Effet De La Pollution Minière Sur La Phytochimie D'Argania spinosa (L.) Skeels

Hakim Alilou Bouchaib Bencharki

Laboratoire d'Agroalimentaire et Santé, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1er, Route de Casablanca, Settat, Maroc.

Lalla Mina Idrissi Hassani Rachida Rouhi

Laboratoire de Biotechnologies Végétales, Département de Biologie, Faculté des Sciences Université Ibn Zohr, BP 28/S-Dakhla, Agadir, Maroc.

Noureddine Barka

Laboratoire des Sciences des Matériaux, des Milieux et de la Modélisation (LS3M), Faculté Polydisciplinaire de Khouribga, Khouribga, Morocco

Abstract

In this study, we propose new information about the argan tree in order to know the response of this tree to the difficult environmental conditions (pollution by the quarries). Since this tree is very interesting, not only by these ecological characteristics, but also by its economic potential and the value of its products.

and the value of its products.

Thus, argan trees increase the secretion of phenolic compounds and saponins in order to adapt to the new conditions. Indeed, a screening of the phenolic compounds of the argan tree leaves of three stations, different in their dust attack levels due to quarries in the Abaynou region, was made.

The results show that the Guelmim station, which is most affected by dust, has a significant difference in aglycones, total flavonoids and saponins compared to the Admine station which is further north and relatively far from any agglomeration and with the Agadir station considered intermediary.

Keywords: Argania spinosa, phenolic composition and mine pollution

Résumé

Dans la présente étude, nous proposons de nouvelles informations sur l'arganier afin de savoir la réponse de cet arbre aux conditions environnementales difficiles (pollution par les carrières). Étant donné que cet

arbre est très intéressant, non seulement par ces caractères écologiques, mais aussi par son potentiel économique et la valeur de ses produits.

Ainsi, les arganiers augmentent la sécrétion des composés phénoliques et des saponines pour pouvoir s'adapter aux nouvelles conditions. En effet, un screening des composés phénoliques des feuilles d'arganier de trois stations, différentes par leurs niveaux d'attaque par les poussières dues aux carrières de la région d'Abaynou, a été fait.

Les résultats montrent que la station de Guelmim qui est la plus touchée par les poussières présente une différence significative concernant la teneur en aglycones, en flavonoïdes totaux et en saponines en comparaison avec la station d'Admine qui se situe plus au Nord et relativement loin de toute agglomération et avec la station d'Agadir considérée comme intermédiaire.

Mots clés: Argania spinosa, composition phénolique et pollution minière

Introduction

Le genre *Argania* de la famille des *Sapotaceae* compte une seule espèce *A. spinosa* L. Skeels, (Boudy, 1950, Sauvage et Vindt, 1952). L'arganier est un arbre étonnant à plus d'un titre : il est indifférent aux caractéristiques du sol, c'est typiquement un arbre de bioclimat aride a été sec et très chaud et a hiver doux.

Le bois de l'arganier est de couleur jaunâtre très compact et de grande dureté. Il n'est utilisé que pour la fabrication de petits objets d'artisanat et comme bois de feu (Giordono, 1980).

Les études concernant la réponse adaptative de l'arganier vis à vis des conditions extrêmes, surtout la pollution minière, sont à notre connaissance rare et fragmentaire. Ainsi, nous avons jugé important d'étudier l'impact de la pollution minière sur l'arganier et de comprendre la nature de la réponse de celui-ci dans un environnement pollué. La station de Guelmim (Abainou): Sud Ouest du Maroc, environ 250 km d'Agadir comprend de nombreux arbres épars issus d'une population naturelle. Certains d'entre eux sont soumis à une forte poussière due à l'exploitation de carrières de mines à proximité. Les autres stations (Agadir et Imouzzer) sont également des populations naturelles. Mais celle d'Imouzzer est située en pleine nature (50 km Nord Est d'Agadir) et loin de toute agglomération et de toute source de pollution. La station d'Agadir est à proximité de cette grande agglomération. Nous avons jugé intéressant d'étudier la réponse d'un point de vue phénolique de l'arbre à des conditions de pollution minière.

