation dans une ampoule qui contient 1 ml de la suspension cellulaire. Le milieu de conservation est composé de 40 % (V/V) de milieu de culture RPMI, 50 % (V/V) de SVF et 10 % de DMSO (V/V), utilisé pour son effet cryoprotecteur. Ensuite, l'ampoule est conservée à - 80°C pendant 48 heures, puis dans l'azote liquide à - 196°C.

La décongélation des lignées cellulaires est réalisée comme suit :

- Incuber l'ampoule dans un bain-marie à 37°C pour une décongélation rapide car la décongélation lente provoquera un contacte lent avec le DMSO qui est cytotoxique à température ambiante.
- Transférer le contenu de l'ampoule vers un tube de 15 ml contenant 7 ml de milieu de culture RPMI froid puis homogénéiser délicatement.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 1000 rpm, les cellules sont re-suspendues dans 5 ml du milieu de culture RPMI, transférées la suspension de cellules dans des flacons de culture, puis, incubée à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

##### ➤ Passage des lignées cellulaires :



Un contrôle quotidien des cultures cellulaires toutes les 24 heures est nécessaire afin de s'assurer que la culture n'a pas été contaminée durant le processus de congélation/décongélation, ainsi que pour vérifier leur confluence et leur viabilité. Si leur confluence est adéquate un passage des cellules est réalisé avec une fréquence de 48 heures.

Le passage des cellules doit se faire sous l'hôte selon les étapes suivantes :

- Aspirer l'ancien milieu de culture et laver des cellules par du PBS.
- Additionner 0,5 ml de la trypsine- EDTA (1%) à la suspension cellulaire.
- Incuber pendant 2 à 3 minutes à 37°C, après détachement des cellules de la surface de la boîte de culture.
- Ajouter un volume de 2,5 ml du milieu de culture RPMI est ajouté.
- Homogénéiser pour bien séparer les cellules encore en agrégats.
- Réaliser la dilution convenable après comptage.
- Transférer la suspension cellulaire dans un nouveau flacon.
- Homogénéiser pour répartir uniformément les cellules.

Le reste des cellules est centrifugé, le milieu est éliminé, puis 1 ml du milieu de congélation est ajouté. Ensuite, les ampoules sont congelées rapidement à - 80°C pendant 48 heures puis dans l'azote liquide à - 196°C.

Les cellules cancéreuses doivent subir 2 passages avant d'être utilisées dans les expérimentations.

➤ Comptage des cellules :

La détermination du nombre cellulaire est une étape nécessaire qui précède la culture cellulaire. La méthode du bleu de trypan a été utilisée pour faire le dénombrement des cellules. Cette méthode permet de distinguer entre les cellules vivantes qui apparaissent claires entourées d'un halo bleu, et les cellules mortes qui apparaissent totalement bleues. Le comptage est réalisé selon les étapes suivantes :

- Mélanger un volume de 10 µl de la suspension cellulaire avec 10 µl de la solution du bleu de trypan 0,4 %.
- Incuber la solution obtenue pendant 5 minutes à température ambiante.
- Remplir les 2 chambres de la cellule malassez.
- Compter les cellules à l'aide d'un microscope à phase inverse sous un objectif X10.
- Calculer le volume du milieu à ajouter pour obtenir une concentration de  $5 \times 10^4$  cellules/ml.

➤ Evaluation de la cytotoxicité :

Après passage et dénombrement de la lignée cellulaire utilisée dans cette étude, l'évaluation de l'activité cytotoxique est réalisée selon les étapes suivantes :

- ensemencer un nombre de  $5 \times 10^3$  cellules/puits (soit 100µl de la solution cellulaire de  $5 \times 10^4$ ) dans des microplaques de 96 puits.
- Incuber pendant 24 heures à 37°C afin que les cellules adhèrent à la surface des puits.
- Aspirer l'ancien milieu de culture de chaque puits.
- Ajouter 100µl DMSO 1 % (v/v), considéré comme contrôle ou 100µl des différentes concentrations de l'extrait testé préalablement préparés dans le DMSO 1% (v/v), les concentrations finales obtenues (70, 95, 125, 160, 635, 800 et 1000 µg/ml). Trois réplicas ont été réalisés pour chaque concentration avec une répétition de la même expérience 2 fois.
- Incuber à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant 24 heures.
- Ajouter 30 µl de réactif MTT à chaque puits y compris les contrôles, et retourner la plaque dans l'incubateur à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant 6 heures.
- Aspirer le mélange de l'ancien milieu de culture et le réactif MTT.
- Ajouter 100 µl de DMSO dans chaque puits.

#### **Lecture :**

L'activité cytotoxique a été évaluée par la mesure de l'absorbance dans chaque puits à 570 nm dans un lecteur de microplaque et la détermination des valeurs moyennes à partir des lectures en triple.

Le pourcentage de viabilité des cellules/puits est calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{moyenne du nombre des cellules avec extrait}}{\text{moyenne du nombre des cellules contrôles}} \times 100$$

Le pourcentage de la cytotoxicité des extraits a été déterminé selon la formule suivant :

$$\% \text{ de cytotoxicité} = \left[ \frac{\% \text{ de viabilité (contrôle)} - \% \text{ de viabilité (extrait testé)}}{\% \text{ de viabilité de (contrôle)}} \right] \times 100$$

#### **2.1.2.5- Etude statistique :**

L'ensemble des résultats obtenus ont été exprimé en tant que moyenne  $\pm$  S.D. Les données sur le pourcentage d'antibactérienne et anti-oxydante ont été analysées statistiquement en utilisant le test t de Student apparié. Les valeurs de  $P \leq 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.

## **Partie 2.2**

### **Etude de l'huile d'Argan**

#### **2.2.1- Matériel :**

##### **2.2.1.1- Matériel biologique :**

###### ➤ **Matériel végétal :**

Les fruits de l'Arganier ont été récoltés durant la période allant du mois de Juin à Juillet 2013 de la wilaya de Mostaganem, région de Stidia (Nord ouest d'Algérie). L'authentification de l'espèce a été confirmée par Pr ABDLEKRIM ainsi qu'au niveau de l'Herbier du jardin botanique d'El Hamma, Alger.

Cette étude est portée sur l'huile d'amandons d'*Argania spinosa* L. Skeels.

###### ➤ **Matériel animal :**

Les tests pharmaco-toxicologiques, ont été réalisés sur :

- 45 souris albinos blanches de souche MNRI (Naval Médical Research Institute, Bethesda, Maryland, USA) mâles et femelles. Les souris choisies pèsent environ 20 à 25 g.
- 6 Lapins mâle et femelle de race Albinos d'environ 2.5 à 3 kg.

Le matériel animal provenant de l'animalerie du laboratoire pharmacotoxicologie du complexe Antibiotical, SAIDAL (Medea) et placé dans une animalerie à une température de 20 à 24°C, une humidité de 50 à 60 % et un éclairage de 10 h.

###### ➤ **Matériel bactériologique :**

Le matériel bactériologique a été détaillé dans la partie feuille et pulpe.

##### **2.2.1.2- Matériel non biologique :**

Le matériel non biologique est rapporté en annexe (Cf. APPENDICE C).

### 2.2.2- Méthodes :

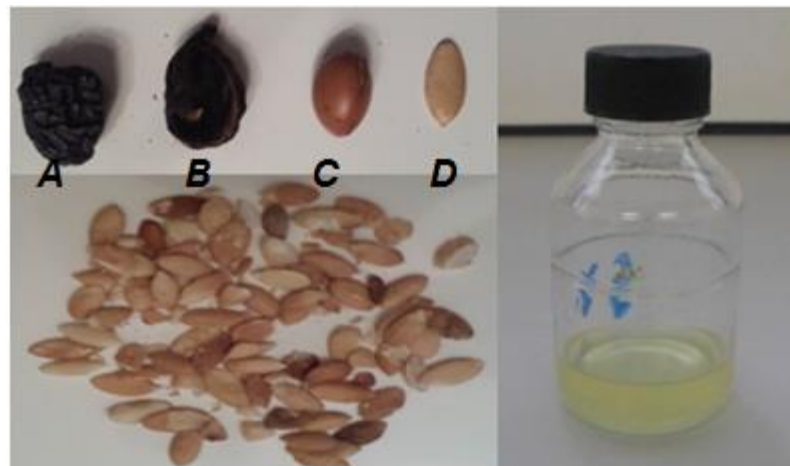
Notre étude expérimentale a été réalisée sur une période allant de l'année 2013 à 2016 au niveau des :

- Centre de recherche scientifique et technique en analyses physicochimiques (CRAPC), Bou Ismail. Algérie.
- Institut recherche européen en ingrédients naturels (ERINI), Grasse, France.
- Laboratoire de physicochimie, et de pharmacotoxicologie du complexe Antibiotical, SAIDAL de Medea, Algérie.

#### 2.2.2.1- Préparation des amandons d'*Argania spinosa* Skeels :

La préparation des amandons de l'Arganier a été réalisée selon les étapes suivantes :

- Les fruits arrivés à maturité ont été récoltés et soigneusement lavés puis séchés à l'ombre.
- La pulpe séchée a été séparée de la noix par simple écrasement manuel.
- Les noix enlevées ont été concassées de façon artisanale, les amandons ainsi obtenus ont été séchés dans une étuve à 40°C pendant 72 h.
- Notre étude a été réalisée sur les amandons broyés directement après séchage.



**Figure 2.5 :** A) Fruit, B) pulpe, C) noyau, D) amande et huile d'*Argania spinosa* L.

### 2.2.2.2- Extraction de l'huile des amandons d'*Argania spinosa* L. :

L'huile étudiée a été extraite par deux méthodes différentes :

#### ➤ **Méthode d'extraction par solvant assistée par ultrason:**

Consiste à l'utilisation d'un solvant apolaire avec traitement ultrasons afin d'extraire le maximum d'acide gras présents dans l'huile

**Mode opératoire : [102].**

L'extraction a été réalisée sur les amandons pour obtenir à la fin de l'opération l'huile d'amandons d'Arganier selon les étapes suivantes :

- Dans un bécher peser 10g de poudre d'amandons.
- Ajouter 200 ml de solvant d'extraction hexane.
- Mettre le récipient dans un bain ultrasonique, le traitement par ultrason dure 30 minutes à une température d'environ 40°C.
- Retirer le bécher du bain puis filtrer.
- Filtrat obtenu est ensuite évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif.
- L'huile obtenue est pesée puis stockée à l'abri de la lumière dans des récipients en verre opaque à 4°C jusqu'à utilisation.

#### ➤ **Méthode d'extraction artisanale par pression :**

Consiste à l'utilisation d'un procédé traditionnel comprenant le broyage des amandes et la pression manuelle de la pâte pour l'obtention de l'huile qui est séparée par décantation. Cette technique permet l'extraction de l'ensemble des composants de l'huile étudiée et a été destinée pour le dosage et la caractérisation des composés phénoliques et l'étude des activités pharmacologiques.

### 2.2.2.3- Etude phytochimique de l'huile d'Argan:

#### 2.2.2.3.1- Indices physico-chimique de l'huile d'Argan :

##### ➤ Indice de peroxyde :

##### Principe :

L'indice de peroxyde  $IP$  est le nombre qui exprime en milliéquivalents d'oxygène actif la quantité de peroxyde contenue dans 1000 g de substance.

##### Mode opératoire : [103].

L'indice de peroxyde est déterminé comme suit :

- Introduire 1g de l'huile dans une fiole conique de 250 ml à bouchon rodé,
- Ajouté 30 ml d'un mélange de 2 volumes des chloroforme et de 3 volumes d'acide acétique glacial,
- Agiter jusqu'à dissolution de l'échantillon et ajouter 0.5ml de solution saturée d'iodure de potassium,
- Agiter pendant 1 min, puis ajouter 30ml d'eau,
- Titrer par le thiosulfate de sodium 0,01 M ajouté lentement, sans cesser d'agiter énergiquement, jusqu'à ce que la coloration jaune ait presque disparu (V1 ml de thiosulfate de sodium 0,01 M),
- Ajouter 5ml de solution d'Amidon et continuer le titrage en agitant énergiquement jusqu'à disparation de la coloration.
- Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions (V2 ml de thiosulfate de sodium 0,01M).

##### Lecture :

L'indice de peroxyde est déterminé par l'équation suivante :

$$IP = \frac{(V1 - V2) \times 10}{m} \times f \text{ thiosul}$$

$IP$  : l'indice de peroxyde.  $V1$  : volume (ml) de thiosulfate de sodium utilisé pour l'échantillon.  $V2$  : volume (ml) de thiosulfate de sodium utilisé pour le blanc.  $m$ : masse (mg) de l'échantillon.  $f \text{ thiosul}$  : facteur de normalité exact de la solution de thiosulfate utilisé.

➤ **Indice d'acide : [104]**

**Principe :**

L'indice d'acide **IA** est le nombre qui exprime en milligrammes la quantité d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libres présents dans 1g de substance.

**Mode opératoire :**

Pour déterminer l'indice d'acide nous avons suivi les étapes suivantes :

- Dissoudre 1g de l'huile d'Argan dans 30ml d'éthanol à 96% en présence de 0,5 ml de solution de rouge de phénol,
- Titrer par l'hydroxyde de potassium 0,02N jusqu'à la disparition de la couleur rose (V ml de réactif titrant KOH).

Le contenu du ballon sera mis en réserve pour les analyses ultérieures (indice d'ester).

**Lecture :**

L'indice d'acide **IA** est donné par la relation.

$$IA = \frac{V \times N \times 56,11}{m} \times f_{KOH}$$

**IA** : L'indice d'acide, **V** : le volume (ml) de potasse employé, **N** : la normalité de solution, **m** : la masse (mg) de la prise d'essai, **f<sub>KOH</sub>**: facteur correction (calculée expérimentalement).

➤ **Indice de saponification :**

**Principe**

L'indice de saponification est le nombre en milligrammes de potasse (KOH), nécessaire pour transformer en savon les acides gras des triglycérides d'un gramme d'huile [106].

**Mode opératoire**

Le protocole de la norme **ISO NF 3657- 2003 [106]**, utilisée consiste à :

- Mettre 2g d'huile et 25ml de solution éthanolique de KOH (0.5N) dans une fiole muni d'un réfrigérant,
- Porter la fiole à ébullition pendant 1 heure en agitant de temps en temps,
- Arrêter le chauffage puis ajouter 2à 3 gouttes de phénolphtaléine,

- Titrer la solution savonneuse chaude par HCl (0.5N) jusqu'à décoloration de la solution.
- Effectuer un essai à blanc.

**Lecture :**

L'indice de saponification est donné par la formule suivante :

$$IS = \frac{(V0 - V1) \times 56,1 \times 0,5}{p}$$

**IS**: l'indice de saponification. **V0** : volume de la solution HCl pour l'essai à blanc en ml. **V1** : volume de la solution HCl pour l'échantillon en ml. **56,1** : masse molaire de KOH. **0,5** : la normalité de la solution HCl. **P** : poids de la prise d'essai en (g).

➤ **Indice d'ester : [103].**

L'indice d'esters **IE** est la différence de deux indices **IA** et **Is**

$$IE = Is - IA$$

➤ **Indice de réfraction:**

**Principe :**

Consiste à déterminer le rapport entre sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile à la température constante (20° C), en utilisant le réfractomètre [103].

**Mode opératoire :**

- Nettoyer la lame du réfractomètre en utilisant du papier Joseph, Déposer quelques gouttes d'huile dans la lame de réfraction et régler le cercle de la chambre sombre et claire dans la moitié,
- Effectuer la lecture des résultats en tenant compte la température ambiante [104].

**Lecture :**

L'indice de réfraction est donné la formule suivant :

$$Nd_{20} = Nd_t + 0.00035 (T - 20^\circ C)$$



**Nd t** : valeur de lecteur à la température à laquelle à été effectuée la détermination. **Nd 20** : indice de réfraction à la température 20° C. **T** : température à laquelle à été effectuée la détermination.

➤ **Indice de densité  $d_{20}$ : [104].**

**Principe :**

La densité relative d'une substance est le rapport entre la masse d'un certain volume donné de cette substance et la masse d'un volume égale d'eau à 20°C.

**Mode opératoire**

- Dans une fiole en verre à 5ml, avec une balance à précision, peser 5ml d'huile, et 5ml d'eau distillée dans une autre fiole.

**Lecture :**

Les masses volumiques obtenues selon l'équation suivante :

$$d_{20} = \frac{M \text{ éch}}{M \text{ eau}}$$

**M éch** : masse volumique de l'huile en (g). **M eau** : masse volumique de l'eau distillée en (g).

➤ **Indice d'iode :**

**Principe :**

L'indice d'iode **II** est le nombre qui exprime en gramme la quantité d'halogène, calculée par la quantité d'iode (I<sub>2</sub>) susceptible d'être fixée dans des conditions précises par 100g de huile. Il détermine l'insaturation des corps gras [106].

**Mode opératoire**

- Rincer avec l'acide acétique glacial un récipient de 250 ml muni d'un bouchon rodé,
- Introduire la prise d'essai (mg) et dissolvez la dans 15 ml de chloroforme, faire ensuite couler lentement 25 ml de solution de bromure d'iode,
- Boucher le récipient et placer le à l'obscurité pendant 30 min,
- Agiter énergiquement après addition de 10 ml d'une solution d'iodure de potassium (KI) et 100 ml d'eau distillée,
- Titrer par le thiosulfate de sodium 0,1N en agitant énergiquement jusqu'à ce que la coloration jaune ait presque disparu,
- Ajouter 5 ml de solution d'Amidon et continuer le titrage en agitant énergiquement et en ajoutant, goutte à goutte le thiosulfate 0.1N jusqu'à la disparition de la coloration.

- Effectuer un essai à blanc dans les mêmes conditions.

**Lecture :**

L'indice d'iode est donné comme suit :

$$II = \frac{12,69 \times 0,1 \times (V2 - V1)}{P}$$

**II** : L'indice d'iode ; **P** : prise d'essai en g ; **0,1** : normalité de thiosulfate de sodium utilisé ; **12,69** : nombre de g d'iode correspondant à 1ml de thiosulfate de sodium ; **V2** : le volume de thiosulfate de sodium (0,1N) utilisé pour l'essai à blanc en ml ; **V1** : le volume de thiosulfate de sodium (0,1N) utilisé pour l'échantillon.

**2.2.2.3.2- Caractérisation des acides gras par la méthode chromatographique GC – MS:**

La caractérisation des acides gras de l'huile d'Argan a été réalisée par la technique de chromatographie phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse après dérivation de ces derniers en composés volatils.

**Principe :**

Le mélange à éluer est injecté à l'aide d'une seringue. Une fois vaporisé par l'injecteur, les composés sont entraînés dans la colonne par le gaz vecteur (le plus souvent He ou N<sub>2</sub>). Suivant l'affinité avec la phase stationnaire, les composés sont séparés avant d'être détectés en sortie de colonne. Les appareils de CPG sont fréquemment couplés avec un spectromètre de masse pour l'identification des composés au fur et à mesure de leur élution [107].

**Mode opératoire :**

La nature non volatile des acides gras présents dans les huiles végétales nécessite un passage par étape de dérivation de ces derniers en esters méthyliques volatils avant analyse en GC-MS.

- Dérivation des acides gras : Selon la norme **ISO 12966, 2011** [108].

L'estérification des acides gras a été réalisée selon les étapes suivantes :

- Peser 1 g de l'huile d'Argan.
- Ajouter 5 ml de la solution methanolique BF3.
- Ajouter 1 ml de la solution KOH (1N).

- Chauffer au bain marie à une température de 90°C pendant 5 minutes.
- Refroidir la solution dans un bain de glaces.
- Ajouter 1 ml d'hexane et 2 ml de la solution saturée de NaCl.
- Agiter énergiquement puis séparer les deux phases dans une ampoule à décompté.
- Récupérer la phase apolaire contenant les ester méthyliques d'acides gras et injecter en CG-MS.

➤ Analyse des esters méthyliques d'acides gras par GC-MS :

L'identification des esters méthyliques des acides gras a été effectuée en utilisant le système d'exécution gas chromatography, Agilent 7890. Couplé avec le spectromètre de masse Agilent MSD-5975 CVL.

- La colonne chromatographique de GC capillary column HP-5MS (5% phenyl methylsiloxane), dimension of 30 m × 0.25 mm i.d × 0.25 μm d'épaisseur (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).
- La température de la colonne : 150 °C pendant 2 min, élevée à 240 °C à raison de 4 °C/min puis maintenue à 240 pendant 10 min.
- La phase mobile: Hélium.
- Le débit du gaz : 1 mL/min.
- Le volume d'injection : 2 μL.
- Le mode d'injection : Split.
- La temperature de l'injecteur: 240°C.
- La temperature du détecteur: 260 °C.
- L'impact électronique de la fragmentation : 70 eV.
- Le balayage des données de fragmentation MS : de m/z 50 à 550.

**Lecture :**

Le contrôle d'instrument et l'acquisition de données sont effectués par le logiciel de *HP ChemStation*. Les masses expérimentales exactes et les données de la fragmentation MS ont été comparées à une bibliothèque de spectre de masse *NIST* et *WILEY*, afin d'identifier la composition en acides gras de l'huile d'Argan.

### 2.2.2.3.3- Dosage des polyphénols totaux dans l'huile d'Argan:

Les polyphénols totaux sont dosés par la méthode colorimétrique de **Slinkard et Singleton, 1977 [87]**. .

#### Principe :

Le réactif de Folin Ciocalteu (FCR) est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phospho tungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phospho molybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène.

#### Mode opératoire :

L'extraction des composés phénoliques à partir de l'huile d'Argan suivit de leur dosage est réalisé comme suit :

- Extraction des composés phénoliques : [109].
- 1 g d'huile a été pesée et solubilisée avec 1 ml de n hexane et 2 ml de méthanol / l'eau (v/v, 60/40) dans un tube à centrifuger,
- Agiter l'ensemble au vortex pendant 2 min, puis centrifuger le volume total à 3000 tour / min,
- Répéter l'extraction 3 fois sur le surnageant (phase n-hexane) à fin d'extraire le maximum, tout en répétant le processus de centrifugation,
- Récupérer les parties résiduelles puis laver par le n-hexane,
- Évaporer à sec sous pression réduite à température de 35°C.
- Reconstituer les resusidus obtenus dans 1 ml de methanol.
  
- Courbe d'étalonnage :
- Préparer 8 tubes à essais numérotés de 1 à 8,
- Préparer la courbe d'étalonnage de l'acide gallique avec des concentrations de : 0.1mg, 0.075mg, 0.06mg, 0.05mg, 0.025mg, 0.0125mg, 0.00625mg, 0.03125mg par ml de méthanol,
- Ajouter pour tous les tubes 46 ml d'eau distillée et 1 ml de FCR,
- Agiter pendant 3 minutes puis ajouter 3 ml de carbonate de sodium (2%),
- Agiter pendant 2 heures à température ambiante,
- La lecture de l'absorbance se fait à 760 nm.

- Le blanc est préparé avec 1ml de méthanol, 46ml d'eau distillée et 3 ml de carbonate de sodium (2%).

**Lecture:**

Calculer la concentration des composés phénoliques selon l'équation de la droite linéaire ;  $Y = ax + b$  obtenue par le tracé de la courbe d'étalonnage. D'après la loi de Beer Lambert, l'absorbance est proportionnelle à la concentration, dont :

$$\text{Absorbance} = a (\text{concentration d'acide gallique en } \mu\text{g}) + b$$

$Y$  : représente l'absorbance.  $X$  : représente la concentration en phénols.

**2.2.2.3.4- Caractérisation des polyphénols par la méthode chromatographique UHPLC – QTOF–MS :**

La caractérisation des composés polyphénoliques présents dans l'huile d'Argan par UPLC-QTOF-MS a été réalisée selon les conditions opératoires détaillées dans la partie feuille et pulpe.

#### **2.2.2.4- Etude pharmaco-toxicologique :**

##### **2.2.2.4.1- Activité antioxydante :**

L'activité antioxydante de l'huile d'Argan été testée selon le protocole détaillé dans la partie feuille et pulpe (page : 52).

##### **2.2.2.4.2- Activité antibactérienne :**

L'activité antibactérienne de huile d'Argan pure a été testée selon le protocole détaillé dans la partie feuille et pulpe (page : 54).

##### **2.2.2.4.3- Activité anti-inflammatoire :**

L'activité anti-inflammatoire a été testée, en provoquant une inflammation locale au niveau de l'oreille de souris.

#### **Principe :**

Cette technique repose sur la détermination de l'action inhibitrice provoquée par l'application locale sur l'oreille d'une souris d'un produit inflammatoire à base d'huile de croton [110].

#### **Mode opératoire : [110].**

Ce test a été réalisé sur 15 souris maintenues à jeun pendant 18h avant le début de l'expérience, comme suit :

- Préparer la solution irritante d'huile de croton à 5% dans de l'acétone,
- Préparer la produit de référence (Témoin positif) à base d'indométacine® à une concentration de 0,5 mg/ ml d'acétone,
- Répartir les 15 souris en 3 lots :

**Lot essai (E) :** traité par l'huile d'Argan.

**Lot témoin positif (T+) :** traité par le produit de référence (indométacine®).

**Lot placebo :** traité par l'eau physiologique.

- Appliquer 10 µl de la solution irritante à l'aide d'une micropipette sur l'oreille droite et gauche de chaque souris, frotter de bas en haut à l'aide d'un coton. (Pour le lot témoin négatif, on applique la solution irritante uniquement sur l'oreille droite.),

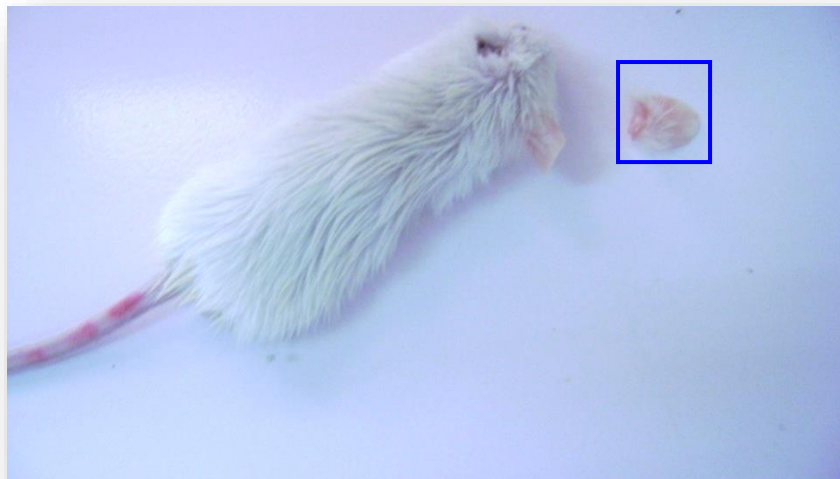
- Appliquer respectivement 20  $\mu$ l d'huile testée, produit de référence et l'eau distillée sur l'oreille droite uniquement (l'oreille gauche de chaque souris sert de contrôle) du lot E, T+ et Placébo,
- Après 4h sacrifier les souris à l'aide de l'éther, puis sectionner l'oreille droite et gauche de chaque souris suivant l'arête cartilagineuse,
- Couper à l'aide d'un perforateur de papier de 6 mm de diamètre un disque de chaque oreille,
- Peser les disques.

