



Geoclimatic influences on flavonoids contents of the leaves of the argan tree Influences géoclimatiques sur la composition en flavonoïdes des feuilles de l'arganier *Argania spinosa*

F. Fahmi, S. Tahrouch, A. Hatimi

Laboratoire de Biotechnologies Végétales. Université Ibn Zohr, Faculté des sciences Agadir, BP 8106 cité Dakhla,
Agadir 80000, Maroc.

Received 8 Feb 2013, Revised 20 May 2013, Accepted 20 May 2013

*Corresponding authors E mail: fahmifadma@yahoo.fr - tahrouch@hotmail.com Tel : 0670888298

Abstract

In this study, we made a comparison between flavonoids of the argan tree leaves of Oued Cherrat, located in the north of Morocco (Rabat region) and those of Massa, located in the south of Morocco (Agadir region). Quantification by spectrophotometry of all flavonoids of the leaves in two different methods showed a significant difference between the argan trees of the two studied regions regardless of the harvest period, with higher contents in leaf's extract of the argan tree of Oued Cherrat. However, the qualitative analysis by HPLC showed no difference between the leaf's extracts of Oued Cherrat and those of Massa. The HPLC also showed the existence of the same flavonoids in the extracts of the leaves of both Oued Cherrat and Massa.

Keywords: Argan tree, HPLC, Spectrophotometry, Flavonoids.

Résumé

La présente étude fait état d'une comparaison des flavonoïdes des feuilles d'arganier de Oued Cherrat, situé au nord du Maroc (région de Rabat) et ceux des feuilles de Massa, situé au sud marocain (région d'Agadir). La quantification par spectrophotométrie des flavonoïdes totaux des feuilles par deux méthodes différentes montre qu'il y a une différence significative entre les arganiers des deux régions étudiées quelque soit la période de récolte. Les teneurs sont plus importantes dans l'extrait des feuilles de l'arganier de Oued Cherrat. En revanche l'analyse qualitative par HPLC ne montre aucune différence entre les extraits des feuilles de Oued Cherrat et ceux de Massa. Elle montre, par conséquent, l'existence des mêmes hétérosides flavoniques dans les extraits des feuilles d'arganier des deux régions étudiées.

Mots clés : Arganier, HPLC, Dosage spectrophotométrique, Flavonoïdes.

1. Introduction

Les forêts d'arganier, ou *Argania spinosa* (L.) Skeels, essence endémique du Maroc, ne s'étendent actuellement que dans les zones arides et semi-arides du Sud Ouest marocain. Au tertiaire, époque de son apparition, l'arganier se serait répandu sur une grande partie du Maroc (1, 2). Puis au quaternaire, il aurait été refoulé au Sud Ouest par l'invasion glaciaire. Ceci expliquerait probablement la présence de quelques peuplements vers Rabat (Oued Grou et Oued Cherrat) (3, 4) et au Nord, près de la côte méditerranéenne dans les Beni-Snassen (5, 6). Des études botaniques, morphologiques et physiologiques de ces peuplements ont établi qu'il s'agit de la même espèce (7), néanmoins une comparaison phytochimique, en se basant essentiellement sur les flavonoïdes reste intéressante. En effet, ces métabolites secondaires sont utilisées pour la chimiotaxinomie des principaux groupes végétaux (8). Les flavonoïdes, largement présents dans les différentes parties de la plante, appartiennent au vaste groupe des polyphénols qui sont biologiquement et chimiquement très diversifiés, ce qui leur confère une position très importante comme marqueur taxinomique

au sein de l'espèce, du genre et de la famille (9, 10). Cette systématique biochimique des plantes peut ainsi résoudre les problèmes de la classification de certaines familles, et dans ce sens, les flavonoïdes, en particulier, pourraient probablement être plus intéressants à un niveau inférieur de la classification (10).