Matériel et méthodes Matériel végétal

Le matériel végétal a été récolté à partir des trois stations Guelmim (Abainou), Agadir et Imouzzer de façon aléatoire en prenant 300 feuilles : dix feuilles par arbre et dix arbres par station. La collecte a été effectuée au mois de mai 2014. Les trois régions présentent chacune des spécificités bien propres à elles. Abainou : feuilles poussiéreuses, Admine : feuilles non poussiéreuses, mais la collecte effectuée à Agadir n'a été prise que comme intermédiaire et pour comparaison.

Les feuilles des trois régions ont été séchées à l'étuve à 50°C pendant 24 heures et broyés mécaniquement. D'autres feuilles fraîches ont été conservées pour le test des composés cyanogénétiques.

Analyses phytochimiques

Les alcaloïdes

La préparation d'extrait méthanolique consiste à prendre 2g de matériel végétal sec, finement broyé, ajoutons 100 mL de MeOH 50%, suivi d'une sonication pendant 15 min. On laisse sous agitation toute la nuit, et après filtration sur papier Whatman n°1 les extraits sont évaporés à l'aide d'un rotavapor. Les résidus sont enfin repris dans quelques mL de MeOH pur.

rotavapor. Les résidus sont enfin repris dans quelques mL de MeOH pur.

Les trois tests utilisés sont celui de Mayer, de Dragendorff et de l'Iodoplatinate qui ont un but qualitatif en se basant sur la présence ou l'absence des alcaloïdes (Randerath, 1971). On note qu'on a pris comme référence l'extrait de graine de *Peganum harmala* étant donné leur richesse en alcaloïdes.

Protocole de Mayer

On ajoute à une quantité de 0.5 g des feuilles sèches finement broyées, 15 mL de EtOH (70 %) et dans le but de détruire les parois cellulaires et libérer toutes les constituants qui baignent dans la vacuole, une sonication est effectuée pendant 15 min. Ensuite, les extraits sont laissés en agitation magnétique pendant toute la nuit, après une décantation complète on filtre sur papier Whatman n°1. L'extrait est évaporé à sec dans un rotavapor, le résidu récupéré dans quelques mL de HCl (50%) est ensuite transvasé dans deux tubes à essai, l'un est utilisé comme témoin et on rajoute à l'autre le réactif de Mayer. L'apparition de précipité blanc traduit la présence des alcaloïdes.

Protocole de Dragendorff

L'extrait MeOH est déposé sur gel de silice, en utilisant le solvant : AcEt / MeOH / NH₄OH 50 % (90/ 10 /10) pour la migration. Après celle-ci

et séchage, le chromatogramme est pulvérisé par le réactif de Dragendorff. Une coloration orange vive indique la présence des alcaloïdes.

Protocole à l'Iodoplatinate

Il repose sur le même principe que celui de Dragendorff, sauf que la révélation se fait à l'aide du réactif de l'iodoplatinate de potassium et une coloration bleue à violette prouve la présence des alcaloïdes.

Les flavonoïdes Hydrolyse acide

Elle consiste à broyer le matériel végétal déjà séché, à peser 2 g de poudre des feuilles et à les imbiber dans 160 ml de HCl 2N froid, puis à les porter au bain-marie à 100°C pendant 40 minutes, le milieu est régulièrement agité et oxygéné. Après refroidissement, le mélange est filtré à l'aide du papier Whatman. Cette hydrolyse acide transforme les proanthocyanes en anthocyanes et libère les aglycones flavoniques (Jay et *al.*, 1975).

★ Extraction et dosage des aglycones flavoniquesL'extraction se fait par l'éther éthylique qui entraîne les aglycones libérés, la chlorophylle et plusieurs composés lipophiles. L'extraction est effectuée en ampoule à décanter ; l'affrontement par l'éther utilisé étant de 2 \times 20 ml.

L'extrait à doser est repris dans l'EtOH 95% et le volume est ajusté. Les mesures sont effectuées au spectrophotomètre UV visible HP Vectra à barette diode entre 380 et 460 nm après un repos de solutions de 10 minutes. La teneur en aglycones exprimés en équivalent quercétine (flavonol) est calculée selon la formule suivante : T (en mg/g) = DO/ ε. Μ. V. d/p. ε : coefficient d'absorption molaire de la quercétine (ε =23000), DO : densité optique au pic différentiel, M : masse molaire de la quercétine (M=302), V : volume de la solution éthanolique d'aglycones, P : poids sec du matériel hydrolysé, d : facteur de dilution nécessaire.