**Lecture :**

- Calculer les moyennes arithmétiques massiques des disques des oreilles droites OD et gauches OG pour chaque lot.
- Calculer le pourcentage de réduction de l'œdème de l'oreille traitée OD par rapport au contrôle non traitée OG, selon la formule suivante :

$$\% \text{ Réduction de l'œdème} = [(O G - O D) / O G] \times 100$$

**OD** : poids de l'oreille droite traitée. **OG** : poids de l'oreille gauche non traitée



**Figure 2.6** : Test de l'activité anti-inflammatoire de l'huile d'*Argania spinosa* L. sur l'oreille de souris (Original, 2014).

#### **2.2.2.4.4- Tolérance cutanée :**

La tolérance cutanée a été déterminée par le calcul de l'indice d'irritation primaire cutanée I.P.C.

#### **Principe**

Les médicaments destinés à un usage topique doivent subir un test de tolérance cutanée par une technique inspirée de la méthode de **DRAIZE, 1944 [111]**. Cette méthode est fondée sur l'observation des réactions cutanées provoquées par l'application quotidienne du produit à tester pendant 3 jours.

#### **Mode opératoire : [112].**

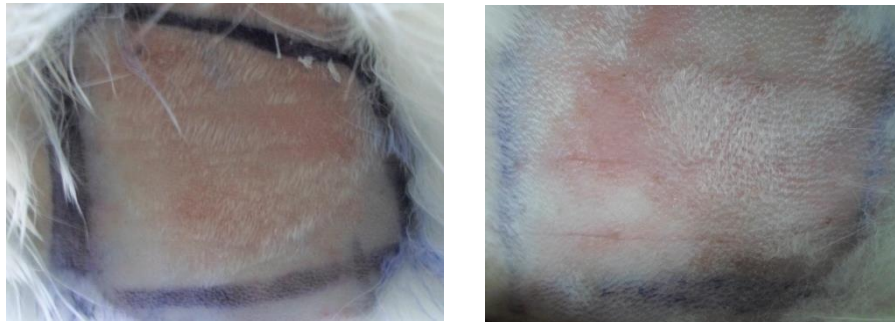
Ce test a été réalisé sur 3 lapins mâle et femelle ; la veille de l'application de l'huile à tester, les lapins ont été tondu par une tondeuse électrique munie d'un peigne de hauteur de coupe de 0,05 mm pour dégager une surface d'environ 5× 5 cm sur chacun des deux membres postérieurs.

- Avant de commencer le test nous nous assurons que les animaux présentent une peau saine et glabre,
- Lors de l'essai, les lapins sont maintenus dans des boîtes à contention,
- A jour J 0, effectuer sur le flanc droit de chaque lapin à l'aide d'une aiguille stérile, trois scarifications parallèles sur une longueur d'environ 2,5 cm espacées de 0,5 cm environ, sans atteindre le derme, c'est-à-dire sans saignement,
- Déposer à l'aide d'une seringue stérile, 1 ml de l'huile. Sur deux pièces de gaze hydrophile,
- Appliquer immédiatement sur la peau du flanc droit (scarifié) et gauche (non scarifiée),
- Maintenir les pièces de gaze en contact avec la peau sur chacune des deux zones par une bande de fixation,
- Appliquer l'huile une fois par jour pendant 3 jours.
- Après 24 h de la première application, évaluer l'irritation primaire cutanée I.P.C. (30 minutes après l'enlèvement des compresses) et de nouveau 48h, c'est-à-dire 72h après la première application.

#### **Lecture :**

Les observations sont faites sur les deux zones, sacrifiée (flanc droit) et non sacrifiée (flanc gauche), selon l'échelle numérique récapitulée dans le tableau 2.1.





**Figure 2.7 :** Test d'irritation primaire cutanée sur peaux non scarifiée et scarifiée (Original, 2014).

**Tableau 2.1 :** Échelle numérique utilisée pour le calcul du I.P.C [111].

Erythème	Score	Œdème	Score
<b>Absent</b>	<b>0</b>	<b>Absent</b>	<b>0</b>
<b>Léger</b>	<b>1</b>	<b>Très léger</b>	<b>1</b>
<b>Bien visible</b>	<b>2</b>	<b>Léger</b> (contours bien définis, gonflement apparent)	<b>2</b>
<b>Importante</b>	<b>3</b>	<b>Moyen</b> (épaisseur environ 1mm)	<b>3</b>
<b>Grave</b> (rougeur pourpre, lésion profondes)	<b>4</b>	<b>Grave</b> (épaisseur supérieure à 1mm et surface supérieure à celle de la zone d'application)	<b>4</b>

- Après l'addition des chiffres obtenus pour l'érythème et pour l'œdème après vingt-quatre heures et soixante-douze heures, d'une part pour les zones non scarifiées et d'autre part pour les zones scarifiées, la moyenne a été calculée en divisant le total par 24 selon la formule suivante :

$$\text{I.P.C.} = [(\sum \text{Scores 24h} + \sum \text{Scores 72h}) \text{ZS} + (\sum \text{Scores 24h} + \sum \text{Scores 72h}) \text{ZNS}] / 24$$

- Classer la valeur d'I.P.C du l'huile. Selon la classification de **Draize et al., 1944** [111]comme suit (Tableau 2.2):

**Tableau 2.2 :** Classification de **DRAIZE** des produits selon leur **I.P.C.** [111].

Non irritants	<b>I.P.C</b> ≤ 0,5
Légèrement irritants	0,5 < <b>I.P.C</b> < 2
Irritants	2 < <b>I.P.C</b> < 5
Sévèrement irritants	5 < <b>I.P.C</b> < 8

#### 2.2.2.4.5- Activité cicatrisante:

##### Principe :

La détermination de l'activité cicatrisante consiste à la recherche de propriétés cicatrisantes de l'huile étudiée.

La mise en évidence de l'activité cicatrisante de l'huile d'Argan a été testée sur deux types de plaies (incisions linéaires et excisions circulaires), la peau cicatrisée a été prélevée et soumise à un examen histologique à la fin du traitement.

##### Mode opératoire :

La veille de l'application du produit à tester, toutes les souris ont été tondues au niveau de la région dorsale par une tondeuse électrique pour dégager une surface d'environ 5 x 5 cm.

##### ➤ Test de cicatrisation des incisions : [113].

Ce test a été réalisé sur 15 souris répartis en 3 lots, préalablement anesthésiés par injection intramusculaire de Calmivet® (Acepromazine 0.5% ; 0.5 mg / kg I.M.). Le test a été réalisé comme suit :

- Effectuer dans des conditions stériles, sur le flanc rasé de chaque souris une incision linéaire, parallèle à l'axe vertébrale, profonde et longue de 2,5 cm à l'aide d'une lame de scalpel,
- Fermer l'incision par 4 points de suture,
- Appliquer par voie externe quotidiennement pendant 12 jours, une fois par jour :

**Lot essai (E) :** 0.5 ml d'huile d'Argan.

**Lot placebo (P):** 1 ml d'eau physiologique.

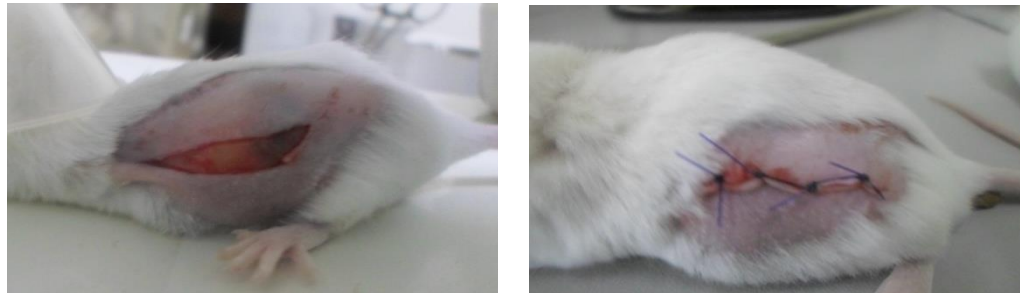
**Lot témoin positif (T+) :** une émulsion cicatrisante commercialisée Madécassol® (à base de l'extrait sec d'une plante médicinale *Centella asiatica*, Hydrocotyle 1%).

- Enlever les points de sutures après 8 jours d'application des traitements.

##### Lecture :

Réaliser une observation macroscopique le 1<sup>er</sup>, 6<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour post-incision pour suivre l'évolution de la cicatrisation en utilisant l'outil d'évaluation de blessure de Bates-Jensen (BWAT, Bates–Jensen Wound Assessment Tool) [114].

Les huit paramètres de BWAT employés pour suivre le dispositif de cicatrisation sont récapitulés dans le tableau 2.3.



**Figure 2.8 :** Test de cicatrisation sur incisions linéaires (Original, 2014).

**Tableau 2.3:** Outil d'évaluation de blessure de Bates-Jensen (BWAT, Bates–Jensen Wound Assessment Tool) [114].

Paramètres de description	1	2	3	4	5
<b>Bordures de la plaie</b>	Indistinct, diffus, les contours ne sont pas clairement visibles.	Distinct, contour clairement visible, attaché, même avec la base de la plaie.	Bien défini, non attaché à la base de la plaie.	Bien défini, non attaché à la base, enroulée dessous, épaissie.	Bien défini, cicatrice fibrotique marqué, ou hyperkeratosique.
<b>Sillon de la plaie</b>	Absence	sillon < 2 cm dans toute la plaie	Sillon de 2-4 cm participations de < 50% du siège de la plaie	Sillon de 2-4 cm participations de > 50% du siège de la plaie	Sillon > 4 cm ou perçage d'un tunnel dans tout le siège de la plaie
<b>Type d'exsudat</b>	Absence	Sanglant	Séro-sanguin, queux rouge pâle/rose	Sérotique, aqueux, claire.	Purulent, aqueux ou épais, beige/ jaune avec ou sans odeur.
<b>Quantité d'exsudat</b>	Absence, blessure sèche	Faible, la plaie humide mais pas d'exsudat observé	Faible	Modérée	Grande
<b>Couleur de la peau qui entoure la plaie</b>	Rose ou normale	Rouge brillant et/ou blanche au touché	blanche ou grise pale ou hypo pigmenté	Rouge foncé ou pourpre	Noire ou hyper pigmenté
<b>Œdème périphérique de tissu</b>	Absence de gonflement ou œdème	Pas d'œdème qui se prolonge à < 4 cm autour de la blessure	Pas d'œdème qui se prolonge à > 4 cm autour de la blessure	L'œdème se prolonge à < 4 cm autour de la blessure	Œdème crépitént se prolonge à > 4 cm
<b>Induration du tissu périphérique de la plaie</b>	Absence	Induration < 2 cm autour de la blessure	Induration 2-4cm s'étend sur < 50% autour de la plaie	Induration 2-4cm s'étend sur > 50% autour de la plaie	d'induration > 4 cm dans toute la zone autour de plaie
<b>Épithélialisation</b>	La plaie est recouverte à 100%, surface intacte.	La plaie est recouverte à 75-100%	La plaie est recouverte à 50-70%	La plaie est recouverte à 25-50%	La plaie est recouverte à < 25%

Chaque paramètre a été marqué sur une échelle de cinq points. 5 représente les résultats les plus graves et 1 représente les moins graves.

➤ **Test de cicatrisation des spots :**

Ce test a été réalisé selon les étapes suivantes : [115].

- Répartir les 15 souris en 3 lots, chacune d'entre elles a été anesthésiée par injection intramusculaire de Calmivet® (Acepromazine 0.5% ; 0.5 mg / kg, I.M.).
- Nettoyer la surface rasée avec de l'éthanol 70%,
- Dessiner un cercle de 2 cm de diamètre puis réaliser une incision en suivant la marque du cercle,
- Anesthésier localement par une injection sous cutanée de Xylocaïne et supprimer la peau à l'aide d'une lame chirurgicale stérile.
- Loger individuellement les animaux dans des cages stériles,
- Appliquer quotidiennement une fois par jour pendant 8 jours :

**Lot essai (E) :** 2 ml d'huile d'Argan.

**Lot témoin positif (T+) :** Madécassol®

**Lot placebo (P) :** 2 ml d'eau physiologique.

**Lecture :**

Mesurer la surface de la plaie en traçant ses contours sur un papier calque afin de déterminer le pourcentage de contraction le 1<sup>er</sup>, 6<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jour.

- Calculer en (mm<sup>2</sup>) la surface de la zone intérieure délimitée par les bordures de la plaie par planimétrie selon l'équation suivante :

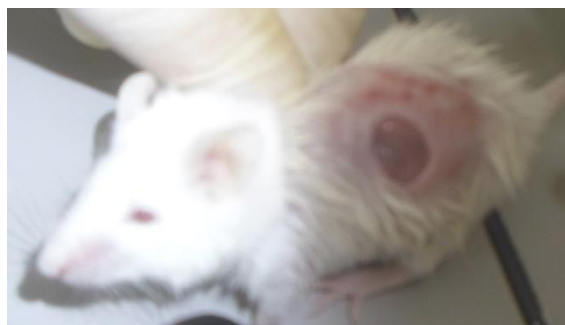
$$S = \pi r^2$$

S : Surface de la plaie.  $\pi = 3.14$ . r : Rayon du cercle.

- Calculer le pourcentage de contraction des plaies selon l'équation suivante :

$$\% \text{ de contraction de la plaie} = (S_{j1} - S_{jn}) \times 100 / S_{j1}$$

S<sub>j1</sub> : Surface de la plaie au jour 1. S<sub>jn</sub> : Surface de la plaie au jour n= 6 et 12.



**Figure 2.9 :** Test de cicatrisation sur excisions circulaires (Original, 2014).

➤ **Examen histologique de la cicatrisation :**

L'examen histologique a été réalisé sur les sections de peaux cicatrisées prélevées après avoir sacrifié les souris en fin d'expérimentation, cet examen a été réalisé dans un laboratoire spécialisé en anatomie-pathologie, selon les étapes suivantes : Fixation au formol, inclusion en paraffine, et colorations par hématoxyline-éosine.

- La fixation : a pour but la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, par immersion du matériel dans un grand volume de liquide fixateur (Formol). La durée de la fixation varie selon le volume des prélèvements.

- L'inclusion : a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans des bains de toluène) avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide, qui infiltre alors toute la pièce. Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

- Les coupes : du bloc de paraffine sont faites avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 2 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre.

- Les colorations : réalisées sur lames, accentuent les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation. Celle-ci est effectuée après déparaffinage des coupes (par la chaleur et des bains de toluène) en immergeant les lames dans des bains d'alcool de degré décroissant puis dans l'eau distillée. Les colorations la plus fréquemment utilisée associent deux colorants différents : l'Hématoxyline-Eosine (H.E.) associe l'hématéine qui colore les noyaux en violet et l'éosine les cytoplasmes en rose.

- Le montage : Après avoir subi une déshydratation (par bains d'alcool de degré croissant puis bains de toluène), les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre. On dispose alors d'une « préparation microscopique » prête à être observée au microscope optique au grossissement x100 et x400.

#### **2.2.2.5- Etude statistique :**

L'ensemble des résultats obtenus ont été exprimé en tant que moyenne  $\pm$  S.D. Les données sur le pourcentage d'anti-inflammatoire et de cicatrisation ont été analysées statistiquement en utilisant une analyse de variance (ANOVA) et le test t de Student apparié. Les valeurs de  $P \leq 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives. Les données histopathologiques étaient considérées comme non paramétriques; par conséquent, aucun test statistique n'a été effectué.

**CHAPITRE 3**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**

## Partie 3.1

### Feuille et pulpe

#### 3.1.1- Résultats :

##### 3.1.1.1- Rendement d'extraction par solvant assistée par ultrason:

Le rendement d'extraction des métabolites secondaires, représenté par la concrète alcoolique, des feuilles et des pulpes donne les résultats récapitulés dans le tableau 3.1 :

**Tableau 3.1 :** Teneurs en extraits alcooliques dans la feuille et la pulpe d'*A. spinosa* L.

	Feuille	Pulpe
<i>Matière sèche</i> : $\bar{X} \pm SD$ (g)	$20 \pm 0.01$	$20 \pm 0.01$
<i>Concrète</i> : $\bar{X} \pm SD$ (g)	$1.58 \pm 0.06$	$2.55 \pm 0.27$
<i>Pourcentage</i> : $\bar{X} \pm SD$ (%)	$7.90 \pm 0.30$	$12.74 \pm 1.38$

Les extraits bruts méthanoliques représentent 7, 90% et 12,74% de la matière végétale sèche respectivement dans les feuilles et dans la pulpe.

L'extrait sec des feuilles est caractérisé par une couleur verdâtre ayant l'odeur de la plante sèche. La pulpe donne un extrait de couleur jaune - orangée avec une odeur fruitée légèrement acide.

#### 3.1.1.2- Etude phytochimique :

##### 3.1.1.2.1- Dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes:

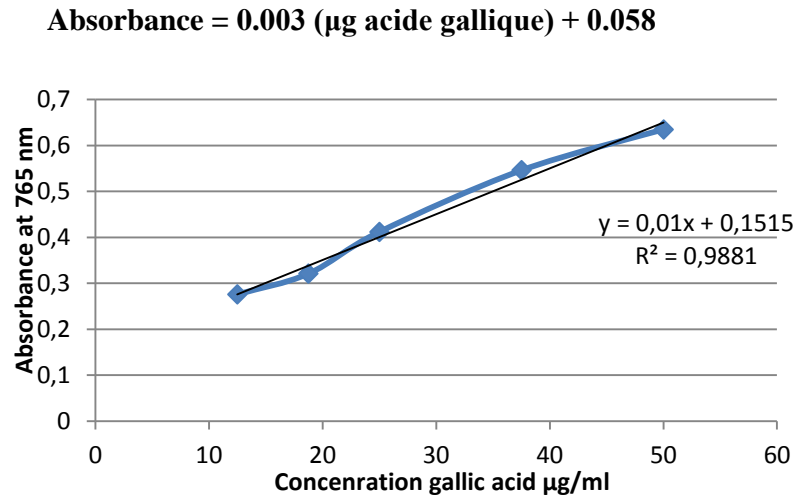
Le tracé de la courbe d'étalonnage, donne une droite linéaire dans laquelle l'absorbance est proportionnelle à la concentration de l'étalon utilisé :

- Pour le dosage des polyphénols (Figure 3.1) : Le coefficient de corrélation obtenu est **r = 0.988**, selon l'équation suivante :

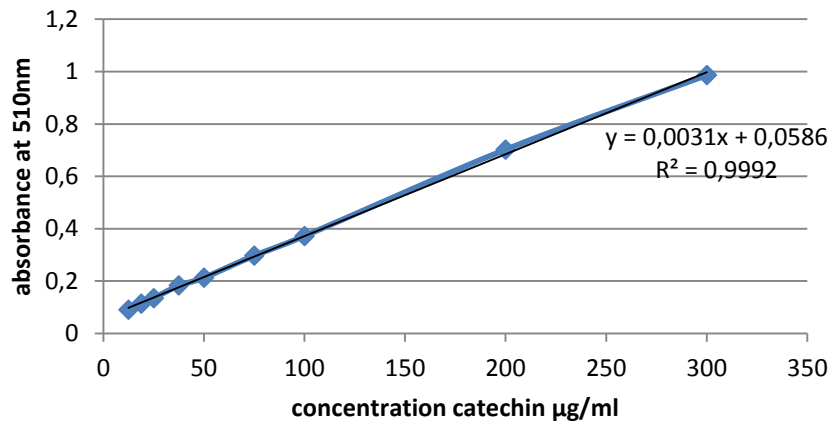
$$\text{Absorbance} = 0.01 (\mu\text{g acide gallique}) + 0.151$$

- Pour le dosage des flavonoïdes (Figure 3.2) : Le coefficient de corrélation obtenu est **r = 0.999**, selon l'équation suivante :





**Figure 3.1 :** Courbe d'étalonnage et courbe de tendance de l'acide gallique pour dosage des polyphénols totaux.



**Figure 3.2 :** Courbe d'étalonnage et de tendance de la catéchine pour dosage des flavonoïdes.

Les résultats obtenus par extrapolation des valeurs de la densité optique obtenue pour les extraits de feuille et de pulpe sur les courbes d'étalonnage sont résumés dans le tableau 3.2.

**Tableau 3.2 :** Teneur en composés phénoliques et flavonoïdes dans les extraits de feuille et pulpe d'*Argania spinosa* L.

	Polyphénols totaux		Flavonoïdes	
	$\mu\text{g/ mg d'extract sec}$ $\bar{X} \pm \text{SD}$	% $\bar{X} \pm \text{SD}$	$\mu\text{g/ mg d'extract sec}$ $\bar{X} \pm \text{SD}$	% $\bar{X} \pm \text{SD}$
<i>Feuille</i>	$221.39 \pm 5.69$	$22.14 \pm 0.57$	$66.85 \pm 3.35$	$6.68 \pm 0.33$
<i>Pulpe</i>	$44.86 \pm 0.85$	$4.48 \pm 0.08$	$34.02 \pm 0.98$	$3.40 \pm 0.10$

D'après le tableau 3.2, on constate que les polyphénols totaux représentent 22.14 et 4.48 % de l'extrait sec respectivement dans la feuille et la pulpe d'Arganier. Les flavonoïdes sont également présents dans les deux extraits avec un taux de 6.68% dans les feuilles et 3.40% dans la pulpe.

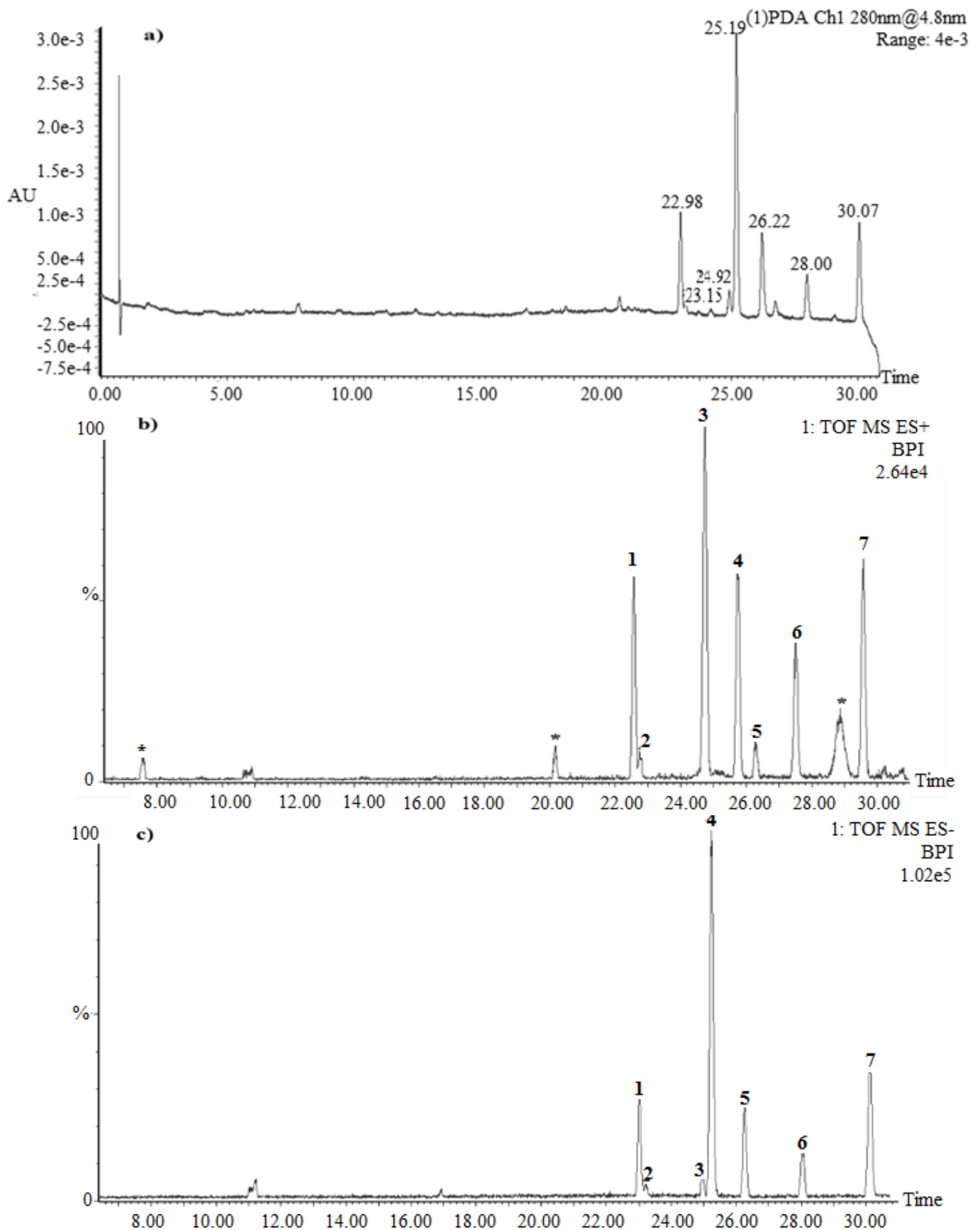
### **3.1.1.2.2- Caractérisation des polyphénols par la méthode chromatographique UHPLC – QTOF–MS :**

L'utilisation de la méthode chromatographique UHPLC – QTOF–MS a rendu possible la caractérisation des principaux composés des extraits analysés, toutes les molécules détectées ont été identifiées en étudiant leur fragmentation MS obtenue par l'ESI en modes positif et négatif, aussi bien que par la comparaison avec les données de la littérature.

#### **➤ Caractérisation des polyphénols dans l'extrait de feuilles :**

Dans la présente étude, l'analyse de l'extrait de feuilles réalisée par UPLC QTOF-ESI-MS en modes d'ionisation positif et négatif a confirmé la présence de flavonoïdes. Le chromatogramme enregistré à 280 nm (a) et le chromatogramme enregistré en BPI (Base Peak Intensity) ont montré neuf pics en mode ES+ (b) et 6 pics en mode ES- (c) (Figure 3.3).

La composition phytochimique a été partiellement dévoilée, les composés phénoliques trouvés sont principalement des flavonols (myricétine et quercétine et leurs dérivés). La comparaison des temps de rétention de ces composés, m/z observé, la formule moléculaire calculée, les fragments MS détectés avec les travaux antérieurs réalisés sur les métabolites dans différentes plantes sont récapitulés dans le tableau 3.3.



\* Composés non-identifiés en ESI+ et non-détectés en ESI-.

**Figure 3.3** : Chromatogramme UPLC-PDA à 280 nm (a), chromatogramme UPLC-ES+ en mode d'ionisation positive (b), et chromatogramme UPLC-ES- en mode d'ionisation négative (c) de l'extrait méthanolique de feuilles d'*A. spinosa* L.

**Tableau 3.3:** Résultats des spectres de masse en modes positif et négatif des composés phénoliques identifiés par analyse UPLC–PDA-ESI-QTOF-MS dans l'extrait méthanolique de feuilles d'*Argania spinosa* L. La colonne de références rapporte les travaux antérieurs sur les métabolites dans différentes plantes.

Peak	Rt min ESI+/ESI-	[A+H] <sup>+</sup> m/z expérimentale	[M-H] <sup>-</sup> m/z expérimentale	Masse exacte Calculée	Formule	Molécule proposée	Références
1	22.59/23.03	319.04	479.08	480.09	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>13</sub>	Myricétine-3-galactoside	[116, 117]
2	22.76/23.24	319.04	479.08	480.09	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>13</sub>	Myricétine-3-glucoside	[116, 117]
3	24.74/24.90	319.04	449.08	450.07	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>12</sub>	Myricétine-3-xyloside	[116,117]
4	25.71/25.24	303.05	463.09	464.09	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	Quercétine-3-galactoside	[117, 118]
5	26.29/26.27	303.05	463.09	464.09	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	Quercétine-3-glucoside	[117, 118]
6	27.50/28.03	303.05	433.08	434.08	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>11</sub>	Quercétine-3-arabinofuranoside	[116]
7	29.57/30.12	303.05	447.09	448.10	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub>	Quercétine-3-rhamnoside	[116, 117]

Deux principaux flavonols, la quercétine et la myricétine avec leurs dérivés glycosidiques ont été détectés dans l'extrait méthanolique d'*Argania spinosa* L.