Les flavonoïdes interviennent également dans un grand nombre de processus physiologiques chez les plantes, se sont des biomarqueurs du stress assurant ainsi, la survie des plantes dans différentes conditions environnementales (8, 11, 12). Plusieurs études ont déjà démontré le rôle indéniable que jouent les flavonoïdes dans ce sens (résistance aux UV, tolérance contre les microorganismes...) (13, 14) et notamment chez l'arganier (15), dont la teneur en ces composés est notable et peut être affectée par les conditions climatiques et d'autres facteurs environnementaux. Notre travail s'inscrit dans le prolongement de ces travaux et vient confirmer l'importance qu'ont les flavonoïdes dans la réponse aux divers stress chez les plantes. Dans ce contexte, la comparaison phytochimique des peuplements d'arganier de Oued Cherrat situé à 30 Km au sud de Rabat et ceux de Massa situé à 55 Km au sud d'Agadir pourrait apporter une explication quant à l'adaptation de l'arganier à ces différents milieux.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de feuilles d'arganier prélevées sur douze arbres différents, récoltées au niveau de deux stations : Oued Cherrat et Massa et sur deux périodes différentes ; une en Mars et l'autre en Juillet. Les principales caractéristiques de chaque site sont représentées dans le tableau 1.

Les échantillons récoltés sont séchés à l'étuve à 40°C pendant 24h et réduits, séparément, en poudre fine.

2.2. Extraction

Pour le dosage des flavonoïdes totaux par spectrophotométrie, 50 mg de poudre de feuilles mis dans un tube Eppendorf, sont homogénéisés dans 1 ml de Méthanol-eau (80 : 20, v/v). Le mélange subit une sonication pendant 15 min puis une centrifugation de 30 min à 3500g. Ce même extrait dilué quatre fois et passé à travers des filtres millipores, est ensuite analysé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

2.3. Dosage des flavonoïdes totaux

Le dosage est effectué au spectrophotomètre UV visible type HP Vectra 8453 à barrette de diodes.

Deux méthodes de dosage sont utilisées :

Gamme d'étalonnage : réalisée à partir de 0.05 mg/ml de quercitrine (flavonol, largement représenté dans les feuilles de l'arganier (15)). La lecture de la densité optique (DO) est effectuée entre 220 et 420 nm.

Méthode d'Andary (16) : chaque extrait est additionné du réactif de NEU (17) à raison de 100 µl de NEU (2 amino-éthyl diphényl borate à 1% dans le méthanol) pour 2 ml d'extrait. La lecture de la DO se fait à une longueur d'onde de 404 nm.

La teneur des flavonoïdes est calculée selon la formule suivante (18) :

$$T \text{ flavonoïdes} = A_{\text{ext}} \times 0.05 \times 100 / A_{\text{q}} \times C_{\text{ext}}$$

(A_{ext} : Absorption de l'extrait ; A_{q} : Absorption de la quercitrine (0.05 mg/ml) ; C_{ext} : Concentration de l'extrait en mg/ml)

Les résultats sont donnés en mg d'équivalents quercitrine par gramme de matière sèche.

2.4. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Cette technique est utilisée pour l'analyse qualitative des différentes molécules flavoniques des extraits des douze échantillons d'arganier prélevés dans chaque région ; Oued Cherrat et Massa (une seule injection par extrait).

Matériel utilisé :

Appareil Shimadzu muni de 2 pompes (Shimadzu LC-6A), d'un contrôleur (Shimadzu SCL-6B), d'une unité informatique (Shimadzu CR4A Basic Chromatopac) et de deux détecteurs :

UV-VIS (Shimadzu SPD-6AV),

Barrette de diodes : Waters 996 pourvu d'un logiciel Millennium³² pour le traitement des données.

Phase stationnaire : elle est constituée par une colonne de Nucleosil (Waters) de type silice greffée à phase inverse Symmetry® C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm).

Phase mobile : le système de solvant adapté à la séparation des flavonoïdes des feuilles de l'arganier est :

A : méthanol-acétonitrile (8 : 2) ; B : eau bidistillée
L'analyse a été effectuée en mode isocratique de 40% de A et 60% de B.
Le débit est fixé à 1ml/min
La détection se fait à 350 nm.

2.5. Analyses statistiques

Les résultats du dosage des flavonoïdes des feuilles de l'arganier (douze répétitions) sont traités par deux logiciels statistiques : STATISTICA et MINITAB. Le test de Student ou de Welch permettra de faire la différence entre les deux stations étudiées. Le test de Welch est utilisé quand la valeur de p (Variance obtenue par le test de Student) est significative.