★ Extraction et dosage des anthocyanesL'extraction se fait par le n-butanol. L'extrait méthanolique entraîne les anthocyanidines obtenues par hydrolyse acide ainsi que les C-glycosyl flavones.

Les proanthocyanes sont dosés par spectrophotomètre UV visible entre les longueurs d'ondes 380 et 460 nm, la teneur en proanthocyanes, exprimée en équivalent procyanidine est donnée par la formule suivante : T (en mg/g) = η DO/ ϵ . M. V. d/p, η : facteur de corrélation du rendement de la transformation des proanthocyanes, DO : densité optique à la longueur

d'onde d'absorption maximale, M: masse molaire de la procyanidine (M=306), V: volume de l'extrait buthanolique. d: facteur de dilution, ϵ : coefficient d'absorption molaire de la cyanidine (ϵ =34700), P: poids sec du matériel hydrolysé.

Dosages des flavonoïdes totaux

Le « blanc » est constitué de 100µl de NEU et 2 mL de méthanol qui sont mélangés et placés dans une cuve au spectrophotomètre UV visible.

On calcule la DO de la quercétine (utilisée comme référence de mesure), ainsi que les extraits de Admine, Guelmim et Agadir de la même façon, en utilisant trois répétitions à une longueur d'onde de 409 nm.

La teneur en flavonoïdes totaux est donnée par la formule de Hariri et al.,

(1991).

T Flavonoïdes (en%) = Aext . 0.05 .100 / Aq . Cext
Aext : Absorption de l'extrait, Aq : Absorption de la quercétine (à concentration de 0.05 mg/mL),
Cext : concentration de l'extrait en mg/mL.

Les composés cyanogénétiques

Une quantité de 1 g de matériel végétal frais est mouillé avec quelques gouttes de CHCl₃ dans un tube à essai où est insérée une bandelette de papier filtre imprégnée avec du picrate de sodium. L'ensemble est chauffé dans un bain marie à 35°C pendant 3 heures. Le papier vire au rouge après production de HCN témoignant de la présence des composés cyanogénétiques (Al-Yahya, 1986).

Les quinones libres

Le matériel végétal déjà séché, broyé et pesé à 1 g est pris dans un bècher contenant 10mL d'éther de pétrole. Après une agitation pendant quelques minutes, l'extrait est laissé décanter toute la journée et filtré à l'aide d'un papier filtre. L'extrait est divisé en deux : l'un constitue le témoin et on ajoute à l'autre quelques gouttes de NaOH 1 / 10 N, le virage de la phase aqueuse au jaune, rouge ou violet signifie la présence de quinones (Ribéreau-Course & Paurand 1968) Gayon & Peynaud, 1968).

Les coumarines

Une quantité de 2 g de matériel végétal séché est broyée et placée dans un bècher contenant 10 ml de CHCl₃ puis chauffée pendant quelques minutes. Après la filtration on effectue une CCM sur gel de silice, avec utilisation du solvant : toluène / acétate d'éthyle (93/7), la visualisation du chromatogramme se fait sous UV + NH₃ et sous UV à 366 nm (Ribéreau-Gayon & Peynaud, 1968).

Le test confirmatif de la présence des coumarines se fait par la préparation de 1g de matériel végétal dans quelques gouttes de H₂O, le tout est placé dans un tube à essai et couvert avec du papier filtre imbibé de NaOH dilué. Après ébullition et visualisation sous UV (365 nm) du papier filtre, toute fluorescence jaune signifie la présence des coumarines (Rizk, 1982).

Les terpènes

Une quantité de 2 g de matériel végétal est placée dans un bècher contenant 10 mL d'hexane. Après quelques minutes de sonication, l'extrait est agité pendant 30 minutes et ensuite filtré. La CCM se fait sur gel de silice en utilisant comme solvant le benzène. Après une pulvérisation de la plaque avec le chlorure d'antimoine et chauffage à l'étuve à 110 °C pendant 30 minutes, la présence des terpènes est révélée par toute fluorescence sous UV à 365nm (Randerath, 1971).