Les deux modes d'ionisation ESI<sup>+</sup> et ESI<sup>-</sup> sont complémentaires dans l'identification des flavonols et leurs dérivés glycosides. En effet, les polyphénols se présentent en molécules protonées [M+H]<sup>+</sup> et déprotonées [M-H]<sup>-</sup> dans les deux modes d'ionisation, mais le mode d'ionisation positif affiche aussi des pics correspondant aux aglycones protonés [A+H]<sup>+</sup> [119, 120]. En conséquence, l'identification des flavonols et leurs glycosides a été faite en premier lieu, par l'analyse de l'extrait en ESI mode positif puis par l'identification de tous les pics qui en résultent sur la base des molécules déprotonées (ESI mode négatif). De cette façon il était possible de caractériser sans équivoque tous les composés isobares (même poids moléculaire) avec différents glycone, permettant ainsi de dévoiler le spectre de masse de l'ion de l'aglycone protoné en raison de la perte des résidus de sucre (pertes : 132, pentoside ; 146, deoxyhexoside; 162, hexoside).

Les spectres de masse  $m/z = 319.04$  et  $m/z = 303.05$  dans l'ESI en mode positif correspondent aux aglycones protonés [A+H]<sup>+</sup> de : dérivés glycosidique de myricétine et dérivés glycosidiques de quercitine respectivement.

L'ordre d'élution chromatographique en ESI- (Figure 3.3) et comme suit : les trois pics (1, 2 et 3) ont été attribués à myricétine -3-galactoside, myricétine -3-glucoside et myricétine -3-xylosie avec [M-H]<sup>-</sup> correspondant à  $m/z = 479.09$ ,  $449.09$  et  $479.09$ , respectivement. Le pic 4 a été attribués à quercétine-3-galactoside (hypéroside) avec [M-H]<sup>-</sup> à  $m/z = 463.09$ , suivi de quercétine-3-glucoside (isoquercétine, pic 5) avec [M-H]<sup>-</sup> à  $m/z = 463.09$  isobare de l'hyperoside. 6 pic a été identifié comme étant la quercétine-3-arabinoside (avicularin) avec [M-H]<sup>-</sup> à  $m/z = 434.08$ . Le dernier pic (7) d'élution est un dérivé de quercétine : quercétine-3-rhamnoside avec [M-H]<sup>-</sup> à  $m/z = 447.09$ .

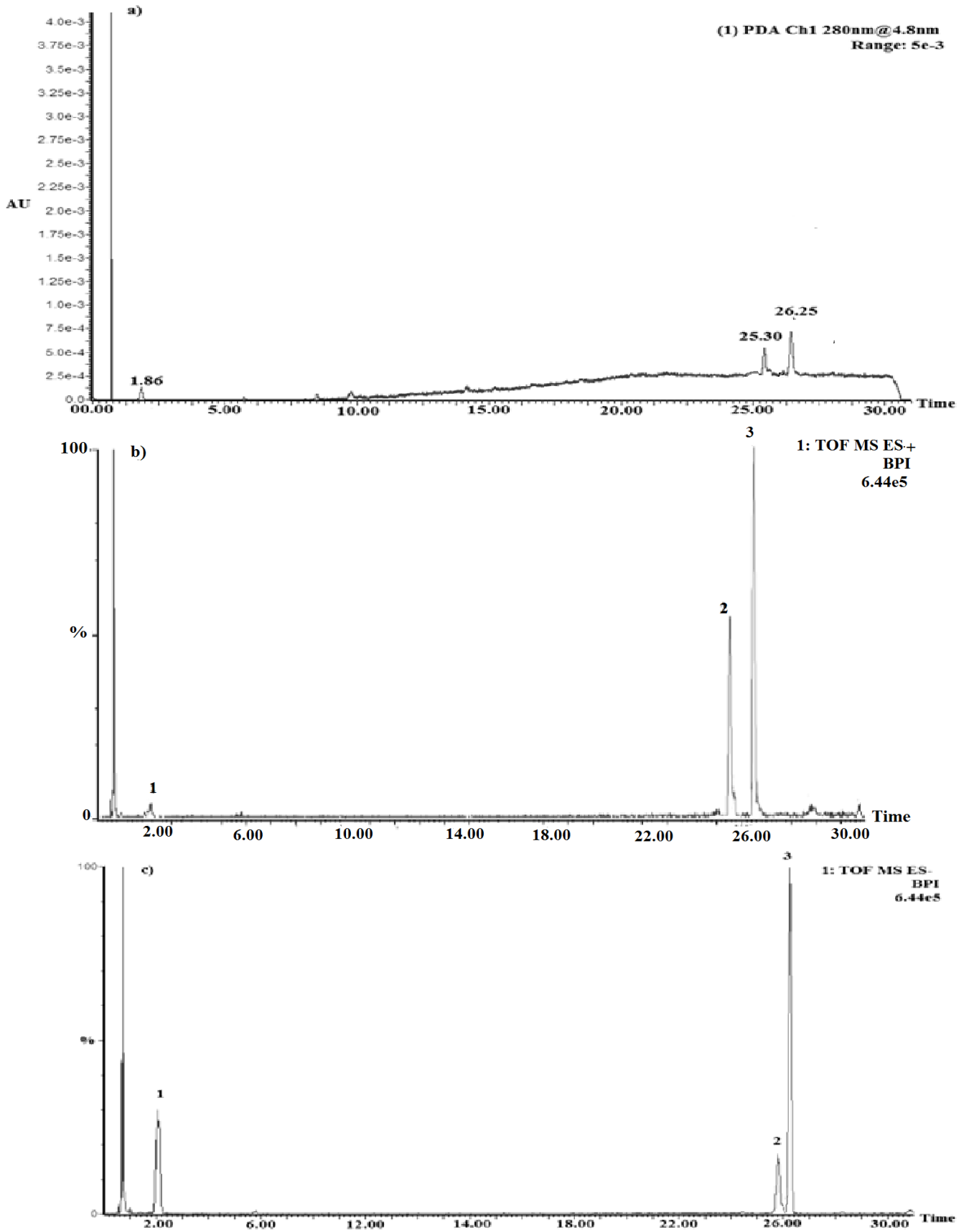
L'ordre d'élution des dérivés de quercétine et myricétine concorde avec la littérature [121, 122, 123].

Trois composés (\*) détectés en mode ESI négatif (Figure 2, c) à 7.60, 20.18 et 28.86 min avec  $m/z = 118.06$ ,  $131.04$  et  $381.12$  respectivement. Cependant aucune de ces données n'a pas été suffisante pour identifier exactement la nature de ces molécules.

#### ➤ **Caractérisation des polyphénols dans l'extrait de pulpe :**

Dans la présente étude, l'analyse de l'extrait pulpe réalisée par UPLC-QTOF-ESI-MS en modes d'ionisation positif et négatif a confirmé la présence de composés phénoliques. Le chromatogramme enregistré à 280 nm (a) et le chromatogramme enregistré en BPI (Base Peak Intensity) ont montré neuf pics en mode ES<sup>+</sup> (b) et 6 pics en mode ES<sup>-</sup> (c) (Figure 3.4).

La composition phytochimique a été incomplètement dévoilée, les composés phénoliques trouvés sont un acide phénolique et deux flavonols (dérivés glucosidiques de quercétine). La comparaison des temps de rétention de ces composés,  $m/z$  observé, la formule moléculaire calculée et les fragments MS détectés avec les travaux antérieurs réalisés sur les métabolites dans différentes plantes sont récapitulés dans le tableau 3.4.



**Figure 3.4 :** Chromatogramme UPLC-PDA à 280 nm (a), chromatogramme UPLC-ES+ en mode d'ionisation positive (b), et chromatogramme UPLC-ES- en mode d'ionisation négative (c) de l'extrait méthanolique de pulpe d'*A. spinosa* L.

**Tableau 3.4 :** Résultats des spectres de masse en modes positif et négatif des composés phénoliques identifiés par analyse UPLC–PDA-ESI-QTOF-MS dans l'extrait méthanolique de pulpe d'*Argania spinosa* L. La colonne de références rapporte les travaux antérieurs sur les métabolites dans différentes plantes.

Peak	Rt min ESI+/ESI-	[A+H] <sup>+</sup> <i>m/z</i> expérimentale	[M-H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> expérimentale	Masse exacte Calculée	Formule	Molécule proposée	Références
1	1.82/01.90	171.04	169.08	170.09	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>13</sub>	Acide gallique	[116, 117]
2	25.50/25.80	303.05	463.09	463.09	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	Quercétine-3-galactoside	[117, 124]
3	26.25/26.70	303.05	463.09	463.09	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> O <sub>12</sub>	Quercétine-3-glucoside	[116, 124]

En mode ESI+ un acide phénolique a été détecté à 1.80 min, ce dernier se présente en molécules protonées [M+H]<sup>+</sup> avec *m/z* = 171.04 identifié comme étant acide gallique.

Deux principaux flavonols ont été également détectés en mode ESI+/ESI- à 25.50/25.80 min et 26.25/26.70 min respectivement.

En mode ESI+, Le spectre de masse *m/z* = 303.05 correspond aux aglycones protonés [A+H]<sup>+</sup> de dérivés glycosidique de quercétine.

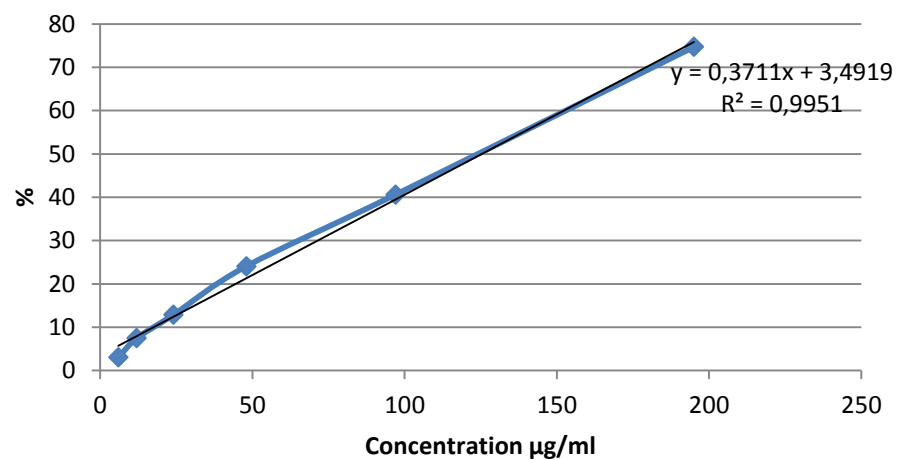
L'ordre d'élution chromatographique en ESI- (Figure 3.4) est comme suit : le pic 1 a été attribué à acide gallique avec [M-H]<sup>-</sup> correspondant a *m/z* = 171.04, Le pic 2 a été identifié comme quercétine-3-galactoside (hypéroside) avec [M-H]<sup>-</sup> à *m/z* = 463.09, suivi de quercétine-3-glucoside (isoquercétine, pic 3) avec [M-H]<sup>-</sup> à *m/z* = 463.09 isobare de l'hyperoside.

### 3.1.1.3- Etude des activités biologiques et pharmacologiques :

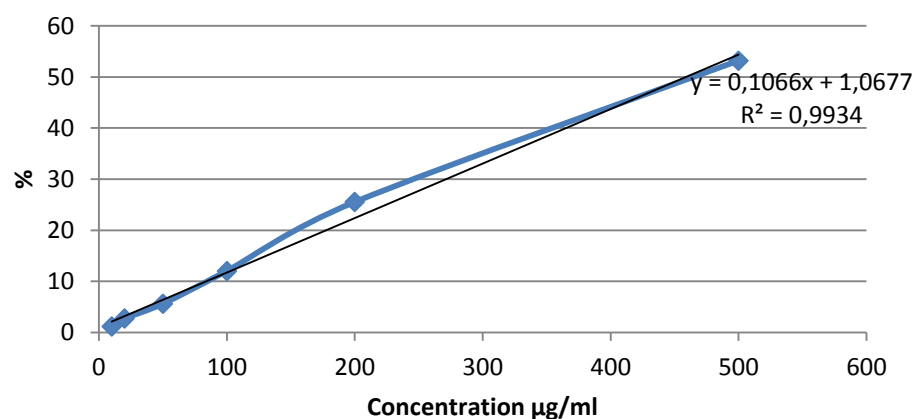
#### 3.1.1.3.1- Activité anti-oxydante :

DPPH est un radical stable, qui pourrait être facilement employé pour la détection des propriétés antioxydantes de différents composés. Le potentiel antioxydant de l'extrait de feuilles et de pulpe d'*Argania spinosa* L. a été déterminé en utilisant le test de piégeage de radicaux libres DPPH.

La cinétique de réduction du DPPH par l'extrait de feuilles et de pulpe d'*Argania spinosa* L. et les produits de référence Trolox et acide ascorbique est présentée dans les Figures 3.5, 3.6, 3.7 et 3.8 respectivement.

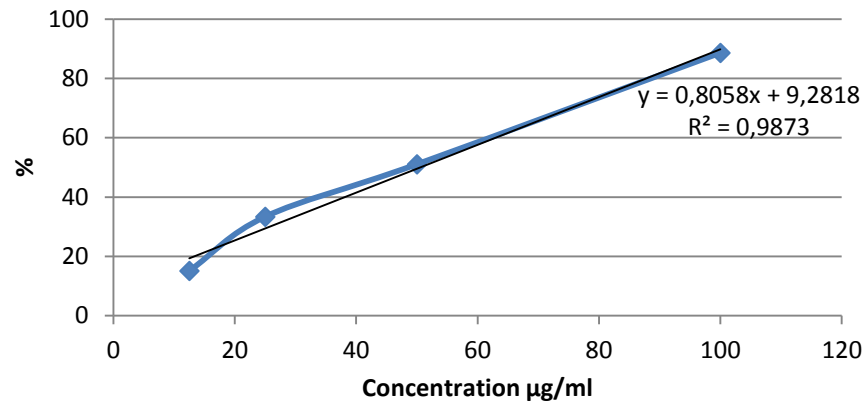


**Figure 3.5 :** Courbe représentative des pourcentages de réduction du radical libre DPPH par l'extrait de feuille d'*A. spinosa* L.

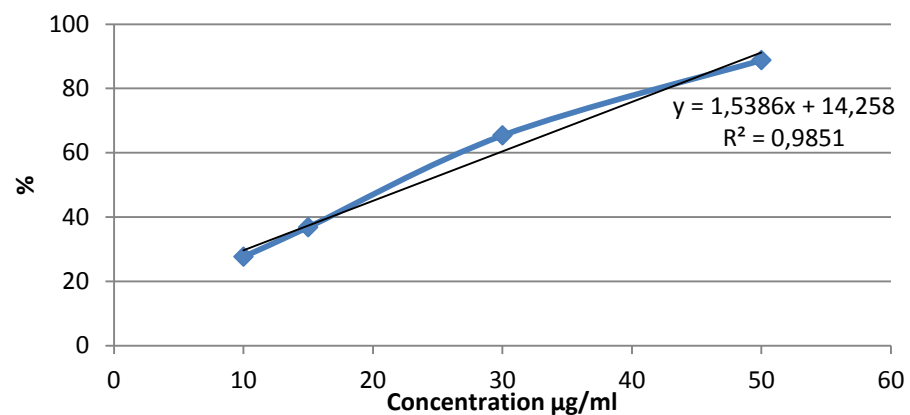


**Figure 3.6 :** Courbe représentative des pourcentages de réduction du radical libre DPPH par l'extrait de pulpe d'*A. spinosa* L.





**Figure 3.7 :** Courbe représentative des pourcentages de réduction du radical libre DPPH par l'antioxydant de référence TROLOX.



**Figure 3.8 :** Courbe représentative des pourcentages de réduction du radical libre DPPH par l'antioxydant de référence Acide ascorbique.

L'extrait de feuilles et de pulpe d'*Argania spinosa* L. ont montré une activité anti-radicalaire dépendante de la concentration de l'extrait testé (Figure 3.5 et 3.6). La valeur IC50 exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du radical libre DPPH de 50 %.

Le tableau 3.5 montre une comparaison des valeurs IC50 de l'extrait de feuilles, de pulpe d'Arganier et des produits antioxydants de références Acide Ascorbique et Trolox.

**Tableau 3.5:** Les valeurs IC50 de l'extrait de feuilles d'*Argania spinosa* L., Trolox et Acide Ascorbique.

	Extrait de feuilles	Extrait de pulpe	Trolox	Acide ascorbique
<b>IC50</b> $\bar{X} \pm SD$ (µg)	125.595 ± 1.868	462.182 ± 21.204	50.55 ± 0.785	23.238 ± 0.318

L'activité anti-radicalaire a montré une différence significative entre les extraits d'*Argania spinosa* L. et les antioxydants de références Trolox et Acide Ascorbique ( $p < 0.05$ ).

Parmi les quatre composés, l'acide ascorbique représente le composé le plus actif, le pouvoir antioxydant du Trolox n'est pas significativement différent de celui de l'Acide ascorbique. On obtient ainsi l'ordre décroissant de l'activité antioxydante suivant l'IC50 acide ascorbique > Trolox > Extrait de feuilles > Extrait de pulpe.

### 3.1.1.3.2- Activité antibactérienne :

Les extraits de feuilles et de pulpe d'*Argania spinosa* L. ont été examinés pour leur activité antibactérienne contre les bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Yersinia enterocolitica*.) et les bactéries Gram positif (*Stahoylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilus*). Le pouvoir inhibiteur de l'extrait de feuilles et de pulpe a été évalué par la présence ou absence des zones d'inhibition et les diamètres de ces zones, les résultats sont présentés dans le tableau 3.6.

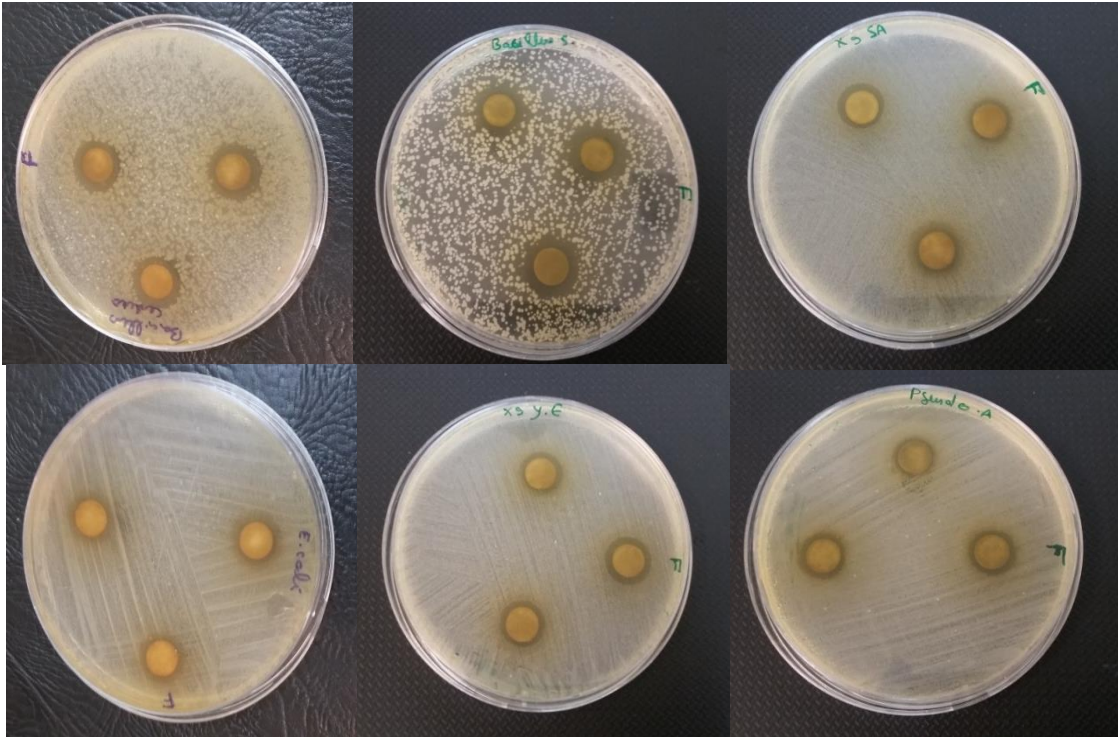
**Tableau 3.6:** Activité antibactérienne des extraits de feuilles et de pulpe d'*Argania spinosa* L. par la méthode de diffusion sur milieu solide.

Souche bactérienne	Extrait feuilles DI (mm)	Extrait Pulpe DI (mm)	Contrôle (+) Tetracycline DI (mm)	Contrôle (-) DMSO DI (mm)
Gram + :				
<i>Stahoylococcus aureus</i> ATCC 25923	12 ± 1	-	27 ± 0.8	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	15.6 ± 0.5	14 ± 1	29 ± 0.3	-
<i>Bacillus subtilus</i> ATCC 6633	16.6 ± 1.1	14 ± 1	22 ± 1.8	-
Gram - :				
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10.3 ± 1.5	-	29 ± 0.6	-
<i>Pseudomonas aerogenosa</i> ATCC 27853	11.6 ± 0.5*	-	12 ± 1.2	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	13.3 ± 0.5	-	24 ± 0.7	-

- : Absence de zones d'inhibition.

DI: Diamètre d'Inhibition.

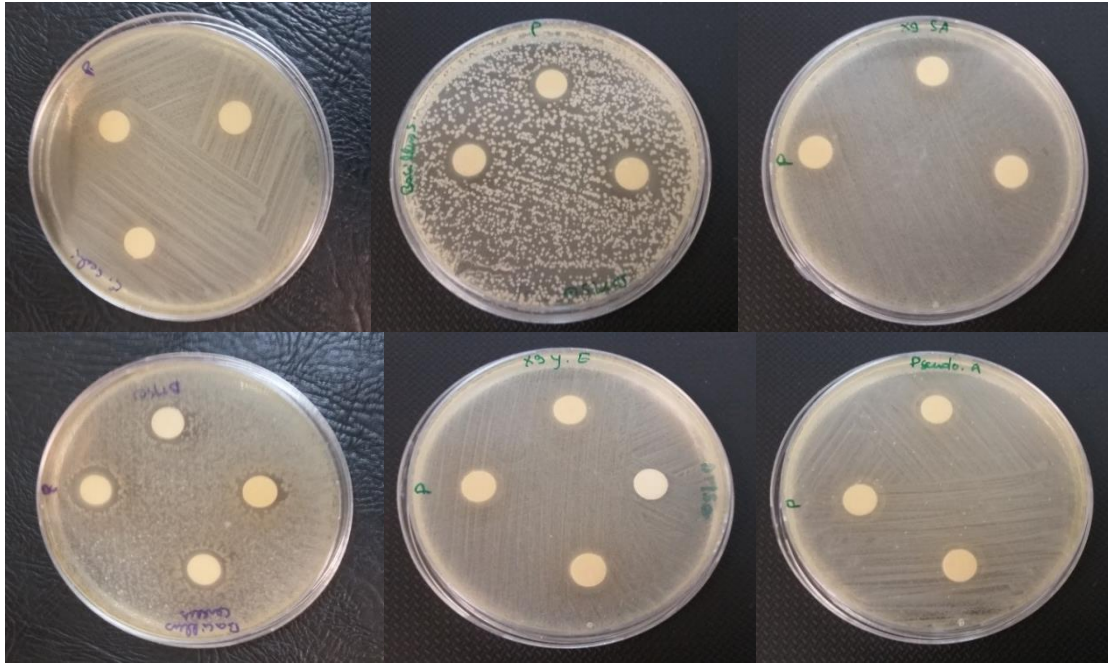
\*: différence Non significative ( $p < 0.05$ ) (APPENDICE C).



**Figure 3.9 :** Antibiogramme sur milieu solide de l'extrait de feuilles d'*Argania spinosa* L.

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait de feuilles d'Arganier a inhibé la croissance bactérienne avec des diamètres de zone d'inhibition s'étendant de 12 à 17 mm pour des bactéries Gram (+) et de 10 à 14 mm pour des bactéries Gram (-) (Figure 3.9).

Les résultats du test antibactérien sur les souches Gram (+) ont indiqué que l'extrait testé est doté d'un pouvoir antibactérien considérable contre *Bacillus subtilis* (16 mm), suivi par *Bacillus cereus* (15 mm) et *Staphylococcus aureus* (12 mm). Pour les souches Gram (-), la zone d'inhibition maximale qui a été enregistrée est de 13 mm sur *Yesinia enterocolitica*, suivi de *Pseudomonas aerogenosa* (12 mm). Cependant, on a observé la zone d'inhibition la plus faible contre *Escherichia coli* (11 mm).



**Figure 3.10 :** Antibiogramme sur milieu solide de l'extrait de pulpe de fruits d'*Argania spinosa* L.

L'extrait de pulpe n'a, cependant, produit aucun effet vis-à-vis toutes les souches testées mises à part les souches *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis* (Figure 3.10) sur lesquelles on a constaté un effet modéré avec des diamètres de zones d'inhibition ne dépassant pas les 15mm.

Comparé aux extraits de feuilles et de pulpe, la tétracycline a inhibé la croissance des bactéries Gram (+) et Gram (-), donnant des diamètres de zones d'inhibition allant de 13 à 29 mm.

Les tests statistiques ont confirmé la différence significative entre le pouvoir antibactérien des extraits testés et l'antibiotique de référence.

### 3.1.1.3.3- Activité cytotoxique :

Le potentiel cytotoxique de l'extrait brut de feuilles et de pulpe d'*Argania spinosa* L. a été évalué contre la lignée cellulaire PC 3 (human Prostate cancer cell line). L'effet cytotoxique de ces extraits sur la lignée PC3 a été étudié en utilisant différentes concentrations s'échelonnant entre 50 à 1000 µg/mL pour la feuille et entre 1000 à 2000 µg/mL pour la pulpe (Figures 3.11 et 3.12). Les résultats ont dévoilé que les extraits testés

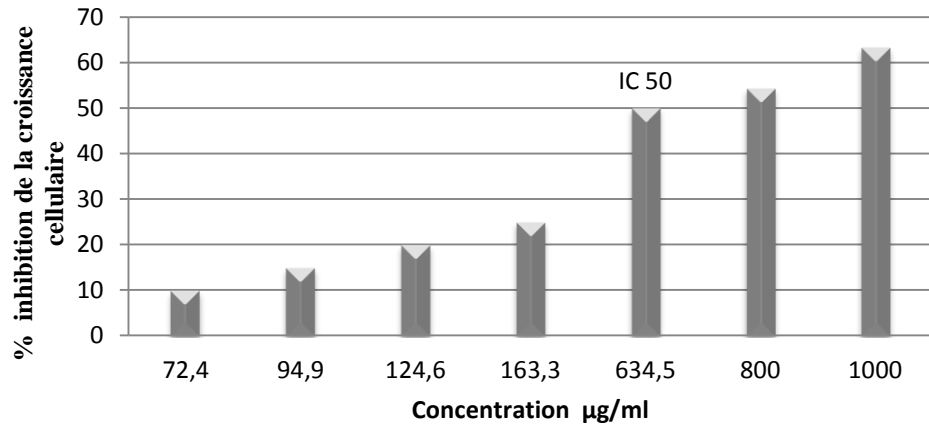
induisent une diminution de croissance des cellules PC3 d'une manière dépendante à la concentration (Tableau 3.7).