3. Résultats et discussion

3.1. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes totaux au spectrophotomètre par la méthode d'Andary et Hariri (16, 18) et celle de la gamme étalon a montré que la différence entre les teneurs des extraits des feuilles de Oued Cherrat et ceux de Massa est hautement significative (au seuil de $P=0.001$). En effet, l'extrait des feuilles de l'arganier de Oued Cherrat présente des teneurs nettement plus élevées que celles de Massa et ce, quelque soit la période de récolte. Nous remarquons aussi que quelque soit la localité étudiée, les teneurs des extraits des feuilles d'arganier sont plus élevées pendant la période de Juillet (Tab. 2).

3.2. Analyse des profils chromatographiques

L'observation des profils chromatographiques des extraits des feuilles de Oued Cherrat (fig.1) et de Massa (fig.2) par HPLC, montre que les feuilles de l'arganier de ces deux stations présentent quatre molécules flavoniques majoritaires (15, 19). La première molécule dont le temps de rétention est de 3.2 min est la myricétine 3-O-galactoside, la deuxième molécule (3.88 ou 3.93 min) correspond à la myricitrine, le troisième métabolite dont le temps de rétention est de 5 min est l'hypéroside et la dernière molécule (6 min) est la quercitrine (Tab.3). D'autres composés minoritaires sont détectés par HPLC, ce sont des dérivés de la myricétine et de la quercétine (15).

Nous constatons que les feuilles de l'arganier des deux stations étudiées ont les mêmes profils flavoniques. Cela montre qu'il n'y a pas de différence qualitative entre les arbres de ces deux régions.

L'analyse semi-quantitative des pics chromatographiques obtenus par l'HPLC montre également que la quantité des flavonoïdes est plus importante dans les extraits des feuilles de la région de Oued Cherrat que dans les extraits de la région de Massa.

3.3. Discussion

L'étude par HPLC montre l'existence de quatre flavonoïdes majoritaires dans les extraits des feuilles de l'arganier des deux stations étudiées (Massa et Oued Cherrat) quelque soit la période de récolte. En effet, dans le cadre des études menées par notre laboratoire, depuis une quinzaine d'années, sur l'arganier de différentes localités d'Agadir, des travaux antérieurs ont également mis en évidence l'existence de ces mêmes flavonosides dans trois stations de la région de Souss (15). Notre contribution vient donc compléter les travaux déjà réalisés et démontrer l'existence, dans les extraits des feuilles de la région de Rabat (Oued Cherrat), des mêmes flavonoïdes déjà isolés et identifiés dans les feuilles de l'arganier de la région d'Agadir (19). Ces molécules qui sont la myricitrine, la quercitrine, l'hypéroside et la myricétine 3-O-galactoside (tab.3) constitueraient des marqueurs biochimiques de l'arganier (15, 20).

Le dosage spectrophotométrique des flavonoïdes des extraits des feuilles de l'arganier montre que la station de Oued Cherrat présente les plus fortes teneurs en flavonoïdes par rapport à la station de Massa, avec néanmoins une différence significative (au seuil de $P=0.001$) entre l'arganier de la région de Oued Cherrat et celui de la région de Massa, quelque soit la période de récolte. Dans la même station, la teneur en flavonoïdes des feuilles d'arganier connaît une fluctuation d'une période à une autre, cette teneur est plus élevée pendant la période de Juillet. La différence entre les périodes est très hautement significative à Oued Cherrat (tab.2). L'élévation de la teneur en métabolites secondaires pourrait être due aux changements géoclimatiques non habituelles pour cette essence (21). En effet, ces biomolécules jouent un rôle important dans la protection des

plantes vis-à-vis des différentes agressions de l'environnement (22, 23) et peuvent être de ce fait soumises à d'importantes fluctuations.

Par conséquent, l'arganier adapté aux conditions climatiques aride et semi-aride, pourrait augmenter son pool phénolique pour s'adapter au climat tempéré de la région de Oued Cherrat. Les plantes répondent aux stimuli environnementaux en synthétisant les composés phénoliques qui peuvent les protéger contre différentes agressions (11, 12, 24, 25).