Les tanins

Le protocole expérimental utilisé consiste à prendre 1.5g de matériel végétal sec auquel est ajouté 10 mL de méthanol dans un bècher et après agitation pendant 15 minutes et filtration, l'extrait est divisé en deux : l'un est le témoin, et on ajoute à l'autre quelques gouttes de FeCl₃ à 1%. Toute coloration bleue noire signifie la présence de tanins galliques et toute coloration brun verdâtre signifie la présence de tanins catéchiques (Rizk, 1982).

Les saponines

A 2 g de matériel végétal sec est ajouté 100 ml de H₂O dans un bècher puis la solution est portée à ébullition pendant 30 minutes. Après refroidissement on filtre sur papier Whatman, et on ajuste après le filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée. On utilise dix tubes à essai pour les trois échantillons ainsi que le témoin (Saponaire), on met dans les dix tubes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10mL de filtrat et on ajuste à dix ml pour chaque tube avec de l'eau distillée. Après une agitation violente et horizontale pendant 15s pour chaque tube on laisse reposer 15 minutes et on mesure la hauteur de la mousse résiduelle (en cm).

I = Hauteur de mousse dans le 9éme tube .10 / 0.09

Si l'indice de mousse est supérieur à 100 cela signifie la présence des saponines.

Résultats et discussion Etude phytochimique

Les dosages des composés phénoliques de l'arganier ont montré des différences significatives pour les trois stations : Admine, Guelmim et Agadir et démontrent l'influence de la pollution minière sur la production des métabolites secondaires.

Dosage des anthocyanes et des aglycones

Les résultats présentés dans la figure 1 ont montré que la teneur en anthocyanes est plus élevée dans la station de Guelmim (24,162 mg/g) que dans les deux autres stations : Agadir (14,540 mg/g) et Admine (13,936 mg/g).

La comparaison des moyennes a prouvé qu'il y a une différence significative entre la station de Guelmim et les autres stations.

Quant aux aglycones, l'étude statistique a montré qu'il n'y a pas une différence significative en aglycones des feuilles d'arganier entre les trois stations. Le tableau 1 présente les résultats obtenus : les teneurs en aglycones sont presque égales. En effet, la teneur chez la station de Guelmim est de 2,286 mg/g, Agadir est de 2,393 mg/g et celle d'Admine est de 2,320 mg/g.

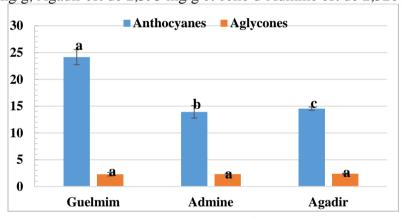


Figure 1: Teneur en anthocyanes et en aglycones des feuilles des trois stations d'*Argania* spinosa

Les flavonoïdes totaux

La figure 2 illustre les résultats des densités optiques obtenues par le spectrophotomètre UV-visible et les teneurs en flavonoïdes totaux, montrant que la station de Guelmim présente la teneur en flavonoïdes la plus élevée (2,027%), suivie de celle d'Agadir (1,946%) et d'Admine (1,685%). La comparaison des moyennes a montré une différence significative entre les trois stations.

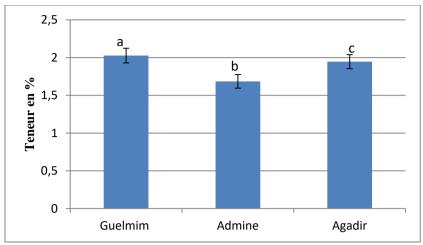


Figure 2 : différence en teneurs des flavonoïdes totaux entre les trois stations : Guelmim, Admine et Agadir

Composés cyanogénétiques

La comparaison du papier témoin (suspendu dans le tube contenant les amandes d'abricot) et celui de chaque échantillon permet de dire qu'on n'a pas un « virage de coloration en rouge » (pas de production de HCN) ce qui indique l'absence des composés cyanogénétiques chez les feuilles d'arganier.

Quinones libres

On ne constate pas un virage de coloration au jaune, rouge ou violet de la phase aqueuse des trois échantillons, ce qui signifie qu'il n'y a pas de quinones libres dans les feuilles des trois stations.

Coumarines

Après développement du chromatogramme, les bandes sont bien visibles sous UV (366nm) et sous UV+NH₃, ainsi que le test confirmatif qui permet de détecter la fluorescence jaune désignant la présence des coumarines pour les trois stations.