**Tableau 3.7 :** Pourcentage d'inhibition de la croissance de cellules tumorales PC3 par les extraits de feuilles et de pulpe de fruits d'*Argania spinosa* L.

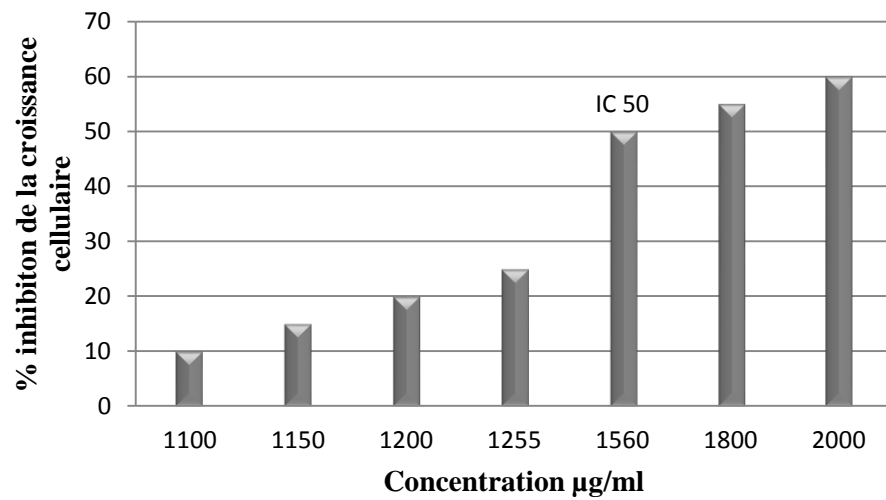
	<b>Concentration de l'extrait de feuille d'<i>A. spinosa</i> L. (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>				
	<b>100</b>	<b>800</b>	<b>600</b>	<b>400</b>	<b>200</b>
<b>% d'inhibition de la croissance de PC3</b>	63.23 $\pm$ 0.87	54.27 $\pm$ 1.24	48.97 $\pm$ 1.48	47.86 $\pm$ 1.53	28.03 $\pm$ 2.70
	<b>Concentration de l'extrait de pulpe d'<i>A. spinosa</i> L. (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>				
	<b>2000</b>	<b>1800</b>	<b>1600</b>	<b>1400</b>	<b>1200</b>
<b>% d'inhibition de la croissance de PC3</b>	58.47 $\pm$ 0.89	55.23 $\pm$ 1.81	53.11 $\pm$ 1.97	37.57 $\pm$ 1.66	4.52 $\pm$ 1.17

Les résultats obtenus montrent également que l'extrait de feuilles d'*Argania spinosa* L. induit à des concentrations de 70  $\mu\text{g/mL}$  et de 120  $\mu\text{g/mL}$ , 10% et 20% d'inhibition de la croissance cellulaire, respectivement ; et à 600  $\mu\text{g/mL}$  et 1000  $\mu\text{g/mL}$ , plus que la moitié du taux de la croissance a été inhibée. Cependant l'extrait de pulpe de la même plante agit à des concentrations plus élevées ; à des concentrations de 1000, 1300, 1800 et 2000  $\mu\text{g/mL}$ , l'extrait inhibe respectivement 10, 30, 55 et 60% la croissance des cellules tumorales.

Les valeurs d'IC 50 (la concentration qui inhibe 50 % le taux de croissance de la population cellulaire en présence du composé d'intérêt) déterminées pour les extraits de feuilles et de pulpe d'*A. spinosa* L. contre la lignée cellulaire PC-3, sont indiquées dans les Figures 3.11 et 3.12. Ces résultats indiquent que l'extrait de feuilles induit une meilleure activité antiproliférative que l'extrait de pulpe.



**Figure 3.11 :** Activité cytotoxique de l'extrait de feuilles d'*Argania spinosa* L. par le test MTT.



**Figure 3.12 :** Activité cytotoxique de l'extrait de pulpe d'*Argania spinosa* L. par le test MTT.

### 3.1.2- Discussion :

Notre matériel végétal extrait par la méthode d'ultrason a donné des rendements de l'ordre de 7,90% pour la feuille et 12,74% pour la pulpe. On constate que la pulpe est plus riche en concrète polaire comparée aux feuilles.

L'extrait sec des feuilles est caractérisé par une couleur verdâtre ayant l'odeur de la plante sèche. La pulpe a donné un extrait de couleur jaune - orangée avec une odeur fruitée légèrement acide.

Le dosage des polyphénols totaux a donné des taux de 22.14 et 4.48 % de l'extrait sec respectivement dans la feuille et la pulpe d'Arganier. Les flavonoïdes ont également été dosés dans les deux extraits et présentent un taux de 6.68% dans les feuilles et 3.40% dans la pulpe. Considérant les organes, les feuilles accusent des teneurs plus importantes en polyphénols et flavonoïdes, la répartition inégale de ces derniers dans les différents organes d'une même plante a été rapporté par plusieurs auteurs **El Haci et al., 2012 [125]**, **Falleh et al., 2007 [126]**

Des études similaires ont été réalisées par et **Djidel et al., 2014 [127]**.sur l'extrait de feuilles d'*Argania spinosa* L. récoltée à Tindouf, les résultats révèlent des teneurs semblables en polyphénols (256,16 mg GA. Eq / g) et en flavonoïdes (6,685%). **Fahmi et al., 2013 [128]**, rapporte aussi dans leurs travaux que le taux des flavonoïdes dans l'extrait alcoolique de feuilles d'Arganier du Maroc est compris entre 4% et 17% ce qui est en concordance avec nos résultats.

L'extrait de la pulpe du fruit d'Arganier a également fait l'objet d'une étude réalisée par **El Babili et al., 2010 [129]**. Les auteurs rapportent dans leurs résultats que l'extrait de pulpe renferme un taux de 89.4 mg GA. Eq/g de polyphénols et 3.4 mg QER. Eq/ g de flavonoïdes. De plus, **El Monfalouti et al., 2012 [130]**, révèlent un taux de polyphénols de 75.8 mg GA. Eq/g, ces derniers sont nettement supérieurs à nos résultats. Cette différence reflète selon **Ćujić N et al., 2016 [131]** le fait que la présence de composés phénoliques peut être affectée par la maturité de la plante à la récolte, les conditions climatiques et l'emplacement géographique, les écotypes végétales et la méthode et le temps d'extraction.

L'analyse phytochimique des extraits bruts d'*Argania spinosa* L. réalisée par UPLC-ESI-QTOF-MS a révélé que l'extrait de feuilles est plus riche en composés phénoliques que celui de la pulpe; les résultats ont également indiqué la présence de deux groupes de composés phénoliques dans l'extrait de feuilles, notamment les dérivés glucosidiques de

quercétine et de myricétine. En outre, cette caractérisation qualitative a montré que l'extrait analysé contient sept flavonols : myricétine-3-galactoside, myricétine-3-glucoside, myricétine-3-xyloside, quercétine-3-galactoside, quercétine-3-glucoside, quercétine-3-arabinofuranoside et quercétine-3-rhamnoside. Des travaux antérieurs ayant pour objet la caractérisation phytochimique préliminaire de l'extrait de feuilles d'*Argania spinosa* L. par simple HPLC, ont révélé la présence d'hyperoside, quercitrine, myricétine et myricétine -3-galactoside [128, 132, 133].

L'extrait de pulpe du fruit d'Arganier a été également caractérisé par la même méthode les résultats révèlent la présence de trois composés phénoliques ; un acide phénolique (acide gallique) et deux dérivés glucosidiques de quercétine (quercétine-3-galactoside et quercétine-3-glucoside), ces résultats concordent avec les travaux antérieurs portés sur la caractérisation des composés phénoliques dans l'extrait de pulpes d'*Argania spinosa* L. par LC-MS/MS, qui ont indiqué la présence d'acide gallique, catéchine, rutine, quercitrine, et ses dérivés glucosidiques [134].

D'après la littérature, l'analyse phytochimique par l'UPLC-QTOF-ESI-MS de l'extrait de feuilles et de pulpe d'*Argania spinosa* L. n'a jamais fait l'objet d'une étude antérieure.

Les activités biologiques de feuilles et de pulpe d'*Argania spinosa* L. pourraient être attribuées aux différentes classes de composés phénoliques [135]. Ces activités ont été insuffisamment investiguées dans les travaux précédents. La présente étude est donc la première ayant comme objectif l'évaluation des propriétés antimicrobiennes et cytotoxiques des extraits bruts de feuilles et de pulpe d'Arganier.

La capacité de piégeage des radicaux libres de l'extrait de feuilles et de pulpe a été déterminée par le test DPPH. Le résultat a indiqué une activité assez intéressante avec IC<sub>50</sub>~125 µg (feuille) et IC<sub>50</sub>~462 µg (pulpe). On constate que l'extrait méthanolique des feuilles a présenté une valeur d'IC<sub>50</sub> inférieure à celle d'extrait de pulpe. L'activité antioxydante présentée par les feuilles est donc meilleure que celle de la pulpe.

D'autres études ont été réalisées afin d'évaluer l'effet antioxydant des extraits méthanoliques de feuilles d'Arganier. **Djidel et al., 2014 [127]**, rapportent dans leurs travaux que l'extrait brute de feuilles d'*Argania spinosa* L. récoltées dans la région de Tindouf présente une IC<sub>50</sub> = 410 µg ce dernier est nettement supérieur à nos résultats.

on suggère que les composés phénoliques puissent contribuer directement à l'activité antioxydante en donnant des électrons aux radicaux réactifs dus à leurs groupes d'hydroxyle et retardant ainsi les réactions en chaîne radicalaire [136]. **Cai et al., 2004**



[137], ont rapporté qu'une corrélation positive et significative existe entre l'activité antioxydante et le contenu phénolique total, indiquant que les composés phénoliques sont les antioxydants dominants dans les plantes médicinales.

L'effet antimicrobien d'extrait de feuilles et de pulpe a été testé sur six espèces bactériennes pour évaluer leurs activités. En effet, au moment présent, il n'y a aucune étude dans la littérature concernant le pouvoir antibactérien des feuilles et de pulpe d'*Argania spinosa* L. Dans le présent travail, on a observé que l'extrait brut de feuilles possède une propriété inhibitrice contre toutes les bactéries Gram positif et négatif contrairement à l'extrait de pulpe qui a montré une activité très faible voire nulle sur certaines souches testées.

Les tests statistiques ont confirmé la différence significative entre le pouvoir antibactérien des extraits testés et l'antibiotique de référence, ceci pourrait être attribué au fait que nos extraits sont des mélanges de plusieurs composés comparés à l'antibiotique qui est un composé pur [124].

Les résultats obtenus révèlent également que l'activité antimicrobienne de l'extrait de feuilles d'*Argania spinosa* L. ne dépend pas de la morphologie de la bactérie et de la nature du Gram, donnant un effet inhibiteur contre *S. aureus* (Gram (+), cocci) aussi bien que contre *E. coli* (Gram (-), bacille).

A la lumière des résultats obtenus par l'étude phytochimique qui montre que l'extrait de feuilles renferme une quantité supérieure de composés phénoliques par rapport à la pulpe, on déduit que la teneur en polyphénols peut être impliquée dans l'inhibition de la croissance bactérienne. Plusieurs études ont prouvé que l'activité antibactérienne est proportionnelle à la teneur en polyphénols totaux dans la plante [138], ce qui explique une inhibition bactérienne plus élevée par les feuilles par rapport à la pulpe.

Dans nos extraits, les dérivés de quercétine, et de myricétine et l'acide gallique sont les principaux composés phénoliques détectés. L'effet antibactérien de ces composés a été préalablement démontré [139, 140].

La cytotoxicité d'extraits d'*Argania spinosa* L. testée sur la lignée cellulaire PC3 a également fait objet de cette étude, les données ont révélé que les extraits de feuilles et de pulpe inhibent la croissance des cellules tumorales de 50% à une concentration de 0.6 mg et 1.5mg respectivement.

Des études récentes ont dévoilé que l'utilisation des antioxydants naturels réduit le risque des diverses maladies tumorales, ces composés principalement phénoliques ont un effet protecteur et peuvent empêcher ou renverser le développement du cancer à chaque étape de la carcinogenèse par différentes voies : Activation du mécanisme cytoprotectif pour éviter l'apparence des conditions précancéreuses, inhibition de la promotion de cancer et blocage de la progression de cancer [136, 141]. **Wätjen et al., 2005 [142]**, ont démontré que la quercétine et le myricétine sont les classes les plus efficaces des flavonoïdes pour la prévention du cancer. Ces derniers agissent par induction de la cytotoxicité des cellules tumorales, fragmentation d'ADN oligo-nucléosomique et activation de l'enzyme caspase.

Suite à cette étude, on déduit que les feuilles et la pulpe d'*Argania spinosa* L. ont un potentiel pharmacologique intéressant et en particulier la feuille, tels-que le pouvoir cytotoxique, antimicrobien et antioxydant, dû principalement à leur profil phytochimique.

## Partie 3.2

### Huile d'Argan

#### 3.2.1- Résultats :

##### 3.2.1.1- Extraction et rendement :

Après concassage, séparation des amandons, broyage et extraction, nous avons obtenu un rendement en huile d'Argan variant entre **38** et **39%**.

##### 3.2.1.2- Identification des caractéristiques de la matière première :

Les caractères morphologiques et organoleptiques de l'huile étudiée sont illustrés dans le tableau suivant :

**Tableau 3.8** : Caractères morphologiques et organoleptiques de l'huile d'Argan.

<b>Huile d'amandons d'<i>Argania spinosa</i></b>	
<b>Caractères morphologiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Aspect</b> : Liquide huileux fin.</li> <li>- <b>Couleur</b> : Translucide de couleur jaune tend vers le clair.</li> </ul>
<b>Caractères organoleptiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Odeur</b> : Douce agréable.</li> <li>- <b>Saveur</b> : Douce et neutre.</li> </ul>

##### 3.2.1.3- Indices physico-chimiques de l'huile d'Argan :

Les propriétés physico-chimiques tels que : la densité, l'indice de réfraction, l'indice d'acide, l'indice d'ester, l'indice de peroxyde, l'indice de saponification et l'indice d'iode, constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'huile et de sa fraîcheur. Le tableau 3.9 récapitule les résultats des mesures réalisées.

**Tableau 3.9 :** Caractéristiques physico-chimiques de l'huile d'Argan.

	<b>Huile Marocaine</b> (Charrouf et Guillaume,2008)	<b>Huile Marocaine</b> (Maurin, 1992)	<b>Huile Algérienne</b> Etudiée
<b>Densité relative</b>	0,9	0,906-0,919	0,909
<b>Indice de réfraction</b>	1.463-1.468	1,4685-1,4708	1,467
<b>Indice d'acide g%</b>	1,0-1,3	0,49-2,96	1,62
<b>Indice d'ester</b>	-	-	190,69
<b>Indice de peroxyde</b>	0,7	5,2-7	4,2
<b>Indice de saponification</b>	190,9-195,2	189-196	192,3
<b>Indice d'iode</b>	96,1-98,1	92-102	94,76

Les résultats révèlent une valeur de densité pour l'huile d'Argan étudiée estimée à 0,907. L'indice de réfraction, l'indice d'acide et l'indice de peroxyde ont donné des valeurs respectives de 1,466; 1,6 et 4,2.

La détermination de l'indice de saponification de l'huile d'Argan a donné une valeur de 193,5 mg de KOH/g. Cependant, l'indice d'iode de l'huile d'Argan a été estimé à 94,76 (g d'iode /100g d'huile).

### 3.2.1.4- Etude de la composition chimique de l'huile d'*A. spinosa* L. :

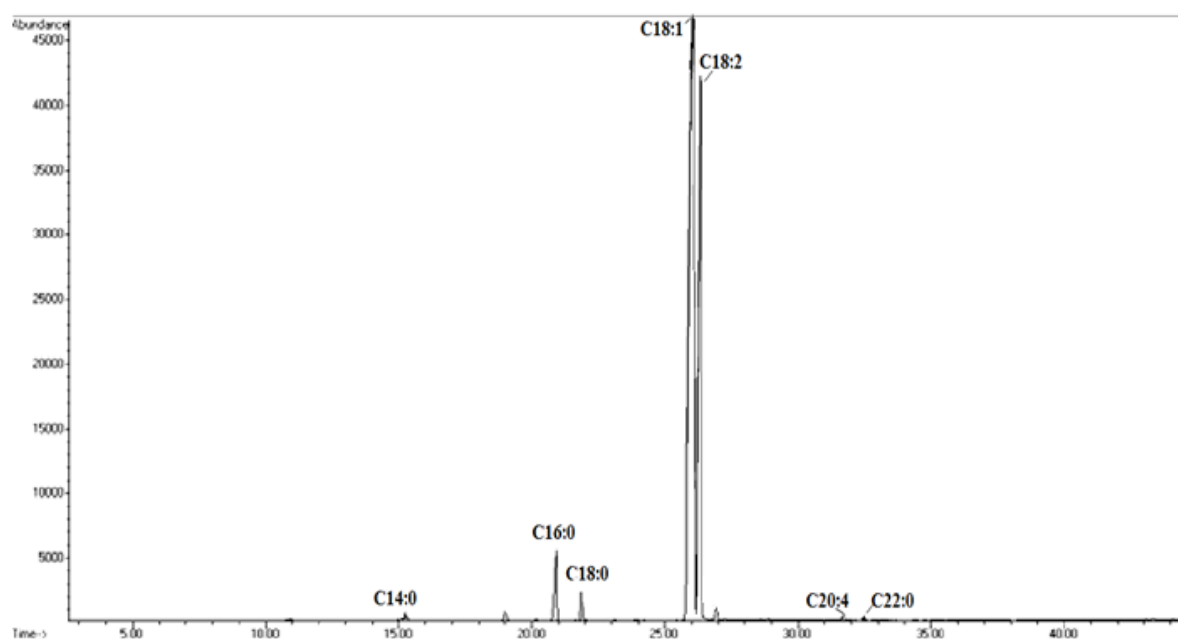
#### 3.2.1.4.1- Caractérisation des acides gras par la méthode chromatographique GC – MS:

L'analyse GC-MS (Figure 3.13) a permis la caractérisation de plus de 98% des acides gras présents dans l'huile étudiée. Les résultats sont récapitulés dans le tableau 3.10.

**Tableau 3.10:** Résultats d'analyse semi-quantitative des acides gras de l'huile graines d'argan par GC-MS.

<i>Acide gras</i>	<b>C:D</b>	<b>% Huile Algérienne</b> Etudiée	<b>% Huile Marocaine</b> (Charrouf et al.,1998)
Myristique	14:0	00.42	0.15
Palmitique	16:0	14.17	12-13
Stéarique	18:0	04.16	5-7
Oléique	18:1	44.00	43-49.1
Linoléique	18:2	35.69	29.3-36
Arachidonique	20:4	00.20	0.3-0.5
Behénique	22:0	00.07	>0.1
<i>Total</i>		<b>98.71</b>	

(C:D = nombre de Carbone: Double liaison)



**C14:0** Myristic acid; **C16:0** Palmitic acid; **C18:0** Stearic acid; **C18:1** Oleic acid; **C18:2** Linoleic acid; **C20:4** Arachidonic acid; **C22:0** Behenic acid.

**Figure 3.13:** Chromatogramme GC-MS de la composition en acide gras méthyle ester de l'huile d'*A. spinosa* L.

Les résultats révèlent que l'huile d'Argan étudiée contient sept acides gras habituellement rencontrés dans les huiles végétales, en l'occurrence les acides : myristique, palmitique, palmitéolique, stéarique, oléique, linoléique et linoléique.

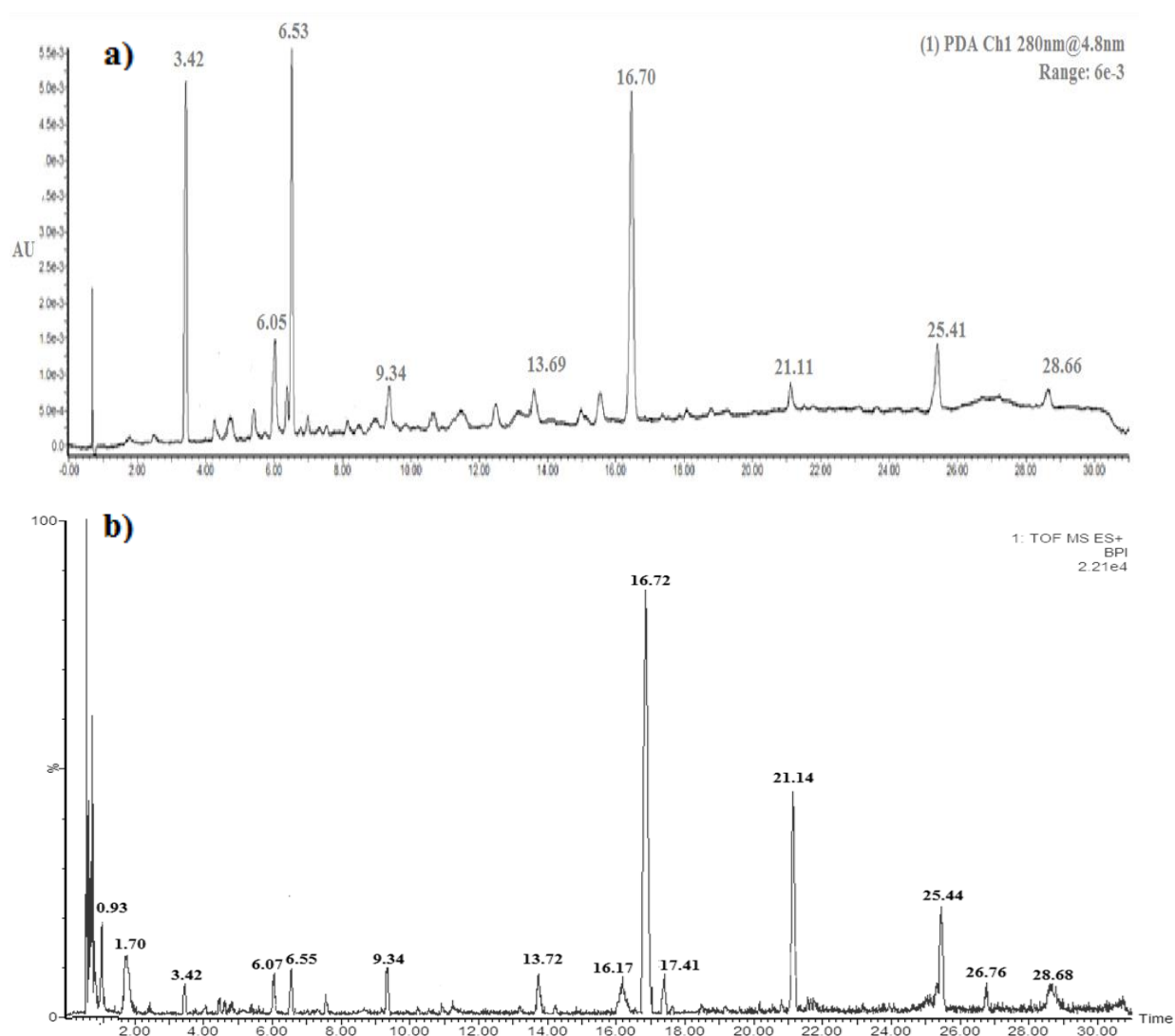
Les principaux acides gras détectés sont donc les mono-insaturés (oméga-9) et les di-insaturés (oméga-6) ces derniers représentent environ 80% des acides gras totaux avec les pourcentages respectifs de 44% et 35%. D'autres acides gras saturés avec des valeurs significatives ont été détectés comme l'acide palmitique (14.16%) et l'acide stéarique (4.16%).

#### **3.2.1.4.2- Dosage des polyphenols totaux dans l'huile d'Argan :**

Le tracé de la courbe d'étalonnage, donne une droite linéaire dans laquelle l'absorbance est proportionnelle à la concentration de l'acide gallique (Figure 3.1), avec un coefficient de corrélation  $r = 0.98$ . L'extrapolation des valeurs de DO de l'extrait de l'huile d'Argan sur la courbe d'étalonnage a donné une teneur en polyphénols d'environ  $58.57 \pm 0.055$  mg/kg de huile.

### 3.2.1.4.3- Caractérisation des polyphénols par la méthode chromatographique UHPLC – QTOF–MS :

L'analyse de l'extrait de feuilles réalisée par UPLC QTOF-ESI-MS en mode d'ionisation positif a confirmé la présence de composés phénoliques. Le chromatogramme enregistré à 280 nm (a) et le chromatogramme enregistré en BPI (Base Peak Intensity) sont représentés dans la figure 3.14.



**Figure 3.14 :** Chromatogramme UPLC-PDA à 280 nm (a) et chromatogramme UPLC-ES+ en mode d'ionisation positive (b) de l'extrait phénolique de l'huile d'*A. spinosa* L.

La composition phytochimique a été plus ou moins dévoilée, les composés phénoliques trouvés sont principalement des acides phénoliques. Les comparaisons des temps de rétention de ces composés, m/z observé, la formule moléculaire calculée, les fragments MS détectés avec les travaux antérieurs réalisés sur les métabolites dans différentes plantes sont récapitulées dans le tableau 3.11.

**Tableau 3.11 :** Résultats des spectres de masse en modes positif des composés phénoliques obtenus par extraction liquide-liquide de l'huile d'*Argania spinosa* L. et identifiés par analyse UPLC–PDA-ESI-QTOF-MS.

Peak	Rt (min)	Experimental Mass	Calculated Mass	m/z Major and Characteristic ion	Compounds	Ref.
<i>Compounds Identified</i>						
02	01.70	526.15	526.16	527.15	Demethyloleuropein	[144, 146]
03	03.42	163.98	164.04	164.98	Coumaric acid	[144]
04	06.07	179.98	180.08	180.98	Caffeic acid	[145, 147]
05	06.55	168.01	168.04	169.01	Vanillic acid	[94]
07	16.72	139.21	139.03	139.12	Gallic acid	[93, 94]
<i>Compounds not identified</i>						
					<b>Formula</b>	
01	00.93	202.05	202.08	203.05	C9 H14 O5	/
06	09.34	420.16	420.31	421.16	C23 H40 N4 O3	/
08	17.41	158.09	158.11	159.09	C8 H16 N O2	/
09	21.14	172.10	172.07	173.10	C8H12O4	/
10	25.44	160.06	160.07	161.06	C8 H8 N4	/
11	28.68	380.13	380.16	381.13	C17 H24 N4 O6	/

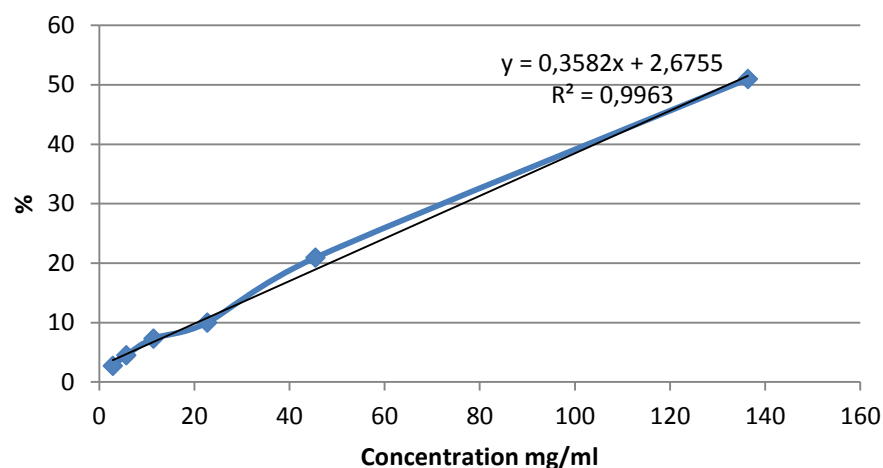
L'examen du chromatogramme TOF-MS en mode positif de l'extrait phénolique d'huile d'Argan révèle la présence de composés phénoliques : acide coumarique (m/z 164.98), caféique (m/z 180.98), vanillique (m/z 168) et gallique (m/z 139.12). Les MS des ions détectés montrèrent la molécule protonée  $[M_H]^+$  comme ion caractéristique. Ces composés ont été identifiés par la comparaison des masses exactes expérimentales et la fragmentation de MS avec les banques de données de métabolomiques et la littérature disponible (tableau 3.11). L'analyse TOF-MS en mode positif a également montré la présence de Demethyloleuropein (m/z 527.18), phénol simple appartenant à la famille des tyrosols.