A la lumière des résultats obtenus nous remarquons qu'il y a seulement une différence quantitative quant aux flavonoïdes des feuilles de l'arganier de Oued Cherrat et de Massa. L'arganier de ces deux stations présente les mêmes molécules flavoniques (19) avec une teneur plus forte dans la station de Oued Cherrat. Ceci pourrait être du aux conditions environnementales, puisque la pluviométrie de cette région est relativement plus importante que celle de la région de Massa.

Tableau 1 : Principales caractéristiques de Oued Cherrat et de Massa.

Station	Position	Situation géographique	Altitude (m)	Précipitation annuelle (mm)	Climat
Oued Cherrat	N33°49'48''W0 07°07'12''	Côte atlantique	60	430	Tempéré
Massa	N30°04'48''W0 09°39'36''	Côte atlantique	150	250	Aride

Tableau 2: Dosage des flavonoïdes totaux des feuilles d'arganier par deux méthodes différentes.

Périodes	Stations	Taux de flavonoïdes en mg/g de matière sèche	
		Méthode d'Andary, 1990 et Hariri, 1991	Méthode de la gamme-étalon
Mars	Oued Cherrat	6.77 ± 1.27 ^a	6.93 ± 1.29 ^a
	Massa	4.33 ± 1.06 ^b	4.40 ± 1.11 ^b
Juillet	Oued Cherrat	17.41 ± 5.33 ^c	17.92 ± 5.62 ^c
	Massa	6.00 ± 2.30 ^d	6.17 ± 2.37 ^d

Les moyennes dans chaque colonne suivies par une lettre différente sont significativement différentes ($p < 0,05$).

Tableau 3 : Temps de rétention des quatre flavonoïdes majoritaires des feuilles d'arganier (19).

Molécules	Myricétine 3-O-galactoside (1)	Myricitrine (2)	Hypéroside (3)	Quercitrine (4)
T _R (min)	3.4	3.9	5	6