Terpènes

Après une pulvérisation du chromatogramme avec du chlorure d'antimoine et chauffage à l'étuve à 110 °C pendant 30 minutes, la fluorescence est bien visible sous UV à 365 nm, ce qui indique la présence des terpènes pour les stations de Guelmim, Agadir et Admine.

Tanins

La coloration brun verdâtre de l'extrait méthanolique des trois échantillons des feuilles d'arganier indique la présence des tanins catéchiques des feuilles des trois stations étudiées.

Saponines

Les résultats du tableau 2 illustrent la richesse des feuilles d'arganier de Guelmim en saponines en comparaison avec celles d'Agadir. Quant à la zone d'Admine, elle ne présente qu'une quantité très faible (même nulle) des saponines.

Tableau 2: Tableau représentatif des résultats obtenus après test des saponines pour les trois stations.

	Indices de mousse		Résultats
Témoin : Saponaire	I_{T1}	788.88	— Référence
	I_{T2}	666.66	
Guelmim	I_{11}	255.55	— Présence des saponines
	I_{21}	222.22	
Admine	I_{12}	52.22	Absence des Saponines
	\mathbf{I}_{22}	61.11	
Agadir	I_{13}	188.88	Présence des saponines
	I_{23}	288.88	

 I_{T1} et I_{T2} Indices de mousse de saponaire pour les deux tests $I_{11} \to I_{23}$ Indices de mousse des stations pour les deux tests

En générale, on peut dire que les résultats de l'étude de l'influence de la pollution minière sur les feuilles d'arganier pour les trois régions : Guelmim, Admine et Agadir ont montré que les principaux métabolites existant chez cette plante sont les flavonoïdes. Ces derniers, sont présent de fortes teneurs dans les feuilles, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Tahrouch (2000).

L'étude statistique a montré que les arbres de la station de Guelmim (Abainou), qui sont soumis aux poussières des carrières de mines, présentent les plus fortes teneurs en flavonoïdes totaux et en anthocyanes. En effet, cette augmentation pourrait être expliquée par le fait que les plantes réagissent aux agressions en augmentant leur taux de polyphénols, composés phénoliques pouvant être soumis aux importantes fluctuations face aux pressions de l'environnement contrairement aux composés du métabolisme primaire (Ribéreau-Gayon et *al.* 1968).

La réponse des arbres aux fluctuations environnementales (pollution minière) pourrait être expliquée par l'étude histochimique qui a été réalisée par plusieurs auteurs (Hariri et *al.*, 1991., Dai et *al.*, 1995., Olsson et *al.*, 1998., 1968 et Tahrouch, 2000). Ces derniers ont démontré la localisation des formes hétérosidiques, hydrosolubles, des flavonoïdes dans les vacuoles et, selon les espèces, ils se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se

répartissent entre l'épiderme et le mésophylle. En effet, l'accumulation de la quercétine et la myricétine en fortes teneurs dans les feuilles d'arganier a été bien observé par Tahrouch et al., (2000) en réalisant l'étude histochimique.

D'autres observations ont été signalées par Strid et al., 1990 et Jordan et al., 1994 concernant l'impact des processus physiologiques telle que la photosynthèse sur le taux élevé des polyphénols. En effet, la pollution minière pourrait influencer l'équilibre physiologique de la plante, puisque les feuilles qui permettent l'assimilation de la lumière et du CO₂ favorisant la photosynthèse sont couvertes des poussières. Dans ce sens, on peut dire que le taux élevé des flavonoïdes dans la station de Guelmim pourrait être dû à un facteur physiologique. Donc, la pollution minière étudiée pourrait influencer indirectement le pool phénolique de l'arganier. Et si on a trouvé des arbres chétifs et avec des feuilles atrophiées pleines de poussières ce n'est pas l'effet du hasard mais cela pourrait être dû à la poussière issue des mines d'Abainou. mines d'Abainou.

Par ailleurs, dans le cas de l'arganier le ou les facteurs affectant l'induction de la production de composés phénoliques ne peuvent pas être déterminés avec certitude (Tahrouch, 2000). Cela peut être expliqué par l'intervention de plusieurs facteurs environnementaux qui influencent la teneur en composés phénoliques de *A. spinosa* tels que : le stress dû aux herbivores (Dixon et Paiva, 1995), le stress dû aux radiations ou le stress thermique et le stress nutritionnel...