D'autres molécules ont été détectées, cependant aucune des données de masse ou de fragmentation MS n'a été suffisante pour identifier leur nature exacte, des formules chimiques ont été proposées pour chaque molécule.

### 3.2.1.5- Etude pharmaco-toxicologique :

#### 3.2.1.5.1- Activité antioxydante :

Le pouvoir antioxydant exprimé par le pourcentage de réduction du radical libre DPPH par des différentes concentrations de l'huile d'Argan est illustré dans la Figure 3.15.



**Figure 3.15 :** Courbe des pourcentages de réduction du radical libre DPPH par l'huile d'*A. spinosa* L.

On remarque que le pourcentage de réduction du radical libre DPPH varie de manière dose dépendante c'est à dire proportionnellement à la concentration de l'huile, la valeur  $IC_{50}$  définie comme étant la concentration de l'antioxydant (huile) nécessaire pour réduire 50% du DPPH a été déterminée graphiquement.

Les valeurs d' $IC_{50}$  obtenues sont récapitulées dans le tableau 3.12:

**Tableau 3.12:** Les valeurs  $IC_{50}$  de l'extrait de l'huile d'*Argania spinosa* L., Trolox et Acide Ascorbique.

	Huile d' <i>A. spinosa</i> L. ( $\mu\text{g}$ )	Trolox ( $\mu\text{g}$ )	Acide ascorbique ( $\mu\text{g}$ )
$IC_{50}$ $\bar{X} \pm SD$	$132.420 \pm 6.961$	$50.55 \pm 0.785$	$23.238 \pm 0.318$

La valeur de l' $IC_{50}$  obtenue est de l'ordre de 132mg/ml, cette dernière est très élevée par rapport aux antioxydants de références testés ( $IC_{50}$  Trolox= 50.55  $\mu\text{g}$ ,  $IC_{50}$  Acide ascorbique= 23.23  $\mu\text{g}$ )



### 3.2.1.5.2- Activité antibactérienne :

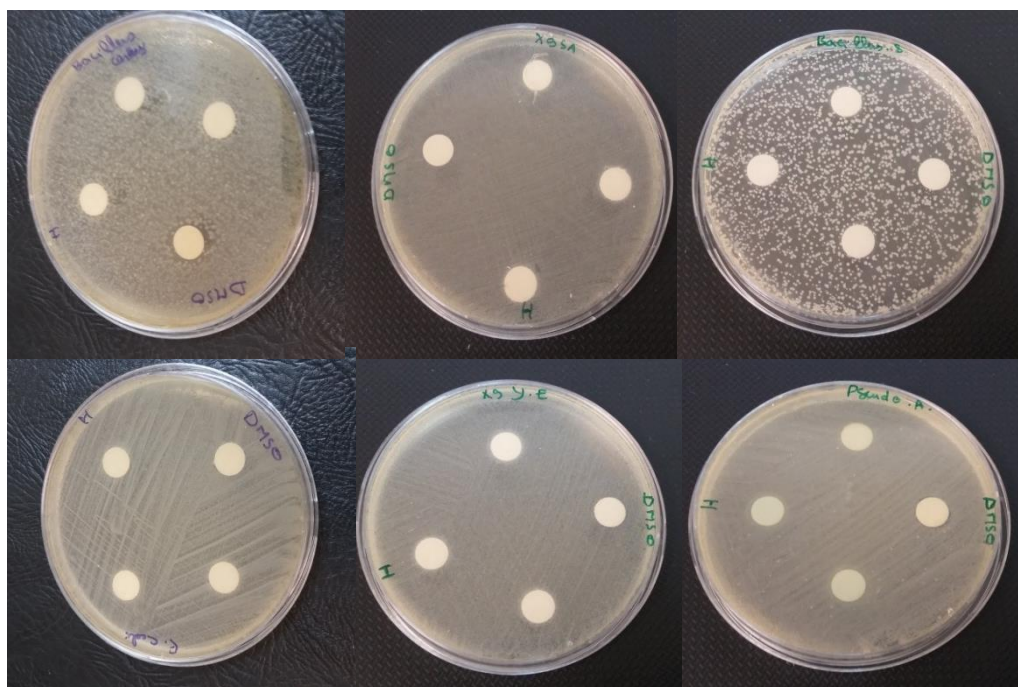
Les résultats de l'antibiogramme sur milieu solide sont représentés dans le tableau 3.13:

**Tableau 3.13 :** Activité antibactérienne de l'huile de graines d'*Argania spinosa* L. par la méthode de diffusion sur milieu solide.

Souche bactérienne	Huile <i>Argania spinosa</i> L. DI (mm)	Contrôle (+) Tetracycline DI (mm)
Gram + :		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	$27 \pm 0.8$
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	-	$29 \pm 0.3$
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	-	$22 \pm 1.8$
Gram - :		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	$29 \pm 0.6$
<i>Pseudomonas aerogenosa</i> ATCC 27853	-	$12 \pm 1.2$
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 23715	-	$24 \pm 0.7$

- : Absence de zones d'inhibition.

DI: Diamètre d'Inhibition.



**Figure 3.16 :** Antibiogramme sur milieu solide de l'huile de graines d'*Argania spinosa* L.

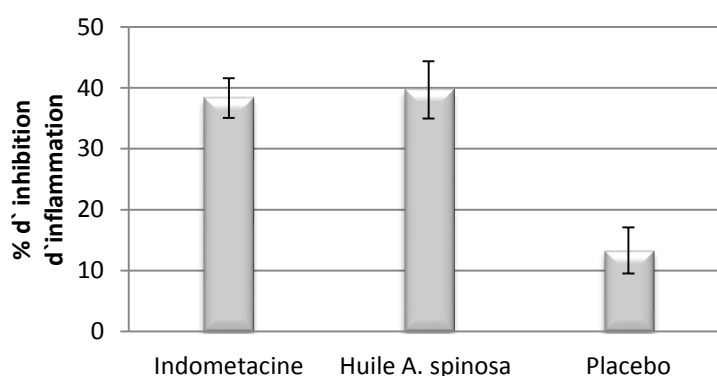
D'après les résultats obtenus (Figure 3.16), on remarque que l'huile *A. spinosa* L. ne présente aucun pouvoir antibactérien vis-à-vis les souches testées, cela se traduit par une absence totale de zones d'inhibitions pour *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus epidermidis*.

### 3.2.1.5.3- Activité anti-inflammatoire :

Les résultats du calcul des pourcentages de réduction d'inflammation sont récapitulés dans le tableau 3.14.

**Tableau 3.14 :** Moyennes des pourcentages de réduction de l'inflammation des œdèmes traités par l'Indométacine<sup>®</sup>, huile d'*Argania spinosa* L. et eau physiologique.

	Indométacine <sup>®</sup>	Huile <i>A. spinosa</i> L.	Placebo
% inhibition de l'inflammation $\bar{X} \pm SD$	38,312 $\pm$ 3.270	39,680 $\pm$ 4.705	13,300 $\pm$ 3.807



**Figure 3.17 :** Pourcentage de réduction d'inflammations traitées par Indometacine<sup>®</sup>, huile d'*A. spinosa* L. et eau physiologique (Placebo).

D'après la figure 3.17, le test anti-inflammatoire sur souris a révélé que l'huile d'Argan et le produit de référence Indometacine<sup>®</sup> ont impliqué une réduction d'inflammation par une inhibition de formation d'œdème sur les oreilles des souris traitées comparée aux oreilles non traitées. Le pourcentage de la réduction d'œdème a été calculé et a indiqué un taux de 39.68% pour le groupe traité avec de l'huile d'Argan et de 38.31% pour le groupe traité avec le produit de référence (Indometacine<sup>®</sup>), dont l'activité anti-inflammatoire est

déjà prouvée, toutefois le groupe placebo a montré le plus faible taux de réduction d'œdème avec 13.3%. Le test statistique de Student-*t* a confirmé qu'il n'existe aucune différence significative entre l'effet d'huile testée et celui du produit de référence (APPENDICE C). Selon ces résultats, on déduit que l'huile d'Argan est dotée d'une bonne activité anti-inflammatoire dont l'efficacité est similaire aux inflammatoires de référence.

#### 3.2.1.5.4- Tolérance cutanée :

L'irritation cutanée est l'un des problèmes associés à l'application topique d'un extrait végétal. Pour cette raison nous avons procédé au calcul de l'indice d'irritation primaire IPC de l'huile d'*A. spinosa* L. avant d'entamer l'étude de son effet cicatrisant.

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 3.15 et la figure 3.18:

**Tableau 3.15 :** Valeurs numériques de cotation des érythèmes et œdèmes enregistrées sur les flancs scarifiés et non scarifiée de lapins.

Lapin		24 h		72h	
		Erythème	Œdème	Erythème	Œdème
1	Z.S.	0	0	0	0
	Z.N.S	0	0	0	0
2	Z.S.	0	0	0	0
	Z.N.S.	0	0	0	0
3	Z.S.	0	0	0	0
	Z.N.S.	0	0	0	0
<b>IPC</b>		<b>0</b>			

Après l'application de l'huile d'Argan sur la peau saine (non scarifiée) et la peau endommagée (scarifiée) de lapins, aucun signe grave d'irritation n'est observé (Figure 3.18). Ceci a été confirmé par le calcul d'indice d'irritation primaire cutané qui est égal à 0.

D'après la valeur d'I.P.C. obtenue, on déduit que l'huile d'*A. spinosa* L. est classée comme non irritante selon les normes conventionnelles établies par DRAIZE. En conséquence l'huile d'Argan peut être utilisée dans les traitements dermiques.

### 3.2.1.5.5- Activité cicatrisante:

L'étude du pouvoir cicatrisant de l'huile d'Argan est réalisée pour la première fois. Les propriétés cicatrisantes ont été donc recherchées sur deux types de plaies:

- Des incisions linéaires fermées avec des points de sutures.
- Des excisions circulaires avec perte de la substance cutanée.

#### ✓ Test de cicatrisation sur incisions linéaires:

Le suivi du mécanisme de la cicatrisation des incisions linéaires a été procédé par deux examens complémentaires :

*Un examen macroscopique* : réalisé en présence d'un médecin vétérinaire aux jours 0, 6 et 12 post-incision, en tenant compte les huit paramètres de l'outil d'évaluation de blessure de Bates-Jensen.

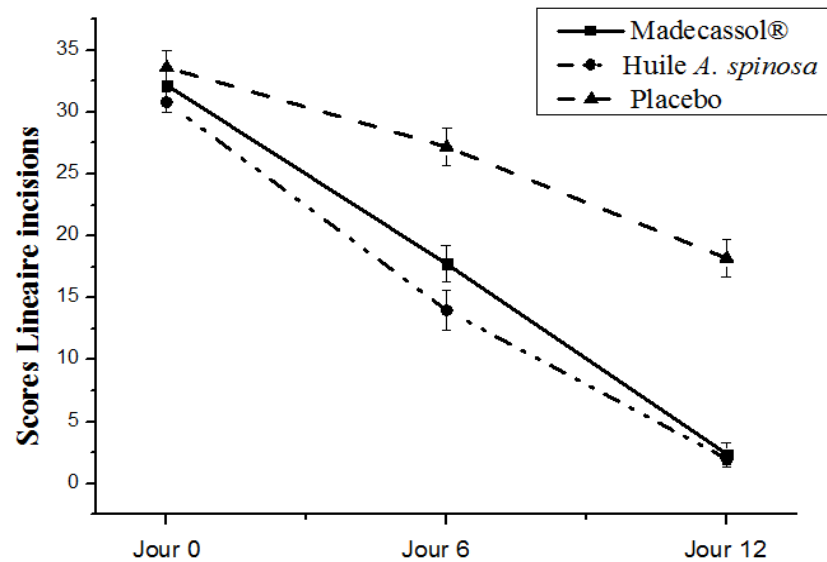
*Un examen histologique* : réalisé en présence d'un médecin spécialisé en anatomie-pathologie par l'observation microscopique des coupes histologiques réalisées sur la peau cicatrisée prélevée après 12 jours de traitement.

#### ➤ Examen macroscopique :

Les résultats du suivi de l'évolution du processus de cicatrisation des incisions, selon l'outil d'évaluation de blessure de Bates-Jensen (BWAT), sont indiqués dans le tableau 3.16 :

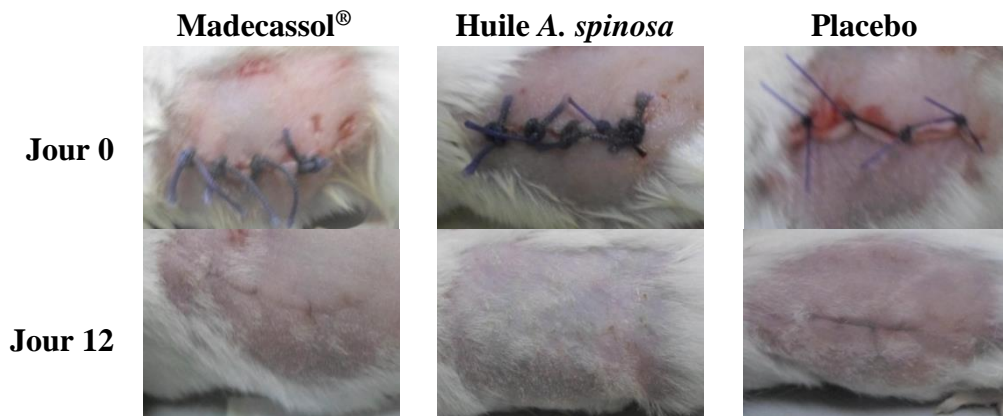
**Tableau 3.16** : Moyennes des scores de l'évolution du processus de cicatrisation des incisions chez les souris selon l'outil d'évaluation de blessure de Bates-Jensen aux jours 0, 6 et 12.

	<b>Jour 0</b>	<b>Jour 6</b>	<b>Jour 12</b>
<b>Contrôle (+) :</b> <b>Madécassol®</b> $\bar{X} \pm SD$	32.200 $\pm$ 1.483	17.750 $\pm$ 1.483	2.400 $\pm$ 0.894
<b>Huile de graines</b> <b><i>A. spinosa</i> L.</b> $\bar{X} \pm SD$	30.800 $\pm$ 0.836	14 $\pm$ 1.581	2 $\pm$ 0.707
<b>Placébo :</b> <b>Eau physiologique</b> $\bar{X} \pm SD$	33.600 $\pm$ 1.341	27.200 $\pm$ 1.483	18.2 $\pm$ 1.483



**Figure 3.18 :** Scores de l'évolution de la cicatrisation des incisions linéaires selon l'outil d'évaluation de blessure de Bates-Jensen (BWAT, Bates–Jensen Wound Assessment Tool).

Le suivi de l'évolution du processus de cicatrisation selon l'outil d'évaluation de blessure de Bates-Jensen (Figure 3.18), montre que les scores obtenus au jour 0 d'application pour les groupes traités par l'huile d'Argan et le Madécassol® ne diffèrent pas de ceux enregistrés pour le groupe placebo. Cependant une légère variation commence à apparaître à partir du 6<sup>ème</sup> jour et devient très importante au bout de 12 jours de traitement (Figure 3.20).



**Figure 3.19:** Évolution du processus de cicatrisation des incisions linéaires.

On constate que l'état de la cicatrice (Figure 3.19) dans les groupes traités par l'huile d'Argan et le Madécassol®, affiche une très bonne évolution dès le 1<sup>er</sup> jour post-opératoire avec une vitesse de guérison très importante le 6<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour de traitement par rapport au groupe placebo traité par l'eau physiologique.

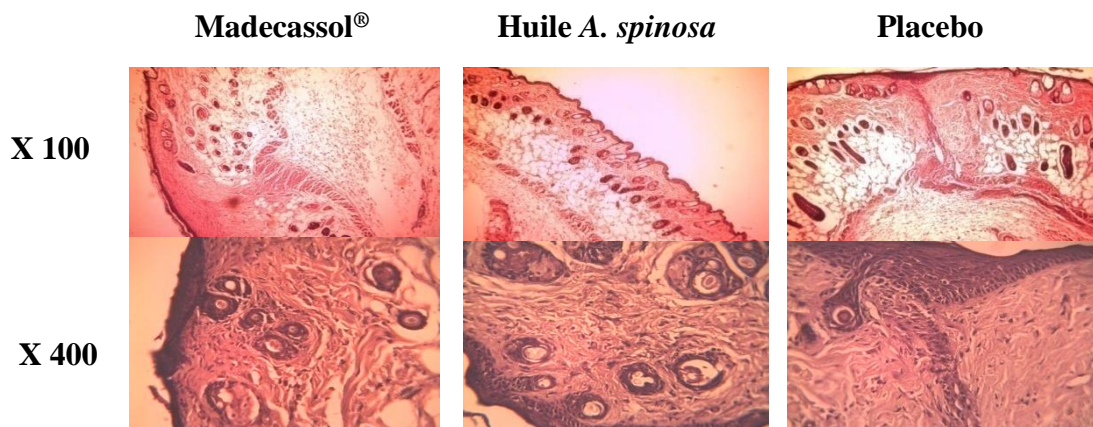
L'effet de l'huile testée et du Madécassol® (Hydrocotyle) présenté sous forme de scores selon l'outil d'évaluation de blessure de Bates -Jensen (BWAT) pour le jour 6 et 12 est presque identique (absence de différence significative selon le test-*t* de Student, APPENDICE C). Ces derniers sont remarquablement inférieurs aux scores du groupe placebo.

En outre, l'examen macroscopique révèle qu'aucun symptôme d'exsudat sanglant ni de gonflement grave n'a été observé sur ces incisions avec une évolution de la cicatrisation qui s'affiche clairement meilleure sur les groupes traités par l'huile et le produit de référence par rapport au groupe placebo dans lequel les plaies sont caractérisées par la présence de signes de retard de guérison avec un léger saignement, un œdème important et croûte granuleuse et épaisse (différence significative entre les trois groupes selon le test statistique ANOVA, APPENDICE C).

L'analyse préliminaire de nos résultats relève que le produit de référence et l'huile testée agissent d'une manière positive qui accélère et améliore la cicatrisation avec un effet aussi bon que le produit de référence commercialisé Madécassol®. Une légère avancée a été enregistrée dans la cicatrisation des plaies traitées par l'huile d'Argan.

➤ **Examen histologique :**

L'examen microscopique des coupes histologiques après coloration des incisions cicatrisées après 12 jours de traitement est représenté dans la figure 3.21:



**Figure 3.20 :** Examen microscopique des coupes histologiques des incisions linéaires cicatrisées après 12 jours de traitement au grossissement X100 et X400.

L'étude d'histologie des sections de peaux incisées après 12 jours de traitement avec l'huile d'Argan et le Madecassol® (Figure 3.20) montre: un revêtement cutané dont l'épiderme est trophique et le derme superficiel est le siège d'une discrète fibrose collagène sans infiltrat inflammatoire sur le derme, on constate également la présence d'un petit foyer cicatriciel. Cependant, le groupe placebo montre un site de fibrose collagène d'épaisseur variable sur la surface du derme, un foyer cicatriciel très apparent de la forme d'un trajet fistuleux et un discret infiltrat inflammatoire lymphocytaire non spécifique à l'hypoderme.

#### ✓ **Test de cicatrisation sur excisions circulaires:**

Le suivi du mécanisme de la cicatrisation des excisions circulaires a été procédé par deux examens complémentaires :

*Un examen macroscopique* : réalisé en présence d'un médecin vétérinaire aux jours 0, 6 et 12 post-excision, pour déterminer la surface des plaies afin de pouvoir calculer le pourcentage de contraction de la plaie après 6 et 12 jours de traitement.

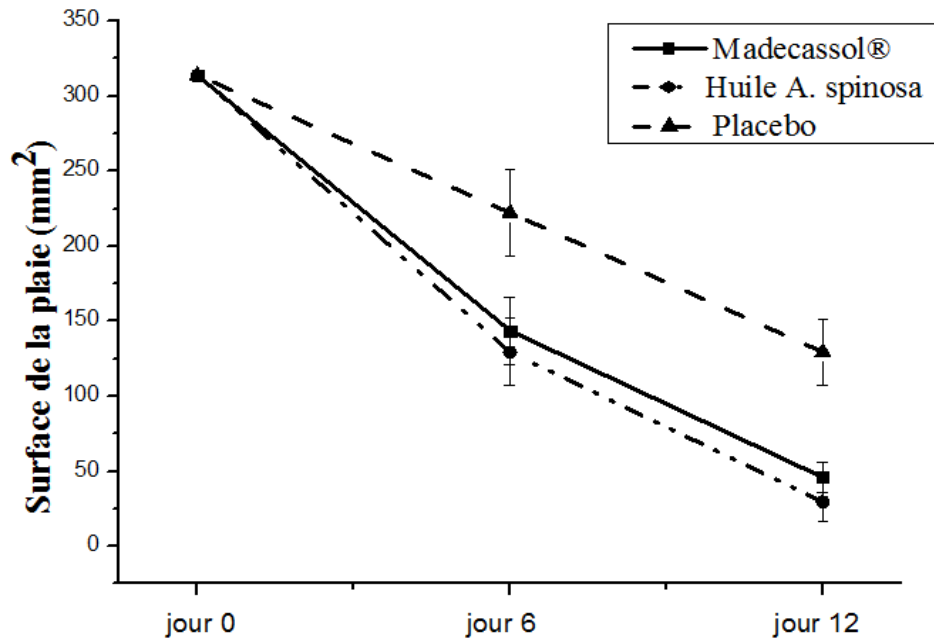
*Un examen histologique* : réalisé en présence d'un médecin spécialisé en anatomie-pathologie par l'observation microscopique des coupes histologiques réalisées sur la peau cicatrisée prélevée après 12 jours de traitement.

#### ➤ **Examen macroscopique :**

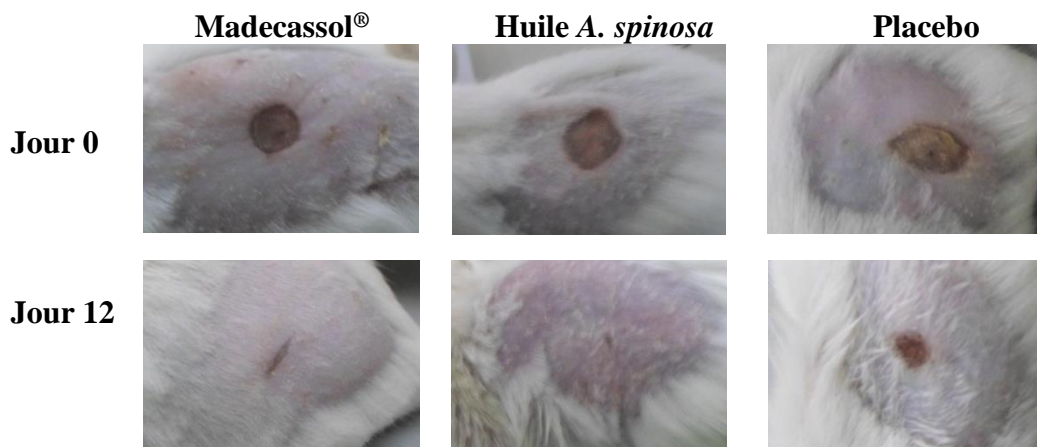
Les résultats du suivi de l'évolution de la cicatrisation des excisions ainsi que le calcul des surfaces des plaies sont présentés dans le Tableau 3.17 et la figure 3.21 :

**Tableau 3.17** : Moyennes des surfaces des excisions circulaires calculées planimétriquement en mm<sup>2</sup> aux jours 0, 6 et 12.

Groupe	Surfaces des excisions circulaires (mm <sup>2</sup> )		
	Jour 0	Jour 6	Jour 12
<b>Madécassol®</b> $\bar{X} \pm SD$	314 ± 0	143,655 ± 22.358	45,844 ± 9.829
<b>Huile A. Spinosa L.</b> $\bar{X} \pm SD$	314 ± 0	129,368 ± 22.358	29,516 ± 13.432
<b>Placebo</b> $\bar{X} \pm SD$	314 ± 0	222,312 ± 29.237	129,368 ± 22.358



**Figure 3.21 :** Surfaces des excisions circulaires.



**Figure 3.22 :** Évolution du processus de cicatrisation des excisions circulaires.

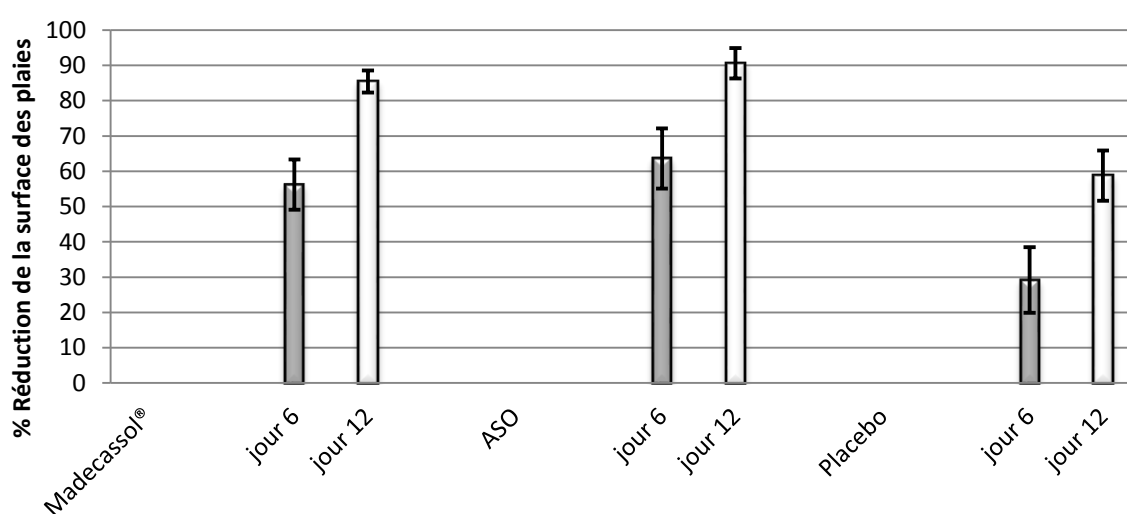
D'après les figures 3.22, on constate que les surfaces des plaies après 6 jours de traitement du groupe placebo restent assez élevées par rapport à celles traitées avec le Madécassol® et l'huile d'Argan. On remarque également que se dernier a développé des œdèmes graves contrairement aux précédents avec des croûtes très épaisses.

Après 12 jours de traitement, on enregistre dans les groupes traités avec l'huile et le Madécassol® des plaies presque fermées comparées à celles du groupe placebo (Tableau 3.18).



**Tableau 3.18** : Moyennes des pourcentages de contraction des surfaces des excisions circulaires aux jours 0, 6 et 12.

Groupe	% de réduction des surfaces des excisions	
	Jour 6	Jour 12
Madécassol®	56,200 ± 7.120	85,400 ± 3.130
Huile <i>A. spinosa</i> L.	63,600 ± 8.502	90,600 ± 4.277
Placebo	29,200 ± 9.311	58,800 ± 7.120



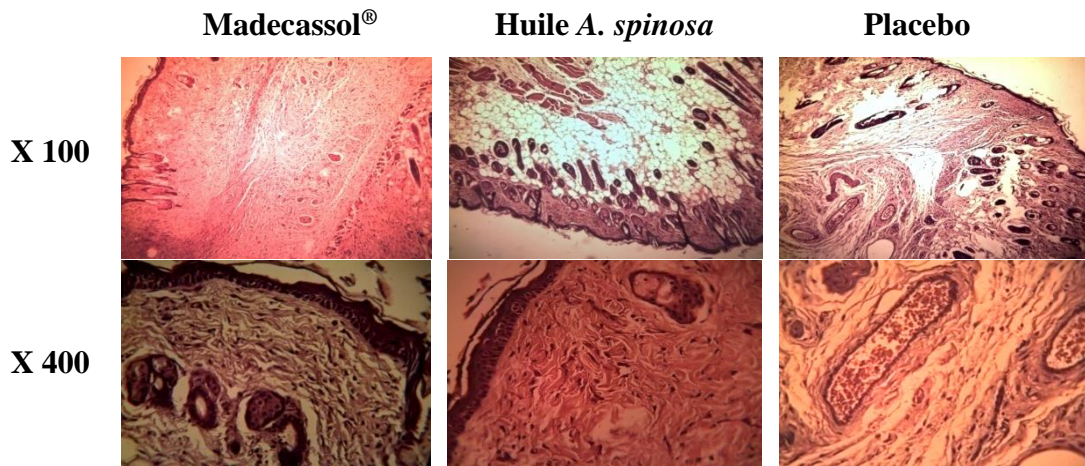
**Figure 3.23** : Pourcentage de réduction des surfaces des excisions circulaires après 6 et 12 jours de traitement.

La figure 3.23 révèle que l'huile d'Argan a induit une réduction assez élevée dans les surfaces des plaies avec un taux de 63.6% le 6<sup>ème</sup> jour et de 90.6% le 12<sup>ème</sup> jour, suivie par le produit de référence avec un taux de 56.2% pour le 6<sup>ème</sup> jour et 85.4% pour le 12<sup>ème</sup> jour. Le groupe placebo se classe en dernier avec des pourcentages de réduction des surfaces très faibles 29.2% enregistré le 6<sup>ème</sup> jour et 58.8% enregistré le 12<sup>ème</sup> jour.

Le test statistique ANOVA (APPENDICE C) révèle la présence d'une différence significative entre les taux de contraction des plaies des trois groupes pour le 6<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour. Cependant le test-*t* de Student (APPENDICE C), comparatif entre le groupe traité par l'huile d'Argan et le groupe traité par le Madécassol® a prouvé l'effet positif de l'huile testée sur la cicatrisation avec une efficacité similaire à des produits commercialisés.

➤ **Examen histologique :**

L'examen microscopique des coupes histologiques après coloration des excisions circulaires cicatrisées après 12 jours de traitement est représenté dans la figure 3.24:



**Figure 3.24 :** Examen microscopique des coupes histologiques des excisions circulaires cicatrisées après 12 jours de traitement au grossissement X100 et X400.

L'examen histologique des sections de peaux ayant subies des excisions circulaires après 12 jours de traitement (Figure 3.24) a révélé, dans le groupe traité avec de l'huile d'Argan et le Madécassol®, un revêtement cutané dont l'épiderme est atrophique et dont le derme est le siège de fibrose collagène avec un petit foyer cicatriciel s'étendant du derme superficiel à l'hypoderme, constitué d'un tissu fibreux collagène discrètement congestif et siège d'infiltrat inflammatoire lymphocytaire peu dense avec présence de quelques polynucléaires neutrophiles non altérés.

Les sections de peaux du groupe placebo ont dévoilé des revêtements cutanés dont l'épiderme est fin et le derme est le siège d'une fibrose collagène avec la présence d'un large foyer cicatriciel s'étendant du derme jusqu'au hypoderme avec un foyer de fibrose stellaire et d'infiltrat inflammatoire lymphocytaire dans le derme profond et l'hypoderme, celui-ci est œdémateux et contient des vaisseaux capillaires dilatés et des micro-abcès.

### 3.2.2- Discussion :

Cette étude consiste à la détermination de la composition chimique et l'évaluation préliminaire pour la première fois de quelques effets pharmaco-toxicologiques par application cutanée de l'huile extraite à partir des graines d'*Argania spinosa* (L.) Skeels.

L'extraction par ultrason a donné un rendement en huile d'Argan de **39%**, nos résultats sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par **Mountasser et Elhadek, 1999 [148]** estimés à **34.9%**, cette différence peut être liée à la méthode d'extraction, sachant que **Mountasser et Elhadek, 1999 [148]** ont utilisé dans leur étude la méthode du Soxhlet. Contrairement au Soxhlet qui nécessite un chauffage à des hautes températures pendant de longues durées ce qui peut altérer la composition chimique du produit d'extraction, la méthode d'ultrason est plus économique de point de vue temps (30 minutes maximum) et énergie (basses températures) tout en donnant des rendements élevés. D'où vient notre choix pour cette méthode d'extraction.

L'évaluation des caractères organoleptiques de l'huile extraite à partir des amandes d'*Argania spinosa* L. a révélé que c'est un liquide huileux fin translucide de couleur jaune claire, caractérisé par une odeur agréable avec un léger arôme de noisette et un goût neutre.

L'étude des propriétés physico-chimiques constitue un moyen d'identification des caractères physico-chimiques de l'huile testée et de contrôle de sa qualité :

La détermination de la densité relative peut être considérée comme un critère physique qui permet le contrôle de la pureté de l'huile extraite **[149]**.

Selon **Maurin, (1992) [8]** l'huile d'Argan présente une densité variable qui peut aller jusqu'à 0,906-0,919. La valeur obtenue dans notre étude estimée à 0,907, est proche de celle trouvée par **Charrouf, 1984 [150]** qui est égal à 0,906.

L'indice de réfraction qui est également un critère important de pureté de l'huile est proportionnel au poids moléculaire des acides gras. Il varie de façon intéressante selon le degré d'insaturation des lipides et peut nous donner une idée sur la prédominance d'un tel acide gras insaturé dans l'huile **[151]**.

L'analyse de notre huile d'Argan a donné des valeurs de l'ordre de 1,466. Ce résultat concorde avec l'intervalle [1.463 - 1.472] fixé par la norme marocaine **NM.080.5.090 (SNIMA, 2003) [152]**.

La détermination de l'indice d'acide d'un corps gras est considérée comme un bon moyen pour déterminer son degré d'altération. Il s'agit d'un critère chimique de la fraîcheur et de la pureté de l'huile. Plusieurs travaux marocains considèrent que l'acidité de l'huile d'Argan est située entre 0,58 et 2,4%. D'après **Maurin, 1992 [8]** l'indice d'acide est compris entre 0,49-2,96. La détermination de l'indice d'acide de l'huile d'Argan a donné la valeur de 1,6%.

L'indice de peroxyde est un critère très utile pour apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative. Cet indice est lié aux conditions de conservation et aux modes d'extraction. D'après **Maurin, 1992 [8]** l'indice de peroxyde est compris entre 5,2 et 7,0 (Meq O<sub>2</sub> /kg d'huile), dans notre étude l'indice de peroxyde est égal à 4,2.

L'indice de saponification renseigne sur la longueur de la chaîne carbonée des acides gras qui constituent les triglycérides. La détermination de l'indice de saponification de l'huile d'Argan a donné une valeur de 193,5 mg de KOH/g. Notre résultat est conforme aux normes marocaines **NM 080.5.090 (SNIMA, 2003) [152]** situés dans un intervalle allant de 189,0 - 199,1 mais il est légèrement inférieur à celui obtenu par **Charrouf, 2002 [6]** qui est égale à 195,2 mg de KOH/g.

L'indice d'iode renseigne sur l'état d'insaturation des chaînes carbonées des corps gras et à la qualité des différents acides gras mono ou polyinsaturés. Dans notre étude l'indice d'iode de l'huile d'Argan estimé à 94,76 (g d'iode /100g d'huile). Ce résultat est conforme aux valeurs rapportées par **Maurin (1992) [153]** qui donne l'intervalle de [92-102] g d'iode / 100g d'huile.

L'étude des caractères physico-chimiques de l'huile d'Argan a dévoilé que c'est une huile pure fraîche non siccative riches en acides gras insaturés de chaîne moyenne C18. Ces résultats ont été confirmés par une analyse chromatographique GC-MS qui a prouvé que les acides oléique et linoléique représentent environ 80% des acides gras totaux. De plus l'acide linoléique qui a été détecté dans l'huile analysée avec des teneurs dépassant les 2 %, permet de la classer parmi les huiles végétales d'assaisonnement non siccatives **[154]**.

L'analyse par GC-MS a donc dévoilé que les acides gras mono-insaturés (oméga-9) et di-insaturés (oméga-6) représentent environ 80% des acides gras totaux avec les pourcentages respectifs de 44% et 35% pour l'acide oléique et l'acide linoléique, on déduit donc que l'huile étudiée est de type oléique- linoléique. D'autres acides gras saturés avec

des valeurs significatives étaient détectés comme l'acide palmitique (14.16%) et l'acide stéarique (4.16%).

On constate donc que l'huile d'Argan étudiée contient les cinq acides gras habituellement rencontrés dans les huiles végétales, en l'occurrence les acides : myristique, palmitique, stéarique, oléique et linoléique.

On remarque aussi que l'huile d'Argan est constituée essentiellement par des acides gras de chaîne moyenne C16 et C 18 qui lui confèrent une viscosité et une bonne fluidité [155].

Après comparaison avec les résultats obtenus par **Charrouf et al., 1998 [158]** de l'analyse des acides gras de l'huile d'Argan marocaine, on constate que nos résultats sont en concordance.

La fraction polyphénolique de l'huile d'Argan a été également investiguée par le dosage de sa teneur, les résultats révèlent un faible taux d'environ 58.57 mg/kg d'huile, **Chimi et al., 1994 [157]** rapportent que le dosage spectrophotométrique des polyphénols totaux au niveau de l'huile vierge d'*Argania spinosa* L. a révélé une teneur moyenne estimée à 56.2 mg/ Kg ce qui est comparable avec nos résultats (58.57 mg / kg). Bien que le taux des polyphenols est assez faible mais leur présence reste d'une grande importance puisqu'ils sont dotés d'innombrables effets bénéfiques comme antioxydant assurant ainsi une longue conservation pour l'huile.

La caractérisation qualitative par UPLC-QTOF-ESI-MS montre que la fraction phénolique est représentée principalement par des acides phénoliques coumarique, caféique, vanillique et gallique et un phénol simple demethyloleuropein. On constate donc que nos résultats sont similaires à ceux obtenus par **Rojas et al. 2005 [158]**, qui indiquent que l'huile d'Argan cosmétique renferme de faibles teneurs en polyphénols représentés essentiellement par des acides phénoliques et des phénols simples.

On note que les variations observées dans la composition chimiques en acides gras et en composés phénoliques de l'huile d'Argan peuvent être attribuées à différents facteurs, notamment la provenance géographique des échantillons, les conditions climatiques et la méthode d'extraction [8, 78, 153].

L'effet antioxydant évalué par la détermination de la valeur d'IC<sub>50</sub> (132 mg) de l'huile d'Argan se montre très faible par rapport aux antioxydants de références (Trolox et Acide ascorbique). Cela peut être expliqué par la présence de composés mineurs appartenant à la

fraction insaponifiable notamment les tocophérols et polyphénols dont le pouvoir antioxydant est déjà mentionné dans la littérature.

La détermination de l'effet antibactérien a dévoilé que l'huile testée ne possède pas un pouvoir inhibiteur pour la croissance bactérienne sur les souches *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus epidermidis*. . Cela peut être lié au faible contenu de l'huile en principes actifs (polyphénols) ayant un pouvoir antibactérien.

L'étude toxicologique a montré que les lapins administrés avec de l'huile d'Argan n'ont présenté aucun effet irritant ou toxicité sur la peau et révèle une valeur de IPC égale à 0, en conséquence l'huile d'Argan peut être utilisée dans des traitements dermiques.

L'essai de l'activité anti-inflammatoire a révélé que les oreilles non traitées de souris ont montré un œdème important reflétant une inflammation persistante, tandis que les oreilles traitées avec de l'huile d'Argan et l'Indometacine<sup>®</sup> ont présenté des œdèmes très réduits, dévoilant ainsi un effet similaire entre les deux substances.

Les tests de cicatrisation sur les incisions et des excisions ont prouvé que l'huile des graines d'Arganier est dotée d'excellente activité curative comparable à l'effet du Madécassol<sup>®</sup>.

De plus, l'examen histologique des plaies a montré un tissu de granulation plus élaboré chez les souris traitées avec l'huile d'Argan. Ce tissu de granulation est constitué de néo vaisseaux de type capillaires d'éléments fibroblastiques élaborant du collagène et de cellules mononuclées. Ces néo vaisseaux de type capillaires favorisent l'arrivée de cellules inflammatoires ayant un rôle de détersion du foyer lésionnel. La nature histologique de la cicatrice que nous avons observé confirme les constatations déjà faites par examen macroscopique des plaies.

On note que de l'huile d'Argan est de plus en plus utilisée pour les soins de peau ; elle possède beaucoup de caractéristiques qui font d'elle une cible attractive pour la recherche dans la thérapie des plaies. Récemment **Avsar et al., 2016 [159]** ont confirmé dans leur étude que cette huile a guéri plus rapidement les brûlures de second degré chez les rats que

le sulfadiazine argenté. Cela est probablement dû à sa teneur abondante en acides gras mono et poly insaturés.

Les acides gras oméga-9 et oméga-6 majoritaires de l'huile d'Argan sont connus pour jouer un rôle capital au niveau du foyer de la plaie et rapportés pour avoir le potentiel thérapeutique dans la réparation cutanée des peaux endommagées [160, 161]. Plusieurs études ont prouvé que l'administration des acides oléique et linoléique : accélèrent la phase inflammatoire de la cicatrisation et améliorent la réparation cutanée en réduisant l'inflammation, par la diminution de l'expression du facteur nucléaire B (NFB) et des cyclo-oxygénase-2 [162, 163], par la réduction du niveau des cellules mononucléaire et des facteurs de nécrose (TNF) dans les exsudats de la plaie [164], et par l'activation des cellules du système immunitaire comme les neutrophiles et les macrophages [161, 165]. Une étude récente a prouvé que les acides gras ont les propriétés antimicrobiennes [166]. En tenant compte que l'huile isole la plaie de l'environnement extérieur, elle peut potentiellement agir en tant qu'agent antimicrobien. Cependant, aucune des plaies dans notre étude n'a présenté des signes de surinfections.

Les composés phénoliques également mis en évidence dans huile d'Argan sont connus en tant que substances biologiquement actives dans le traitement des plaies. Leur effet cicatrisant est dû à leurs pouvoirs antimicrobien, anti-inflammatoire et particulièrement à leur action antioxydante.

En effet, pendant le processus de cicatrisation, le foyer cicatriciel est riche en oxydants, tels que le peroxyde d'hydrogène, la plupart du temps contribué par des neutrophiles et des macrophages. L'effet cicatrisant des composés phénoliques a été attribué à leur pouvoir antioxydant, qui peut réduire le stress oxydatif grâce à sa capacité de : donner des hydrogènes ou des électrons et de piéger les radicaux libres, réduire la peroxydation des lipides et les dommages inflammatoires, favoriser la prolifération et l'adhésion des fibroblastes pendant la cicatrisation, et stimuler le ré-épithélialisation, la néo-vascularisation et la maturation des matrices extracellulaires [167, 168, 169].

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**



## CONCLUSION GENERALE

Ce travail s'inscrit dans le cadre des travaux de recherche du laboratoire de Protection et de Valorisation des Ressources Agro-Biologiques (Université Saad DAHLEB BLIDA) dont l'un des objectifs majeurs est la valorisation des plantes endémiques Algériennes. Nous avons pour cela sélectionné une espèce végétale endémique à usage multiple peu connue chez nous.

Compte tenu de ses caractéristiques botaniques, physiologiques et écologiques d'une part, et de son intérêt économique croissant d'autre part, l'Arganier est l'arbre d'avenir pour l'Algérie. C'est dans ce contexte, que notre étude vient pour contribuer à la connaissance et la valorisation de l'espèce *Argania spinosa* (L.) Skeels.

Le travail présenté dans cette thèse résume donc les résultats obtenus de l'extraction et de la caractérisation phytochimique de trois organes de la plante d'*Argania spinosa* L. : feuilles, pulpes et graines. Après avoir déterminé leur composition chimique, nos efforts ont porté sur leur valorisation par le biais de la mise en évidence de leurs propriétés biologiques et pharmaco-toxicologiques.

La première partie de notre travail expérimental a été consacrée à l'étude des feuilles et de la pulpe de fruits d'*Argania spinosa* L. :

Il ressort de l'analyse phytochimique effectuée pour la première fois par UPLC-QTOF-ESI-MS que ces extraits sont riches en composés phénoliques particulièrement les dérivés glucosidiques de flavonols notamment la quercétine et la myricétine.

L'évaluation des propriétés biologiques entre autres cytotoxique et antimicrobienne testées pour la première fois s'est révélée très intéressante.

Cette étude a permis donc de montrer le potentiel cytotoxique de la feuille et la pulpe d'Arganier sur les cellules tumorales de la prostate et de déterminer leur IC<sub>50</sub>, les résultats obtenus sont à notre sens très encourageants.

Le pouvoir antimicrobien des extraits d'Arganier s'est révélé aussi intéressant, et en particulier l'extrait de feuilles qui a montré un effet positif sur la plupart des souches testées, cela est probablement dû à sa teneur élevée en composés phénoliques dont l'action antimicrobienne est déjà prouvée.

L'étude du pouvoir anti-radicalaire a confirmé la propriété antioxydante puissante que possèdent les extraits de feuilles et de pulpe à piéger les radicaux libres, sa puissance est dépendante du contenu en polyphénols.

Le profil chimique et le potentiel pharmacologique des feuilles et de pulpe de fruits d'*Argania spinosa* L. n'ont pas encore été à ce jour complètement explorés. Cette étude contribue donc à une meilleure compréhension de sa composition et de ses propriétés biologiques ainsi de son éventuelle application en tant qu'agents antimicrobien et cytotoxique.

La présente étude montre aussi que la pulpe et particulièrement les feuilles d'Arganier pourraient être utilisées comme une nouvelle source pour la prévention et la thérapie naturelle. En conséquence, ces résultats peuvent ouvrir de nouvelles opportunités prometteuses pour la valorisation et le développement des sous-produits de l'arbre d'*Argania spinosa* L.

L'huile extraite à partir des graines de fruit d'Arganier a fait l'objet de la deuxième partie de ce travail :

L'analyse physicochimique de l'huile d'*Argania spinosa* L. a dévoilé que c'est une huile non siccative, non toxique et riche en acides gras insaturés de chaîne moyenne C18 notamment l'acide oléique. L'analyse de son profil en acides gras confirme qu'elle est de type oléique – linoléique avec un taux qui dépasse les 80%, l'analyse révèle aussi la prédominance des acides gras saturés de chaîne C16.

La caractérisation et la teneur en polyphénols a révélé une très faible présence de ces composés. Ces derniers sont représentés essentiellement par des acides phénoliques et phénol simple.

On déduit donc que la composition physicochimique spécifique de l'huile d'Argan lui confère des propriétés intéressantes aux plans cosmétique et thérapeutique.

La détermination des effets pharmaco-toxicologiques liés à la cicatrisation des lésions cutanées a indiqué que l'huile de graine d'Arganier est dotée de pouvoirs antioxydant, antibactérien, anti-inflammatoire et cicatrisant sur des plaies profondes, très significatifs et sans aucun effet irritant.

L'action antioxydante de l'huile étudiée a été préalablement démontrée elle semble jouer un rôle important lors du processus de cicatrisation par la neutralisation des oxydant libérés au cours de la phase inflammatoire dans le foyer de la plaie, réduisant ainsi l'inflammation tout en accélérant le processus de la cicatrisation.

L'activité antibactérienne de l'huile d'Argan semble être liée à son pouvoir isolant empêchant l'entrée de tout agent externe (microbien ou autres) en contact avec la peau endommagée.

L'étude du pouvoir anti-inflammatoire de l'huile d'Argan a dévoilé son action positive sur les œdèmes.

De même, cette étude a permis la mise en évidence d'un effet cicatrisant puissant sur deux types de plaies avec et sans perte de la substance cutanée, les résultats de l'examen microscopique à confirmé une très bonne réparation dermique sur le plan histologique des plaies traitées avec l'huile d'Argan.

Le potentiel pharmacologique de l'huile de graines d'Arganier avec son efficacité similaire aux produits de références anti-inflammatoire (Indométacine<sup>®</sup>) et cicatrisant (Madécassol<sup>®</sup>) est dû à : la forte présence d'acides gras insaturés notamment oméga-9 et oméga-6 qui accélèrent et améliorent la réparation des tissus au niveau moléculaire et réduisent l'inflammation, ainsi qu'à la présence des composés polyphénoliques comme l'acide coumarique, caféique et vanillique, l'épicatchine et la déméthyloluropeine qui semblent être responsables des propriétés antioxydante et antibactérienne.

Le résultat de l'étude de l'huile d'Argan était donc positif puisque on a pu tester pour la première fois de nouvelles activités pharmacologiques malgré que cette dernière a fait l'objet de plusieurs études pendant des décennies.

L'ensemble des résultats obtenus constitue une justification scientifique pour l'usage traditionnel de l'huile d'Argan et ouvre de nouvelles perspectives pour la valorisation et le développement des sous-produits (feuille et pulpe) d'arbre d'Arganier, réputé uniquement pour son huile.

Il serait intéressant d'étayer ce travail par des études plus approfondies, voire des analyses moléculaires et cliniques afin de déterminer le mécanisme d'action responsable des interactions entre les substances bioactives d'Arganier et l'organisme vivant au niveau moléculaire, et des modifications au niveau cellulaire, tissulaire, anatomique résultant de l'exposition à cette matière active.

# **APPENDICE**

**APPENDICE A****Liste des abréviations :**

%	: Pourcentage
°	: Degré
°C	: Degré Celsius
µg	: microgramme
µl	: Microlitre
µM	: Micromètre
<i>A. spinosa</i>	: <i>Argania spinosa</i>
ATCC	: American Type Culture Collection
Cl	: Chlore
cm	: Centimètre
DO	: Densité optique
Eq	: Equivalent
FCR	: Réactif de Folin Ciocalteu
g	: Gramme
G X	: Grossissement
GC-MS	: Gaz Chromatography- Mass Spectrometry.
h	: Heure
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Acide Sulfurique
HCl	: Acide Chloridrique
I.M.	: Intra Musculaire.
I.P.C.	: Indice d'irritation primaire cutanée
J	: Jour
kg	: Kilogramme
kV	: Kilovolt
l	: Litre
L.	: Linné

M	: Mètre
m/z	: Mass/Charge ratio
mg	: Milligramme
min	: Minute
ml	: Millilitre
MP	: Microscope photonique
N	: Normal
NaOH	: Hydroxyde de sodium
nm	: Nanomètre
O.M.S.	: Organisation mondiale de la santé
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
PC3	: Prostate Cancer cell line
Rpm	: Round per minute
UPLC-ESI-QTOF-MS:	Ultra-high Performance Liquid Chromatography-ElectroSpray Ionization-Quadruple Time Of Flight-Mass Spectrometry.
UV	: Ultraviolet
V	: Volume
Z.I	: Zone d'inhibition
Z.N.S	: Zone non scarifiée
Z.S	: Zone scarifiée

**APPENDICE B**  
**Matériel non biologique :**

Liste des appareillages :

- Autoclave
- Bain marie
- Bain ultrasons
- Balance de précision
- Bec benzène
- Broyeur mécanique.
- Centrifugeuse de paillasse
- Chromatographie gazeuse, GC Agilent 7890, Couplé avec le spectromètre de masse Agilent MSD-5975 CVL.
- Chromatographie liquide, LC d'Acquity ultra (UHPLC) couplé à XEVO-G2-QTOF (Quadrupole-Time of flight) (Waters Corporation, Manchester, United Kingdom).
- Congélateur
- Etuve bactériologique
- Etuve ventilée
- Evaporateur rotatif
- Hotte chimique
- Incubateur CO<sub>2</sub>
- Lecteur ELISA
- MALDI-TOF-MS spectromètre Microflex LT (Bruker Daltonics, 158 Bremen, Germany).
- Microscope à phase inverse
- Microscope photonique avec caméra.
- Microtome
- PH mètre
- Plaque chauffante
- Réfractomètre.



- Spectrophotomètre UV – Vis (SHIMADZU UV- 1601)
- Tondeuse
- Vortex

Liste de la verrerie :

- Ballons
- Béchers
- Burettes graduées
- Entonnoirs
- Erlénes Meyer
- Fioles
- Pipettes graduées
- Pipettes graduées
- Tube à essai

Liste du petit matériel et consommable :

- Aiguille et fil chirurgical
- Anse de platine
- Boîte de pétri
- Cellule Malassez
- Creuset en platine
- Disques d'antibiogramme stériles
- Ecouvillons stériles
- Ependorff
- Filtre seringue
- Lamelles
- Lames en verre
- Micropipette
- Microplaques 96 puits
- Papier filtre
- Perforateur de papier 6mm.
- Pied à coulisse
- Pincés
- Pipettes pasteurs

- Portoirs
- Scalpels
- Seringue
- Tube sec
- Tubes à essai

Liste des réactifs :

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH+)
- Acétone
- Acide acétique glaciale
- Acide ascorbique
- Acide chlorhydrique
- Acide formique
- Acide gallique
- Acide sulfurique
- Amidon
- Azote liquide
- Bleu de trypan
- Bouillon nutritif (BN)
- Bromure d'iode
- Calmivet<sup>®</sup> (Acepromazine 0.5%)
- Carbonate de sodium
- Chloroforme
- Chlorure d'Aluminium (AlCl<sub>3</sub>)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- Eau de Javel à 12°
- Eau déminéralisée
- Eau distillée
- Eau physiologique 0.9%
- Ethanol
- Flammazine<sup>®</sup> (Sulfadiazine argentique)
- Gélose Mueller Hinton (GMH)
- Gélose nutritive (GN)
- Hexane
- Huile de croton

- Hydroxyde de potassium (KOH)
- Hydroxyde de Sodium (NaOH)
- Iode
- Iodure de potassium
- Madécassol<sup>®</sup> (Hydrocotyle 1%).
- Méthanol
- Methyl-Thiazolyldiphenyl-Tetrazolium bromide (MTT)
- Milieu RPMI 1640
- Nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>)
- Quercetine
- Réactif de Folin Ciocalteu (FCR)
- Rouge de phénol
- Solution de carbonate de sodium
- Solution methanolique BF<sub>3</sub>
- Solution physiologique à (0,9% Na Cl)
- Thiosulfate
- Thiosulfate de sodium
- Trolox
- Trypsine- EDTA 1%
- Vert de méthyle
- Xylocaïne

## Appendice C Etude statistique :

### ➤ **Activité antibactérienne :**

- Test-t de Student : Extrait de feuille et Tétracycline®.