Les résultats concernant les saponines peuvent aussi entrer dans ce contexte. En effet, la présence des saponines chez les arbres de la station de Guelmim, zone la plus touchée par la pollution minière (poussières de la carrière d'Abainou) est remarquable en comparaison avec la zone d'Admine qui est la plus saine et qui présente peu (ou même pas) de saponines. Par conséquent, pour faire face aux conditions défavorables, la plante augmente aussi la production des saponines.

La richesse des feuilles en tanins catéchiques va en conformité avec les conclusions de Jado et *al.* (1979), selon lesquelles les feuilles sont le siège de la biomasse de ces substances secondaires.

Mais en ce qui concerne les quinones libres et les composés cyanogénétiques, ils sont absents chez les feuilles d'arganier des trois stations.

stations.

Conclusion

Le screening phytochimique qui a été effectué, pour la première fois chez les arbres de Guelmim, sur les feuilles d'arganier nous a permis de définir les différents constituants en métabolites secondaires des feuilles d'arganier, notons que les flavonoïdes sont présents en grande quantité. L'étude comparative entre les trois régions : Guelmim, Admine et Agadir a montré que la station de Guelmim présente les plus fortes teneurs en flavonoïdes, dans ce sens qu'on peut dire que les plantes réagissent aux agressions en augmentant leur taux de polyphénols. Ces derniers peuvent être soumis à d'importantes fluctuations face aux variations de l'environnement.

References:

- Al-Yahya MA., 1986. Phytochemical studies of the plants used in traditional medicine of Saudi Arabia. *Fitoterapia*. 57 (3), 179-182.
 Boudy P., 1950. Monographie et traitement des essences forestières. Economie forestière Nord-Africaine. Fasc. II, 335p.
 Dai GH., Andary C., Mondolot-Cosson. & Boubals D., 1995. Histochemical responses of leaves of *in vitro* plantlets of *Vitis* spp, to infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*. 85, 149-154.
 Dixon RA. & Paiva NL., 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell*. 7, 1085-1097.
 Giordono G., 1980. Llegnami, del mondo: Ed. 2: 596. II. Cerilo.
- 5. Giordono G., 1980. I legnami del mondo: Ed 2: 596. Il Cerilo Editrice Roma.

- Editrice Roma.
 Hariri EB., Salle G. & Andary C., 1991. In volvement of flavonoids in the resistance of two poplar cultivars to mistletoe (*Viscum album* L.). *Protoplasma*. 162, 20-26.
 Jado AI., Hassan MM., Ezmirly ST. & Muhtadi FJ., 1979. The chemical investigation of *Peganum harmala* L. growing in Saudia Arabia. *Pharmazie*. 34 (2), 108-109.
 Jay M., Gonnet JF., Wellenweber E. & Voirin B., 1975. Sur l'analyse qualitatives des aglycones flavoniques dans une optique chimiotaxonomique. *Phytochemistry*. 14, 1605-1612.
 Jordan BR., James E., Strid A. & Anthony G., 1994. The effect of ultraviolet-B radiation on gene expression and pigment composition in etiolated and green pea leaf tissue: UV-Bioduced changes are gene-specific and dependent upon the developmental stage. *Plat, Cell and environment*. 17, 45-54. *and environment.* 17, 45-54.
- 10. Olsson LC., Viet M., Weissenböck G., & Borman F., 1998. Differiential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus. Phytochemistry*. 46, 1021-1028.
 11. Randerath K., 1971. Chromatographie sur couches minces, Paris: Édition Gauthier-Villars, 337-339.
- Ribéreau-Gayon P. & Peynaud E., 1968. Les composés phénoliques des végétaux, Ed. Dunod, Paris VI, 354p.
 Rizk AM., 1982. Constituents of plants growing in Qatar. *Fitoterapia*. 52 (2), 35-42.
 Sauvage et Vindt., 1952. Flore du Maroc, tome I 83-85p.

- 15. Strid A., Chow WS. & Anderson JM., 1990. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum. Biochimica et Biophysica Acta.* 1020, 260-268.
- 16. Tahrouch S., 2000. Etude des composés phénoliques et des substances volatiles de *Argania spinosa* (Sapotaceae). Adaptation de l'arganier à son environnement. Thèse de doctorat d'état. Université Ibn Zohr. 124 p.