*Stahoylococcus aureu* ▼

	N	Mean	SD	SEM
"Tetracycline"	3	12	1	0,57735
"Leaf extract"	3	27	0,8	0,46188
Difference		-15		

*t-Test Statistics* ▼

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	-20,28757	4	3,48521E-5
Equal Variance NOT Assumed	-20,28757	3,81612	4,98737E-5

Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0

Alternative Hypothesis: mean1-mean2 <> 0

At the 0.05 level, the difference of the population means is significantly different with the test difference(0)

*Bacillus cereus* | ▼

	N	Mean	SD	SEM
"Leaf extract"	3	15,6	0,5	0,28868
"Tetracycline"	3	29	0,3	0,17321
Difference		-13,4		

*t-Test Statistics* ▼

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	-39,80393	4	2,38025E-6
Equal Variance NOT Assumed	-39,80393	3,27479	1,63913E-5

Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0

Alternative Hypothesis: mean1-mean2 <> 0

At the 0.05 level, the difference of the population means is significantly different with the test difference(0)

*Escherichia coli* ▼

	N	Mean	SD	SEM
"Leaf extract"	3	10,3	1,5	0,86603
"Tetracycline"	3	29	0,6	0,34641
Difference		-18,7		

*t-Test Statistics* ▼

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	-20,0485	4	3,65304E-5
Equal Variance NOT Assumed	-20,0485	2,62402	6,05399E-4

Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0

Alternative Hypothesis: mean1-mean2  $\neq$  0

At the 0.05 level, the difference of the population means is significantly different with the test difference(0)

*Yersinia enterocolitica* ▼

	N	Mean	SD	SEM
"Leaf extract"	3	13,3	0,5	0,28868
"Tetracycline"	3	24	0,7	0,40415
Difference		-10,7		

*t-Test Statistics* ▼

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	-21,54411	4	2,74552E-5
Equal Variance NOT Assumed	-21,54411	3,6193	5,93147E-5

Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0

Alternative Hypothesis: mean1-mean2  $\neq$  0

At the 0.05 level, the difference of the population means is significantly different with the test difference(0)

*P. aerogenosa* ▼

	N	Mean	SD	SEM
"Leaf extract"	3	11,6	0,5	0,28868
"Tetracycline"	3	12	1,2	0,69282
Difference		-0,4		

*t-Test Statistics* ▼

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	-0,53294	4	0,62231
Equal Variance NOT Assumed	-0,53294	2,67413	0,63514

Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0

Alternative Hypothesis: mean1-mean2  $\neq$  0

At the 0.05 level, the difference of the population means is NOT significantly different with the test difference(0)

*Bacillus subtilis* ▼

	N	Mean	SD	SEM
"Leaf extract"	3	16,6	1,1	0,63509
"Tetracycline"	3	22	1,8	1,03923
Difference		-5,4		

*t-Test Statistics* ▼

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	-4,43378	4	0,01139
Equal Variance NOT Assumed	-4,43378	3,31098	0,01729

Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0

Alternative Hypothesis: mean1-mean2  $\neq$  0

At the 0.05 level, the difference of the population means is significantly different with the test difference(0)

- Test-t de Student : Extrait de pulpe et Tétracycline®.

*Bacillus cereus* ▼

	N	Mean	SD	SEM
"Pulp extract"	3	14	1	0,57735
"Tetracycline"	3	29	0,3	0,17321
Difference		-15		

*t-Test Statistics* ▼

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	-24,88506	4	1,54787E-5
Equal Variance NOT Assumed	-24,88506	2,35711	6,57439E-4

Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0

Alternative Hypothesis: mean1-mean2 <> 0

At the 0.05 level, the difference of the population means is significantly different with the test difference(0)

*Bacillus subtilis* ▼

	N	Mean	SD	SEM
"Pulp extract"	3	14	1	0,57735
"Tetracycline"	3	22	1,8	1,03923
Difference		-8		

*t-Test Statistics* ▼

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	-6,72927	4	0,00254
Equal Variance NOT Assumed	-6,72927	3,12719	0,00587

Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0

Alternative Hypothesis: mean1-mean2 <> 0

At the 0.05 level, the difference of the population means is significantly different with the test difference(0)

➤ **Activité anti-inflammatoire :**

Test ANOVA : Indométacine®, huile d'Argan et placebo.

*anti-inflammatory test* ▾

*Descriptive Statistics* ▾

	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean
Indométacine	5	38,312	3,27048	1,4626
ASO	5	39,68	4,70594	2,10456
Placebo	5	13,3	3,80749	1,70276

*One Way ANOVA* ▾

*Overall ANOVA* ▾

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	2205,62661	1102,81331	69,88844	2,44261E-7
Error	12	189,35548	15,77962		
Total	14	2394,98209			

Null Hypothesis: The means of all levels are equal.

Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.

At the 0.05 level, the population means are significantly different.

*Fit Statistics* ▾

	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean
	0,92094	0,13054	3,97236	30,43067

Test-t de Student : Indométacine®, huile d'Argan et placebo.

*Descriptive Statistics* ▾

	N	Mean	SD	SEM
"Indométacine"	5	38,312	3,27048	1,4626
"ASO"	5	39,68	4,70594	2,10456
Difference		-1,368		

*t-Test Statistics* ▾

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	-0,53377	8	0,60801
Equal Variance NOT Assumed	-0,53377	7,13301	0,60972

Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0

Alternative Hypothesis: mean1-mean2  $\neq$  0

At the 0.05 level, the difference of the population means is NOT significantly different with the test difference(0)

➤ **Activité cicatrisante :**

**Excisions circulaires**  
6<sup>ème</sup> jour de traitement

Test ANOVA : Madécassol<sup>®</sup>, huile d'Argan et placebo.

+ <i>Excision wound area</i>					
+ <i>6th day</i>					
- <i>Descriptive Statistics</i>					
	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean	
Madecassol	5	137,532	22,35803	9,99882	
ASO	5	129,368	22,35803	9,99882	
Placebo	5	222,312	29,23743	13,07538	
- <i>One Way ANOVA</i>					
- <i>Overall ANOVA</i>					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	26488,14405	13244,07203	21,42371	1,09686E-4
Error	12	7418,36304	618,19692		
Total	14	33906,50709			
Null Hypothesis: The means of all levels are equal. Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different. At the 0.05 level, the population means are significantly different.					
- <i>Fit Statistics</i>					
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean	
	0,78121	0,15247	24,86357	163,07067	

Test-t student: Madécassol<sup>®</sup> et huile d'Argan.

- <i>Descriptive Statistics</i> ▾					
		N	Mean	SD	SEM
"madécassol"		5	137,532	22,35803	9,99882
"ASO"		5	129,368	22,35803	9,99882
	Difference		8,164		
- <i>t-Test Statistics</i> ▾					
		t Statistic	DF	Prob> t	
	Equal Variance Assumed	0,57735	8	0,57958	
	Equal Variance NOT Assumed	0,57735	8	0,57958	
Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0 Alternative Hypothesis: mean1-mean2 <> 0 At the 0.05 level, the difference of the population means is NOT significantly different with the test difference(0)					



**Excisions circulaires**  
12<sup>eme</sup> jour de traitement :

Test ANOVA : Madécassol<sup>®</sup>, huile d'Argan et placebo.

+ Excision wound area					
+ 12th Day					
- Descriptive Statistics					
	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean	
Madecassol <sup>®</sup>	5	45,844	9,82975	4,396	
ASO	5	29,516	13,43245	6,00717	
Placebo	5	129,368	22,35803	9,99882	
- One Way ANOVA					
- Overall ANOVA					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	28688,80677	14344,40339	55,38832	8,71752E-7
Error	12	3107,74592	258,97883		
Total	14	31796,55269			
Null Hypothesis: The means of all levels are equal.					
Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.					
At the 0.05 level, the population means are significantly different.					
- Fit Statistics					
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean	
	0,90226	0,23582	16,09282	68,24267	

Test-t de Student : Madécassol<sup>®</sup> et huile d'Argan.

- Descriptive Statistics					
		N	Mean	SD	SEM
"madécassol"		5	45,844	9,82975	4,396
"ASO"		5	29,516	13,43245	6,00717
	Difference		16,328		
- t-Test Statistics					
		t Statistic	DF	Prob> t	
	Equal Variance Assumed	2,19349	8	0,0596	
	Equal Variance NOT Assumed	2,19349	7,32936	0,06263	
Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0					
Alternative Hypothesis: mean1-mean2 <> 0					
At the 0.05 level, the difference of the population means is NOT significantly different with the test difference(0)					

**Incisions linéaires**  
6<sup>ème</sup> jour de traitement:

Test ANOVA : Madécassol<sup>®</sup>, huile d'Argan et placebo.

+ <i>Linear incision</i>					
+ <i>6th day</i>					
- <i>Descriptive Statistics</i>					
	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean	
Madecassol <sup>®</sup>	5	17,8	1,48324	0,66332	
ASO	5	14	1,58114	0,70711	
Placebo	5	27,2	1,48324	0,66332	
- <i>One Way ANOVA</i>					
- <i>Overall ANOVA</i>					
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	2	461,73333	230,86667	100,37681	3,21978E-8
Error	12	27,6	2,3		
Total	14	489,33333			
Null Hypothesis: The means of all levels are equal. Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different. At the 0.05 level, the population means are significantly different.					
- <i>Fit Statistics</i>					
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean	
	0,9436	0,07711	1,51658	19,66667	

Test-t de Student : Madécassol<sup>®</sup> et huile d'Argan.

*Descriptive Statistics* ▾

	N	Mean	SD	SEM
"madécassol"	5	17,8	1,48324	0,66332
"ASO"	5	14	1,58114	0,70711
Difference		3,8		

*t-Test Statistics* ▾

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	3,9194	8	0,00442
Equal Variance NOT Assumed	3,9194	7,96754	0,00446

Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0

Alternative Hypothesis: mean1-mean2 <> 0

At the 0.05 level, the difference of the population means is significantly different with the test difference(0)

**Incisions linéaires**

12<sup>ème</sup> jour de traitement :

Test ANOVA : Madécassol<sup>®</sup>, huile d'Argan et placebo.

+	<i>linear incision</i>																								
+	<i>12th day</i>																								
-	<b>Descriptive Statistics</b>																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Sample Size</th> <th>Mean</th> <th>Standard Deviation</th> <th>SE of Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Madecassol</td> <td>5</td> <td>2,4</td> <td>0,89443</td> <td>0,4</td> </tr> <tr> <td>ASO</td> <td>5</td> <td>2</td> <td>0,70711</td> <td>0,31623</td> </tr> <tr> <td>Placebo</td> <td>5</td> <td>18,2</td> <td>1,48324</td> <td>0,66332</td> </tr> </tbody> </table>		Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean	Madecassol	5	2,4	0,89443	0,4	ASO	5	2	0,70711	0,31623	Placebo	5	18,2	1,48324	0,66332				
	Sample Size	Mean	Standard Deviation	SE of Mean																					
Madecassol	5	2,4	0,89443	0,4																					
ASO	5	2	0,70711	0,31623																					
Placebo	5	18,2	1,48324	0,66332																					
-	<b>One Way ANOVA</b>																								
-	<b>Overall ANOVA</b>																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F Value</th> <th>Prob&gt;F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Model</td> <td>2</td> <td>853,73333</td> <td>426,86667</td> <td>365,88571</td> <td>1,7638E-11</td> </tr> <tr> <td>Error</td> <td>12</td> <td>14</td> <td>1,16667</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>14</td> <td>867,73333</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>Null Hypothesis: The means of all levels are equal.  Alternative Hypothesis: The means of one or more levels are different.  At the 0.05 level, the population means are significantly different.</p>		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F	Model	2	853,73333	426,86667	365,88571	1,7638E-11	Error	12	14	1,16667			Total	14	867,73333			
	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F																				
Model	2	853,73333	426,86667	365,88571	1,7638E-11																				
Error	12	14	1,16667																						
Total	14	867,73333																							
-	<b>Fit Statistics</b>																								
	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>R-Square</th> <th>Coeff Var</th> <th>Root MSE</th> <th>Data Mean</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>0,98387</td> <td>0,14338</td> <td>1,08012</td> <td>7,53333</td> </tr> </tbody> </table>		R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean		0,98387	0,14338	1,08012	7,53333														
	R-Square	Coeff Var	Root MSE	Data Mean																					
	0,98387	0,14338	1,08012	7,53333																					

Test-t de Student : Madécassol<sup>®</sup> et huile d'Argan.

**Descriptive Statistics** ▾

	N	Mean	SD	SEM
"madécassol"	5	2,4	0,89443	0,4
"ASO"	5	2	0,70711	0,31623
Difference		0,4		

**t-Test Statistics** ▾

	t Statistic	DF	Prob> t
Equal Variance Assumed	0,78446	8	0,45537
Equal Variance NOT Assumed	0,78446	7,59551	0,45653

Null Hypothesis: mean1-mean2 = 0

Alternative Hypothesis: mean1-mean2 <> 0

At the 0.05 level, the difference of the population means is NOT significantly different with the test difference(0)

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES

- 1- Quezel, P., Santa, S., "Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales", V. II, Ed. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris. (1963), 1170 p.
- 2- Bruneton, J., "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Lavoisier, Paris. (1999), 1120 p.
- 3- Leclerc, L., "Traduit de l'arabe de Al Baytar, Ibn Al Baytar, XIIIe siècle – *Zami'al-mufradat* ou *Traité des Simples*", I-III (1re éd. 1877-1883). (1989).
- 4- Radi, N., "L'Arganier arbre du sud ouest marocain, en péril, à protéger", Thèse Doctorat en pharmacie, Université de Nantes, (2003), 59-62.
- 5- Charrouf, Z., Guillaume, D., "Ethnoeconomical, ethnomedical and phytochemical study of *Argania spinosa* (L) Skeels", *Journal of Ethnopharmacology*. V. 6, (1999), 7-14.
- 6- Charrouf, Z., "L'huile d'Argane, une prodigieuse vitalité née au bord du désert". In *Espérance médicale*, V. 9, N°87, (2002).
- 7- Farines, M., Soulier, J., Charrouf, M., Gavé, A., "Etude de l'huile des graines d'*Argania spinosa* (L.) Sapotaceae. II-Stérols, Alcools triterpéniques et méthylstérols de l'huile d'Argan". *Revu. Franç. Corps Gras*, V. 11: (1984), 443-448.
- 8- Maurin, R., "L'huile d'argane .*Argania spinosa* (L) Skeels, Sapotaceae : Mise au point", *Revu. Franç. Corps Gras*. V. 39. (1992). 139-46.
- 9- Charrouf, Z., Guillaume, D., "Huile d'Argan une production devenue adulte", *Les Technologies de laboratoire - N°6* (Septembre - Octobre 2007).
- 10- Eisenberg, D.M., Davis, R.B., Ettner, S.L., Appel, S., Wilkey, S., Van Rompay, M. et Kessler, R.C., "Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey", *The Journal of American Medical Association*, V.280, n°18, (1998),1569-1575.
- 11- Kitwa, A.Y. et Malebo, H.M., "Malaria control in Africa and the role of traditional medicine", in: Wilcox, M., bodeker, G. and Rasoanaivo P., "Traditional Medecinal plants anti malaria", CRC Press, boca Raton, FL, (2004), 3-18.

- 12-** Millogo, H., Guisson, I. P., Nacoulma, O. et Traore, A. S., “Savoir traditionnel et médicaments traditionnels améliorés”, Colloque du 9 décembre. Centre européen de santé humanitaire –Lyon, (2005).
- 13-** Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D. et Guo, Z., “Places des plantes médicinales dans la thérapeutique”, Bulletin de l'organisation mondiale de la santé, V. 64, n° 2, (1986), 159-164.
- 14-** Organisation mondiale de la santé (O.M.S.), “Promotion et développement de la médecine traditionnelle”, Séries de rapports techniques, 622, Genève, (1978).
- 15-** Strang, C., “Larousse médical”, Ed Larousse, (2006).
- 16-** Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., Zha, E., De la Roque, R., De la Roque, O., Vican, P., Deelesalle –Féat, T., Biaujeaud, M., Ringuet, J., Bloth, J. et Botrel, A., “Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins”, Ed Larousse. (2001), 10-12.
- 17-** Elqaj, M., Ahami, A. et Belghyti, D., “La phytothérapie comme alternative à la résistance des parasites intestinaux aux antiparasitaires”, Journée scientifique ressources naturelles et antibiotiques”, Maroc, (2007).
- 18-** Guignard, J. L., “Biochimie végétale”, 2ème Ed. de l'Abrégé Dunod, Paris, (2000), 177-185.
- 19-** Hopkins, W. G., “Physiologie végétale”, De Boek & Larcier. Bruxelles. (2003), 514 p.
- 20-** Hostettmann, K., Potteray, O. et Wolfender, J. L., “The potential of higher plants as a source of new drugs”, Chimie, V.52, (1998), 10-17.
- 21-** Bruneton J., “Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales”, 3ième Edition, éd. Lavoisier Tech et Doc., (1999), 1120 p.
- 22-** Tyler, V. E., Bardy, L. R. et Robers, J. E., “Pharmacognosy”, Lea & Febiger, Philadelphia. (1981), 520 p.
- 23-** Guignard, J. L., Cosson, L. et Henry, M., “Abrégé de phytochimie”, éd. Masson, Paris, (1985), 155-174.
- 24-** Ribéreau-Gayon, P., “Les composés phénoliques des végétaux”, Ed. Dunod, Paris. (1968), 254 p.
- 25-** Vermerris, W. et Nicholson, R., “Phenolic compounds biochemistry”, Ed Springer, Gainesville.USA., (2006), 285 p.
- 26-** Harborne, J.B., “Introduction to chemical ecology”, 4ème édition, Academic press, London, (1993), 317 p.
- 27-** Herbert, R.B., “The Biosynthesis of secondary metabolites”, 2ème edition Chapman and Halle (1989), 11-115.

- 28-** Macheix, J.J., Fleriet, A. et Christian, A., “Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique”, PPTUR Lausanne, (2005).
- 29-** Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., et Sapirstein, H.D., “Phenolic content and antioxidant activity of Pearled wheat and Roller-Milled. Fractions”, *Cereal chem.*, V.82, n°4, (2005), 390- 393.
- 30-** Guignard, J.L., “Abergé de Biochimie végétale à l'usage des étudiants en pharmacie”, Masson. Paris. (1974), 146-155.
- 31-** Richter, R., “Métabolisme des végétaux physiologie et biochimie”, PPUR. Lausanne (1993), 319-322.
- 32-** Psotova, J., Lasovsky, J. et Vicar, J., “Metal chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolic”, *Biomed.*, V.12, (2003), 174- 153.
- 33-** Haborne, J.B., “Plant phenolics in Encyclopedia of plant physiology”, vol 8, Bell EA, Charlwood BV, ed Springer-Verlag, Berlin; (1980). ”In: Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique”, Macheix, J.J., Fleriet, A., and Christian, A., PPTUR Lausanne, (2005), 329-402.
- 34-** Heller, R., Esnault, R., et Delance, C., “Physiologie végétale : -nutrition”, 6ème édition. Dunod. Paris, (1998), 289-288.
- 35-** Medic Saric, M., Jasprica, I., Smoleic-Bubalo, An et Mornar, A., “Optimisation of chromatographic condition in thin layer chromatography of flavonoïdes and phenolic acids”, *Croatian chemica acta.*, V.77, n°1-2, (2004), 361-366.
- 36-** Marfak, A., “Radiolyse gamma des flavonoides, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides”, Thèse pour obtenir le grade de docteur de l'université de Limoges. Spécialité : biophysique. (2003).
- 37-** Haslam, E., “Plant polyphenols, vegetable tannins revisited Cambridge University Press, Cambridge”, (1989), P 230. In: “Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaire d'importance économique”, Macheix, J.J., Fleriet, A., et Christian, A. PPTUR Lausanne, (2005).
- 38-** Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van-Poel, B., Pieters, L., Vlietinck Vanden, A.J. et Berghe, D., “Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers”, *J. Nat. Prod.*, V.61, (1998), 71-76.
- 39-** Di Carlo, G., Masco-Jo, N., Izzo A.A. et Capasso, F., “Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs”, *Life Sci.*, V.65, (1999), 337-353.
- 40-** Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jak-bkiewicz-Banecka, J. et WÂgrzyn, G. “Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures”, *Biologia*, V. 62: (2007), 132-135.

- 41-** Cowan, M. M., “Plant Products as Antimicrobial Agents”, *Clin. Microbiol. Rev.*, V.12, (1999), 564-582.
- 42-** Landolfi, R., Mower, R.L. et Steiner M., “Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations”, *Biochem Pharmacol.*, V. 33, (1984), 1525-1530.
- 43-** Bracke, M.E., Van Larebeke N.A., Vyncke, B.M. et Mareel, M.M., “Retinoic acid modulates both invasion and plasma membrane ruffling of MCF-7 human mammary carcinoma cells in vitro”, *Br. J. Cancer*, V.63, (1991), 867-872.
- 44-** Van der Vossen, H.A.M. et Mkamilo, G.S. (Editeur), “Ressources végétales l’Afrique tropicale. Oléagineux”, Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas/ Backhuys Publishers, Leiden, Publishers, Leiden, Pays-Bas/CTA, Wageningen, Pays-Bas, (2007), 261p.
- 45-** Guilloton, M. et Quintard, B., “Biochimie”, Dunod (Eds.), Paris, (2002).
- 46-** Klere, J., Barsacq, J.C., Uzzan, A., Karleskind, A. et Hochad, J.M., “Généralités. In : Karleskind A, ed. Manuel des corps gras”, V.1, Paris, Lavoisier Tec & Doc, (1992), 1-64.
- 47-** Naudet, M., Soulier, J. et Farines, M., “Principaux constituants chimiques des corps gras. In : Karleskind A, ed. Manuel des corps gras”, V.1, Paris : Lavoisier Tec & Doc, (1992), 65-115.
- 48-** Legrand, P., Bourre, J.M., Descomps, B., Durand, G. et Renaud, S., “Lipides. In : Martin A, ed. Apports nutritionnels conseillés pour la population française”, Paris, Lavoisier Tec & Doc, (2001), 63-82.
- 49-** Boskou, D., “OLIVE OIL. In : Gunstone, F.D., ed. Vegetable oils in food technology, composition, properties and uses”, Oxford : Blackwell Publishing Ltd., (2002), 244-77.
- 50-** Kebbadj, K., “Contribution à la connaissance des propriétés de l’huile d’Argan utilisée en dermocosmétologie”, Thèse doctorat pharmacie, Paris, (1986), 28-73.
- 51-** Radi, N., “L’Arganier arbre du sud ouest marocain, en péril, à protéger”, Thèse pour le diplôme d’état de Docteur en pharmacie. Université de Nantes, (2003).
- 52-** Nouaim, R., Chaussod, R., El Aboudi, A., Schnabel, C. et Peltier, J. P., “L’Arganier. Essai de synthèse des connaissances sur cet arbre. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi- arides”, Groupe d’étude de l’arbre (Paris), (1991), 373-388.
- 53-** Wagret, P., “L’Arganeraie du Sud Marocain relique du tertiaire et providence des populations”, *Nature Science Progrès*, V. 85, (1962), 390-393.
- 54-** Morocco Guide. “Archive for the Français Maroc Catégorie, L’Arganier une richesse sous estimé du Maroc”, (2006).



- 55-** Nouaim, R., “Biologie de l'arganier: Exemple de programme scientifique à vocation appliquée. In : Actes des Journées d'étude sur l'Arganier”, (Septembre 2005), Groupement d'études et de la recherche pour la promotion d'Essaouira (G.E.R.P.E).
- 56-** Tazi M. R., Berrichi A. et Haloui B., “Note brève Esquisse cartographique de l'aire de l'arganier *Argania spinosa* (L.) Skeels au Maroc nord-oriental”, Bulletin de l'Institut scientifique, Rabat, section Sciences de la vie, n°25, (2003), 53-55.
- 57-** Slimani H., “Contribution à l'étude de l'Arganier de deux provenances, Tindouf et Mostaganem”, Mémoire d'ingénieur d'état en biologie, Université de Mostaganem, (1996).
- 58-** Alifriqui M., “L'écosystème de l'arganier”, P.N.U.D., Maroc, (2004), 124 p.
- 59-** M'hirit O., Benzyane, M., Benchakroune, F., El yousfi, S.M. et Bendaanoun, M., “L'arganier une espèce fruitière-forestière a usages multiples”, I.S.B.N. pierre Mardaga-Belgique. (1998), 11 p.
- 60-** Nouaim, R. et Chaussod, R., “L'arganier (*Argania spinosa* (L) Skeels) ”, Le Flamboyant bulletin de liaison des membres du réseau arbres tropicaux n°27. (Septembre, 1993).
- 61-** Scriban R., “Biotechnologie”, Ed tec et doc., (1999), 613p.
- 62-** Rouihi, R., “Anatomie de l'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) ”, Actes du colloque international sur l'arganier, Agadir, (1991), 100 – 103.
- 63-** Bezzala, A., “Essai d'introduction de l'arganier (*Argania spinosa* (L) Skeels) dans la zone de M'doukel et évaluation de quelques paramètres de résistance à sécheresse”, Mémoire de Magister en sciences agronomiques, Université El Hadj Lakhdar, Batna, (2005).
- 64-** Jaccard, P., “L'Arganier Sapotaceae oléagineuse du Maroc”, *Pharmaceutica Acta Helveticae*, (1926), 203-209.
- 65-** Emberger, L., “A propos de distribution géographique de l'Arganier”, *Bull. Sté. Sciences nat. Et phys.*, V.4, (1924), 151-153.
- 66-** Tonelli, N. et Gallouin, F., “Des fruits et des graines comestibles du monde entier”, (2013).
- 67-** Monteuis, O., “Bois et forêt des tropiques : multiplication D'*Argania spinosa*”, V. 2, n° 304, (2010), 50 p.
- 68-** Belaskri, A., “Contribution à l'étude de la localisation, de la germination et de rhizosphère d'*Argania spinosa*”, Mémoire d'ingénieur d'Etat. Université de Djillali Liabes. Sidi- Bel-Abbès, (2002).
- 69-** Henry, F., Laure, P., Charrouf, Z., Pauly, G., et Flaconnet, G., “Bois et forêts des tropiques. Arbre utiles, valorisation des feuilles d'arganier : impact environnemental”, (2006), 42 p.

- 70-** Benzyane, M., Khatouri M., “Estimation de la biomasse des peuplements d’Arganier. Annales de la recherche forestiere au Maroc”, (1991), 128-140.
- 71-** Chriqi, A., Ballouk, A., Houjjaji, A., Adnan, A., Bacha, L. et Addebbous, R., “Huile d’argan : un produit du terroir : quelle stratégie pour sa valorisation ? ”, *Terre et Vie*, n° 70, (2003).
- 72-** Charrouf, Z., “Valorisation de l’huile d’argan. Résultats et perspectives. In : Collin et Garneau, ed. *Produits naturels d’origine végétale*”, Actes du cinquième colloque <sup>1</sup>- Sainte-Foy (Québec), Université du Québec à Chicoutimi (Canada), (2002).
- 73-** El Kabouss, A., Charrouf, Z., Touati, D., Cherrah, Y., Nouaim. R., et Anton, R., “Etude des flavonoïdes des feuilles de l’arganier”, In colloque « *La Foret à désertification : cas des Arganerais* », (Octobre 1995).
- 74-** Chahboun, J., “La filière triterpénique dans les lipides des feuilles d’*Argania spinosa*”, Thèse d’Université, Université de Perpignon, France, (1993).
- 75-** Harhar, H., “Contribution a la valorisation de l’Arganier (*Argania Spinosa*) Sapotaceae) ”, Thèse, Université mohammed V-Agdal-Rabat, (2009).
- 76-** Oulad-Ali M., Kirchner, V., Weniger, B., Anton, R., Guillaume, D. et Charrouf, Z., “Structure elucidation of three triterpene glycosides from the trunk of *Argania spinosa*”, *Journal of Natural Products*, V. 59, (1996), 193-195.
- 77-** Hamdouch-Aouad, S., “Etude de la composition de la pulpe d’*Argania spinosa* (L) Sapotaceae”, Thèse de 3<sup>me</sup> Cycle, Université Hassan II. Faculté des sciences Ben M’sik. Casablanca, (1995).
- 78-** Fellat-Zerrouk, K., Smoughen, S. et Maurin, R., “Etude de la pulpe du fruit de l’arganier (*Argania spinosa*) du Maroc. Matière grasse et latex”, Actes Institut. Agron .Vét .Rabat, V. 7, (1987), 17-22.
- 79-** Charrouf, Z., J. M. Wieruszkeski, S. Fkih-Tetouani, Y. Leroy, M. Charrouf, et Fournet, B., “Triterpenoid saponins from *Argania spinosa*”, *Phytochemistry*, V. 31, (1992), 2079-2086.
- 80-** Charrouf, M., “Contribution de l’étude chimique de l’huile d’*Argania spinosa* (L.) (Sapotaceae)”, Thèse Sciences, Univ Perpignon, (1984).
- 81-** Rahmani, M., “Contribution à la connaissance de l’huile d’argan”, Mémoire de 3<sup>eme</sup> Cycle. Institut Agronomique et Vétérinaire, Rabat, (1989).
- 82-** Charrouf Z., “Valorisation des produits de l’arganier pour une gestion durable des zones arides du sud-ouest marocain”, Dans Collin, G. et Garneau, F.-X. (dir.), *Actes du 4<sup>e</sup> Colloque Produits naturels d’origine végétale (Ottawa 26-29 Mai 1998)*, Laboratoire d’analyse et de séparation des essences végétales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi, Québec, (1999), 195-209.

- 83-** Chimi, H., Rahmani, M., Cillard, J. et Cillard, P., “Etude de la fraction phénolique des huiles d’olives vierges et d’argan du Maroc”, Actes de l’institut agronomique et vétérinaire 8, (1988), 17–22.
- 84-** Boukhobza, M. et Pichon-Prum, N., “L’Arganier, ressource économique et médicinale pour le Maroc”, *Phytotherapy*, V. 27, (1988), 21-26.
- 85-** Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spieglehader, B., Batsh, H. et Owen, R. W., “Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, squalene, sterols, and tocophérols and phénolics antioxidants should confer valuable cancer chemo- preventive effects”, *Eur. Journal Cancer prev.*, V.12, (2003), 77-75.
- 86-** Feng, S., Luo Z., Tao, B., Chen, C., “Ultrasonic-assisted extraction and purification of phenolic compounds from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) rinds”, *Food Science and Technology*. (2014), V. 60, N°2, 970-976.
- 87-** Slinkard, K. et Singleton, V. L., “Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods”, *Am J Enol Vitic.*, V.28, (1977), 49-55.
- 88-** Kim, D., Chun, O., Kim, Y., Moon, H., et Lee, C., “Quantification of phenolics and their antioxidant capacity in fresh plums”, *J. Agric. Food Chem.*, V.51, (2003), 6509-6515.
- 89-** Taleuzzaman, M., Ali, S., Gilani, S.J., Imam, S.S. et Hafeez, A., “Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review”, *Austin J Anal Pharm Chem.*, V.2, n°6, (2015), 1056.
- 90-** Guilhaus, M., “Special feature: Tutorial. Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts”, *Journal of Mass Spectrometry*, V. 30, (1995), 1519-1532.
- 91-** Gaskell, S.J., “Electrospray: Principles and Practice”, *Journal of Mass Spectrometry*, V. 32, (1997), 677 p.
- 92-** Banerjee, S. et Mazumdar, S., “Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte”, *International Journal of Analytical Chemistry*, (2012), 1-40.
- 93-** <http://spectra.psc.riken.jp/>
- 94-** <http://www.massbank.jp>
- 95-** Floegel, A., Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I. et Chun, O.K., “Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods”, *Journal of Food Composition and Analysis*, V.24, (2011), 1043–1048.
- 96-** Popovici, C., Saykova, I. et Tylkowski, B., “Evaluation de l’activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH”, *Revue de Génie Industriel*, V. 4, (2009), 25-39.

- 97-** Cuendet, M., Potterat, O., Salvi, A., Testa, B. et Hostettmann, K., “A stilbene and dihydrochalcone with radical scavenging activities from *Loiseleuria procumbens*”, *Phytochemistry*, V. 54, (2000), 871-874.
- 98-** Anonyme, “Standardisation de l’antibiogramme en médecine humaine à l’échelle nationale”, 4ème Edition, (2005), 94 p.
- 99-** Alkhatib, R., “Etude phytochimique et activité cytotoxique des métabolites secondaires de *Ferula elaeochytris* Korovin et *Ferula lycia* Boiss (Apiacées) ”, Thèse de doctorat en Chimie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, (2010).
- 100-** Alias, M., Shakir, C., Mohammad, I.F. et Yousif, E., “Synthesis and cytotoxic effect on RD cell line of Pd(II) and Cu(II) ”, *J Saudi Chem Soc.*, V. 20, (2016), 24–32.
- 101-** Abdolmaleki, S., Ghadermazi M, Fattahi, A. et Sheshmani, S., “Synthesis, characterization, spectral studies and cytotoxic effects of mixed-ligand mono and binuclear copper (II) complexes and their amide ligands”, *Inorg Chim Acta.*, V. 443, (2016), 284–298.
- 102-** Betsabé Hernández-Santos, Jesús Rodríguez-Miranda , Erasmo Herman-Lara , Juan G. Torruco-Uco , Roselis Carmona-García , José M. Juárez-Barrientos , Rubí Chávez-Zamudio , Cecilia E. Martínez-Sánchez , “ Effect of oil extraction assisted by ultrasound on the physicochemical properties and fatty acid profile of pumpkin seed oil (*Cucurbita pepo*) ”, *Ultrasonics Sonochem.*, V.3, (2016), 429–436.
- 103-** Lion, P.H., “Travaux pratiques de chimie organique”, Ed. Dunod. Paris, (1955), 95 p.
- 104-** Wolff, “Manuel d’analyse des corps gras”, Ed Azoulay Paris, (1968), 524 p.
- 105-** Anonyme, Association Française de Normalisation (A.F.N.O.R.), NF ISO 3657, “Corps gras d’origine animale et végétale : Détermination de l’indice de saponification ”, Indice de classement : TGO-206, (2003).
- 106-** Anonyme, Association Française de Normalisation (A.F.N.O.R.), NF ISO 709, “Essentiel oil : Détermination of ester value”, Indice de classement : T75-104, (2002).
- 107-** De maack F et sablier M. “Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse ”, *Techniques de l’Ingénieur, traité Analyse et Caractérisation* (1997), 614 p.
- 108-** Anonyme, International standard organization ISO 12966-2, Corps gras d’origines animale et végétale — Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d’acides gras — Partie 2: Préparation des esters méthyliques d’acides gras International standard organization, Geneva, (2011).
- 109-** Pirisi F.M ., Cabras P., Falqui Cao C., Migliorinr M., Muggelli M., “Phenolic Compounds in virgin olive oil.2. Reappraisal. of the extraction, HPLC separation, and Quantification Procedures”, *J. Agric. Food Chem.*, V. 48, (2000), 1191-1196.
- 110-** Venezuela-Barra, G., Castro, C., Figueroa, C., Barriga, A., Silva, X., Las de Heras, B., Hortelano, S., Delpont, C., “Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis

from two locations in Región Metropolitana de Santiago Chile”, *J. Ethnopharmacol.*, V. 168, (2015), 37–44.

**111-** Draize, J.H., Woodard, G. et Calvery, H.O., “Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes”, *Pharmacol. Exp. Therap.*, V. 82, (1944), 377-390.

**112-** Organization for Economic Cooperation and Development OECD . “Guidelines for the testing of chemicals, No.404 acute dermal irritation / corrosion”, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, (2002), 8 -12.

**113-** Mekonnen, A., Sidamo, T., Asres, K. et Engidawork, E., “In vivo wound healing activity and phytochemical screening of the crude extract and various fractions of *Kalanchoe petitiiana* A. Rich (Crassulaceae) leaves in mice”, *J. Ethnopharmacol.*, V. 145, (2013), 638–646.

**114-** Jia, Y., Zhao, G. et Jia, J., “Preliminary evaluation: The effects of *Aloe ferox* Miller and *Aloe arborescens* Miller on wound healing”, *J. Ethnopharmacol.*, V. 120, (2008), 181–189.

**115-** Eruygur, N., Yılmaz, G., Kutsal, O., Yücel, G. et Üstün, O., “Bioassay-guided isolation of wound healing active compounds from *Echium* species growing in Turkey”, *J. Ethnopharmacol.*, V. 185, (2016), 370-376.

**116-** Panusa, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Multari, G. et Gallo, F.R., “UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling of *Arctostaphylos pungens* and *Arctostaphylos uva-ursi*. A comparative study of phenolic compounds from leaf methanolic extracts”, *Phytochem.*, V. 115: (2015),79-88.

**117-** Rodríguez-Medina, I.C., Segura-Carretero, A. et Fernández-Gutiérrez, A., “Use of high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray-Qq-time-of-flight mass spectrometry for the direct characterization of the phenolic fraction in organic commercial juices”, *J Chromatogr A.*, V. 1216, (2009), 4736–4744.

**118-** Dutra-Sousa, A., Vitorino-Maia, A.I., Soares-Rodrigues, T.H., Canuto, K.M., Vasconcelos-Ribeiro, P.R., Alves-Pereira, R.C., Vieira, R.F. et Sousa-de-Brito, E., “Ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus amarus* and its composition evaluation by UPLC-QTOF”, *Ind Crop Pro.*, V. 79: (2016), 91–103.

**119-** Zemmouri, H., Ammar, S., Boumendjel, A., Messarah, M., El-Feki, A. et Bouaziz, M., “Chemical composition and antioxidant activity of *Borago officinalis* L. leaf extract growing in Algeria”, *Arab J Chem*; In Press., (2014), 1-10.

**120-** Alonso-Salces, R.M., Ndjokob, K., Queiroz, E.F., Ioset, J.R., Hostettmann, K., Berrueta, L.A., Gallo, B. et Vicente, F., “On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection”, *J Chromatogr A.*, V. 1046, (2004), 89–100.

- 121-** Lhuillier, A., Fabre, N., Moyano, F., Martins, N., Claparols, C., Fouraste, I. et Mo C., “Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry”, *J Chromatogr A*, V. 1160, (2007), 13–20.
- 122-** Ma, C., Dastmalchi, K., Flores, G., Wu, S., Pedraza-Penalosa, P., Long, C. et Kennelly, E., “Antioxidant and metabolite profiling of North American and neotropical blueberries using LC-TOF-MS and multivariate analyses”, *J Agric Food Chem.*, V. 61, (2013), 3548–3559.
- 123-** Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F. et Veberic, R., “HPLC–MS<sup>n</sup> identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated b~ species”, *Food Chem.*, V. 135, (2012), 2138–2146.
- 124-** Kchaou, W., Abbès, F., Ben-Mansour, R., Blecker, C., Attia, H. et Besbes, S., “Phenolic profile, antibacterial and cytotoxic properties of second grade date extract from Tunisian cultivars (*Phoenix dactylifera* L.)”, *Food chem.*, V. 194, (2016), 1048–1055.
- 125-** El-Haci, I. A., Bekhechi, C., Atik-Bekkara, F., Mazari, W., Gherbi, M., Bighelli, A., Casanova, J. et Tomi, F., “Antimicrobial activity of *Ammodaucus leucotrichus* fruit oil from Algérian Sahara”, *Ntural Product Communications*, V. 9, n°5, (2014), 711-715.
- 126-** Fellah, H., Ksouri, r. et Abdelly, C., “Activité antioxydante et contenu en poly phenols dans les different organes de l’artichaut sauvage, *Cynara cerdunculus*”, *Revue des régions Arides*, V. 1, (2007), 341-344.
- 127-** Djidel, S., Chater, C.F., Khennouf, S., Baghiani, A. et Harzallah, D., “Evaluation of phenolic compounds, flavonoids and antioxidant propreties of *Argania spinosa* L. Skeels leaf extracts”, *Glob. J Res Med Plants Indig Med.*, V. 3, (2014), 416–426.
- 128-** Fahmi, F., Tahrouch, S. et Hatimi, A., “Geoclimatic influences on flavonoids contents of the leaves of the argan tree Influences géoclimatiques sur la composition en flavonoides des feuilles de l’arganier *Argania spinosa*”, *J. Mater. Environ. Sci.*, V. 4, n°6, (2013), 881-886.
- 129-** El-Babili, F., Bouajila, J., Fouraste, I., Valentin, A., Mauret, S. et Moulis, C., “A Chemical study,antimalarialandantioxidantactivities,andcytotoxicityto human reast cancer cells (MCF7) of *Argania spinosa*”, *Phytomedicine*, V. 17, (2010), 157–160.
- 130-** El-Monfalouti, H., Charrouf, Z., Belviso S., Ghirardello, D., Scursatone, B., Guillaume, D., Denhez, C. et Zeppa, G., “Analysis and antioxidant capacity of the phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa* (L.) Skeels)”, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, V.114, (2012), 446–452.
- 131-** Čujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G. et Ibrić, S., “Optimization of polyphenols extraction from dried choke berry using maceration as traditional technique”, *Food Chem.*, V.194, (2016), 135–142.

- 132-** Tahrouch, s., Andary, C., Rapior, S., Mondolot, L., Gargadennec, A., et Fruchier, A., “Polyphenols investigation of *Argania spinosa* (Sapotaceae) endemic tree from Moroc ” *Acta Bot Gallica*, V.147, (2000), 225-232.
- 133-** Tahrouch, S., Hatimi, A., Rapior, S., Mondolot, L., Gargadennec, A. et Andary, C., “PHENOLIC COMPOUNDS OF ARGAN TREE, *ARGANIA SPINOSA* (ENDEMIC SPECIES OF SOUTH WESTERN MOROCCO)”, *Online J Sci Technol.*, V. 1, (2011), 17-24.
- 134-** Charrouf, Z., Hilali, M., Jauregui, O., Soufiaoui, M. et Guillaume, D., “Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy”, *Food Chemistry*, V. 100, (2007), 1398–1401.
- 135-** Watson, R.R., Preedy, V.R. et Zibadi, S., “Polyphenols in Human Health and Disease”, first ed., Academic Press, Elsevier Publisher, USA, (2013).
- 136-** Rice-Evans, C., Miller, N. et Paganga, G., “Antioxidant properties of phenolic compounds”, *Trends plant sci.*, V. 2, (1997), 152–159.
- 137-** Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. et Corke, H., “Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer”, *Life Sci.*, V. 74, (2004), 2157 – 2184.
- 138-** Tomás-menor, L., Morales-soto, A., Barraón-catalán, E., Roldán-segura, C., Seguracarretero, A. et Micol, V., “Correlation between the antibacterial activity and the composition of extracts derived from various Spanish *Cistus* species”, *Food Chem Toxicol.*, V. 55, (2013), 313–322.
- 139-** Okoth, D.A., Chenia, H.Y. et Koorbanally, N.A., “Antibacterial and antioxidant activities of flavonoids from *Lannea alata* (Engl.) Engl. (Anacardiaceae) ”, *Phytochem Lett.*, V. 6, (2013), 476–481.
- 140-** Pretorius, J.C., Magama, S. et Zietsman, P.C., “Purification and identification of antibacterial compounds from *Euclea crispa* subsp. *crispa* (Ebenaceae) leaves”, *S Afr J Bot.*, V. 69, (2003), 579–586.
- 141-** Lewandowska, H., Kalinowska, M., Lewandowski, W., Stępkowski, T.M. et Brzóska, K., “The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development”, *S Afr J Bot.*, V. 32, (2016), 1–19.
- 142-** Wätjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y. et Kampkötter, A., Tran-Thi, QH, Proksch P, Kahl R. “Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis”, *J Nutr.*, V. 135, (2005), 525-31.
- 143-** Charrouf, Z. et Guillaume, D., “Argan oil : Occurrence, composition and impact on human health”, *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, V. 110, (2008), 632-636.

- 144-** Cheng, H.X., Zeng, Y.C., Jia, B.Y., Fang, C.F. et Cheng, W.M., “Screening and identification of various components in *Thalictrum fortunei* using a combination of liquid chromatography/time-of-flight tandem mass spectrometry”, *Pharmazie*, V. 67, (2012), 106–110.
- 145-** Saldanha, L.L., Vilegas, W. et Dokkedal, A.L., “Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess. using FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> and HPLC-PAD-ESI-IT-MS combined with NMR”, *Molecules*, V. 18, (2013), 8402-8416.
- 146-** Jerman, T., Trebše, P. et Vodopivec, B.M., “Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds”, *Food Chem.*, V. 123, (2010), 175–182.
- 147-** Dastmalchi, C., Flores, K., Wu, G., Pedraza-Penalosa, S., Long, P. et Kennelly, E., “Antioxidant and metabolite profiling of North American and neotropical blueberries using LC-TOF-MS and multivariate analyses”, *J Agric Food Chem.*, V. 61, (2013), 3548–3559.
- 148-** Mountasser, A. et El Hadek, “Optimisation des facteurs influençant l'extraction de l'huile d'argan par presse”, *OCL.*, V. 6, n° 3, (1999), 273-279.
- 149-** Belarbi B. M., Khaldi D., Beghdad C., Gouzi H. et Bendimerad N., “Physicochemical and nutritional study of argan oil (*Argania spinosa* L.) in south-western Algeria”, *Piment and Resin Technology*, V. 39, n° 2, (2009), 96-99.
- 150-** Charrouf. Z., “Contribution à l'étude chimique de l'huile d'*Argania spinosa* (L) Sapotaceae”, Thèse de doctorat université de Perpignan (1984), 90-220.
- 151-** Ollé, M., “Direction de la concurrence, de la consommation et de répression des fraudes interrégional de Montpellier”, Dossier P3325. *Technique d'analyse*, V. 4, (2002).
- 152-** Services de normalisation industrielle Marocaine S.N.I.M.A., Norme Marocaine ; Service de normalisation industrielle marocaine, S.N.I.M.A., “Huile d'Argane. Spécifications”, Norme marocaine NM 08. 5. 090, Rabat, (2003).
- 153-** Maurin, R., Fellat-Zarrouk, K. et Kirs, M., “Huile d'argan, *Argania spinosa* du Maroc, Triglycérides”, Actes du congrès. *Euro-lipid. Angers*, V. 1, (1989), 151-8.
- 154-** Bruneton J., “Elément de phytochimie et de pharmacognosie”, Ed TEC et DOC Lavoisier, Paris, (1987), 585.
- 155-** Flanzly, J., “Images de la chimie”, Colloque, (1978), 73-77.
- 156-** Charrouf Z., “Valorisation de l'huile d'argan par des groupements femmes”, Colloque International sur les ressources végétales, Arganier et les plantes des zones arides et semi-arides, Agadir, 23-25 Avril (1998).
- 157-** Chimi H., Cillard J. et Cillard P., “Autoxydation de l'huile d'argan (*Argania spinosa* L.) Sapotacée du Maroc”, *Sci. des aliments*, V. 12, (1994), 67-75.



- 158-** Rojas I., Quideau S., Pardon P., Charrouf Z., “Colorimetric evaluation of phenolic compound and GC-MS characterization of phenolic composition of alimentary cosmetic Argan oil and press cake”, *J. Agri. Food Chem.*, V. 52, (2005), 9122-9127.
- 159-** Avsar, Z., Halici, E., Akpınar, M., Yayla, U., Avsar, U., Harun, U., Harun, A., Hasan T., et Bayraktutan, Z., “The Effects of Argan Oil in Second-degree Burn Wound Healing in Rats”, *Ostomy Wound Manage*, V. 62, (2016), 26-34.
- 160-** Cardoso, C.R., Souza, M.A., Ferro, E.A., Favoreto, S.J. et Pena, J.D., “Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds”, *Wound Repair Regen.*, V. 12, (2004), 235–243.
- 161-** Rodrigues, H.G., Vinolo, M.A., Magdalon, J., Vitzel, K., Nachbar, R.T., et Pessoa, A.F., “Oral administration of oleic or linoleic acid accelerates the inflammatory phase of wound healing”, *J. Invest. Dermatol.*, V. 132, (2012), 208–215.
- 162-** Cardoso, C.R., Favoreto, S. J., Oliveira, L.L., Vancim, J.O., Barban, G.B. et Ferraz, D.B., “Oleic acid modulation of the immune response in wound healing: a new approach for skin repair”, *Immunobiology*, V. 216, (2011), 409–415.
- 163-** Park, N.Y., Valacchi, G. et Lim, Y., “Effect of dietary conjugated linoleic acid supplementation on early inflammatory responses during cutaneous wound healing”, *Mediators Inflamm.*, V. 17, (2010), 1–8.
- 164-** Linz, D.N., Garcia, V.F., Arya, G. et Ziegler M.M., “Prostaglandin and tumor necrosis factor levels in early wound inflammatory fluid: effects of parenteral omega-3 and omega-6 fatty acid administration”, *J. Pediatr. Surg.*, V.29, (1994), 1065–1069.
- 165-** Yaqoob, P. et Calder, P., “Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages”, *Cell Immunol.*, V.163, (1995), 120–128.
- 166-** Kabara, J.J., Swieczkowski, D.M., Conley, A.J. et Truant, J.P., “Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents”, *Antimicrob. Agents Chemother.*, V.2, (1972), 23-8.
- 167-** Ammar, I., Bardaa, S., Mzid, M., Sahnoun, Z., Rebaïi, T., Attia, H. et Ennouri, M., “Antioxidant, antibacterial and *in vivo* dermal wound healing effects of *Opuntia* flower extracts”, *Int. J. Biol. Macromol.*, V. 81, (2015), 483–490.
- 168-** Weeks, B.S. et Perez, P.P., “A novel vitamin C preparation enhances neurite formation and fibroblast adhesion and reduces xenobiotic-induced T-cell hyperactivation”, *Med. Sci. Monit.*, V. 13, (2007), 51–58.
- 169-** Ponnusamy, Y., Chear, N.J., Ramanathan, S. et Lai, C.S., “Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation *in vitro*”, *J. Ethnopharmacol.*, V. 168, (2015), 305–314.

## Publications Internationales:

ORIGINAL ARTICLE

**ACG**  
publications

*Rec. Nat. Prod.* 11:2 (2017) 171-184

---



---

records of natural  
products

---



---

## Phytochemical Characterization and *in vivo* Anti-inflammatory and Wound-healing Activities of *Argania spinosa* (L.) Skeels Seed Oil

Hadjira Dakiche<sup>1,2,\*</sup>, Mustapha Khali<sup>1</sup> and Houcine Boutoumi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoire de Protection et de Valorisation des Ressources Agro-Biologiques, Faculté de Sciences de la Nature et de Vie, Université Saâd Dahlab Blida, BP 270, Route de Soumaâ, Blida 09000, Algeria*

<sup>2</sup> *Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques, BP 384 Zone Industrielle Bou-Ismaïl RP 42004 Tipaza, Algeria*

(Received April 21, 2016; Revised October 27, 2016; Accepted November 1, 2016)

**Abstract:** The extracted oil of *Argania spinosa* (L.) was investigated in regard to its fatty acid composition and polyphenols by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) and Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Electro Spray Ionization-Quadruple Time Of Flight-Mass Spectrometry (UPLC-ESI-QTOF-MS), respectively. The reduction rate of topical inflammation of extracted oil was calculated using a mouse model. The skin toxicity of argan oil on intact and damaged skin was assessed using a rabbit model. The findings revealed a rich content of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and presence of phenolic acids. The oil exhibited a reduction of inflammation and facilitated a healing process without any irritation. The experimental study revealed that *A. spinosa* seed oil displays remarkable wound-healing and anti-inflammatory activities related to its chemical composition. Argan oil has positive potential for skin medicinal application.

**Keywords:** *Argania spinosa* (L.) Skeels; oil; chemical composition; anti-inflammatory; wound-healing. © 2016 ACG Publications. All rights reserved.

## Original Research Article

# Biological activities and phenolic contents of *Argania spinosa* L (Sapotaceae) leaf extract

Hadjira Dakiche<sup>1,2\*</sup>, Mustapha Khali<sup>1</sup>, Ahmed Khaled Abu-el-Haija<sup>3</sup>, Ammar Al-Maaytah<sup>3</sup> and Qosay Ali Al-Balas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Protection et de Valorisation des Ressources Agro-Biologiques, Faculté de Sciences de la Nature et de Vie, Université Saâd Dahlab Bldja, BP 270, Route de Soumaâ, Bldja 09000, <sup>2</sup>Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-chimiques, BP 248, Alger RP, 16004 Alger, Algeria, <sup>3</sup>Faculty of Pharmacy, Jordan University of Science and Technology, PO Box 3030, Irbid 22110, Jordan

\*For correspondence: Email: [s-dakiche@hotmail.fr](mailto:s-dakiche@hotmail.fr); Tel: +213 555 497 211

Received: 20 June 2016

Revised accepted: 16 November 2016

## Abstract

**Purpose:** To investigate the phenolic profile and biological activities of *Argania spinosa* L. leaves.

**Methods:** The crude methanol extract of leaves of *A. spinosa* L. Skeels was obtained by ultrasonic extraction, and the total polyphenolic and flavonoid contents were determined by ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight-mass spectrometry (UPLC-ESI-QTOF-MS). *In vitro* antioxidant activity was determined by 2,2-di-phenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) radical assay and antimicrobial activity evaluated using agar disk diffusion method against reference pathogenic strains (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922). Cytotoxic activity was evaluated by methyl-thiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay.

**Results:** The results revealed abundant polyphenols and flavonoids ( $221.39 \pm 5.70 \mu\text{g GAEq/g}$  and  $66.86 \pm 3.36 \mu\text{g CAEq/g}$ , respectively) in the leaf extract. UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS profiling showed the presence of myricetin-3-galactoside, myricetin-3-glucoside, myricetin-3-xyloside, quercetin-3-galactoside, quercetin-3-glucoside, quercetin-3-arabinofuranoside, and quercetin-3-rhamnoside. DPPH assay of the leaf extract yielded a half-maximal effective concentration ( $EC_{50}$ ) value of  $125.60 \pm 1.87 \mu\text{g}$ . *A. spinosa* L. leaves exhibited antibacterial activity against Gram (+) and Gram (-) bacteria, with particularly marked activity against *B. subtilis* (inhibition zone, 16 mm). Cytotoxicity data showed that the extract inhibited the proliferation of PC3 cells ( $IC_{50} \sim 600 \mu\text{g}$ ).

**Conclusion:** *A. spinosa* L. leaf extract is rich in valuable biologically active compounds and could represent a new resource for natural and preventive therapies.

**Keywords:** *Argania spinosa*, Polyphenols, Flavonoids, Antioxidant, Antibacterial, Cytotoxic