T_R : Temps de rétention

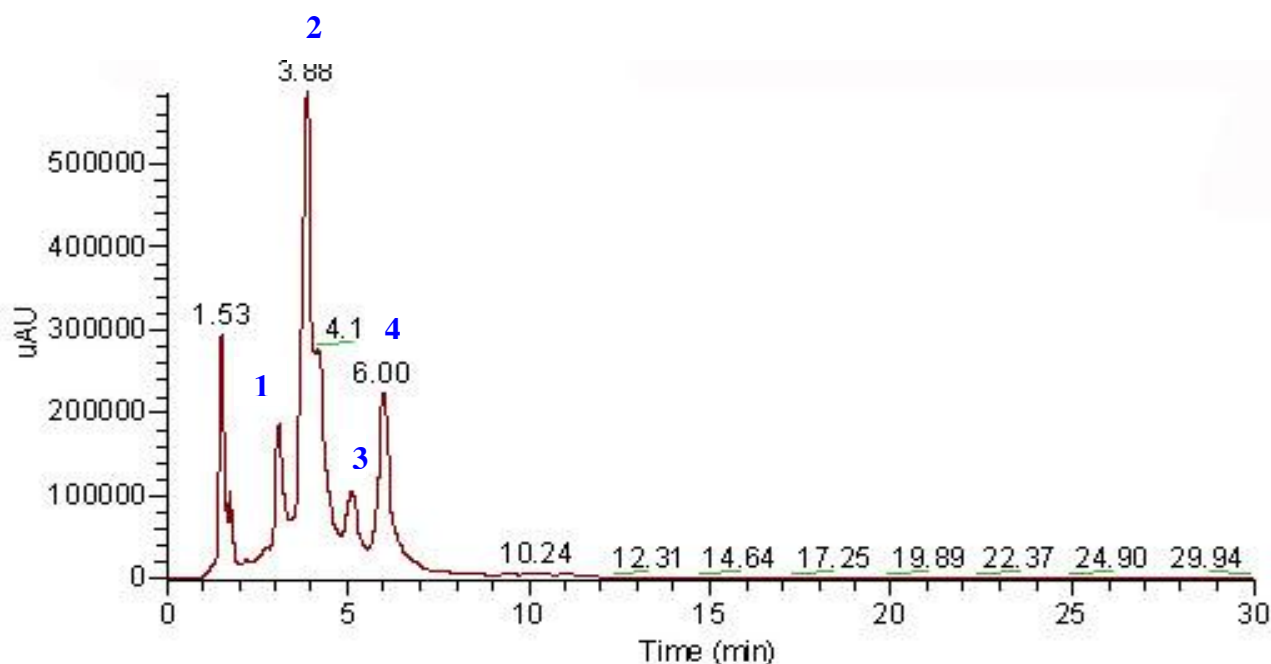


Figure 1 : HPLC de l'extrait méthanolique des feuilles de *Argania spinosa* de la région de Oued Cherrat.

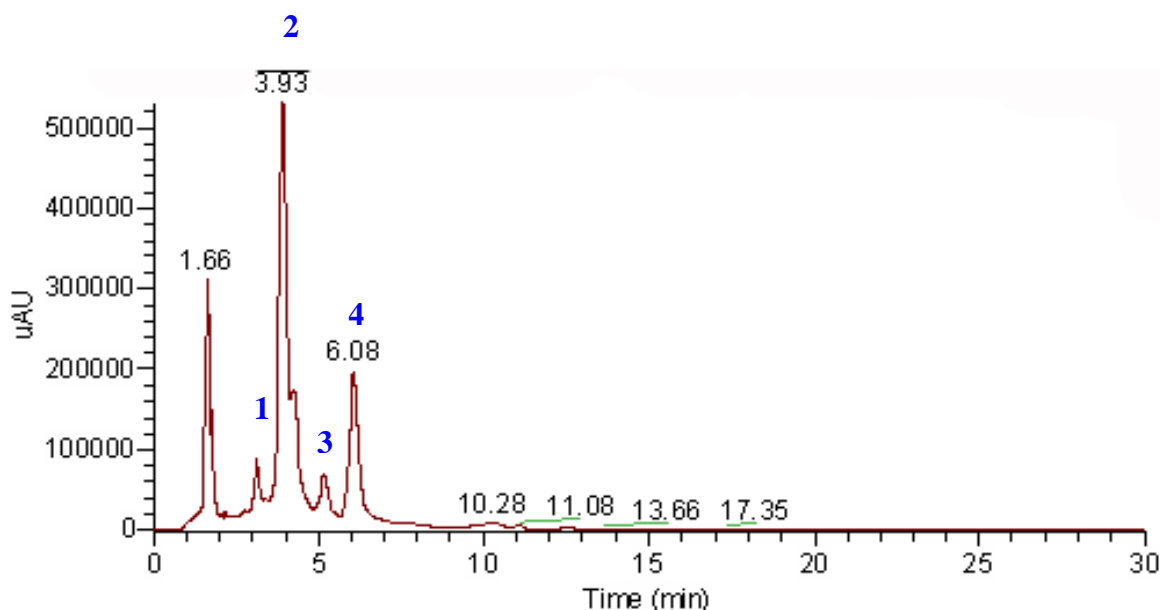


Figure 2 : HPLC de l'extrait méthanolique des feuilles de *Argania spinosa* de la région de Massa.

Conclusion

Les extraits des feuilles de l'arganier des deux stations contiennent les mêmes molécules flavoniques dont quatre sont majoritaires (la myricétine 3-O-galactoside, l'hypéroside, la quercitrine et la myricitrine), le profil chromatographique montre aussi des pics minoritaires détectés par HPLC qui sont des dérivés de la myricétine et de la quercétine. Ces extraits présentent une teneur en flavonoïdes plus importante dans les feuilles de l'arganier de Oued Cherrat, quelque soit la période de récolte. Cette teneur est nettement élevée en Juillet.

Aucune différence notable n'est observée entre les profils chromatographiques des extraits des feuilles de Oued Cherrat et ceux de Massa. En revanche, le dosage spectrophotométrique des flavonoïdes totaux montre une différence nettement significative entre les deux localités. L'arganier s'est adapté aux zones aride et semi-

aride, alors qu'il n'est pas dans son aire de répartition dans la région de Oued Cherrat, puisque la pluviométrie de cette localité est relativement élevée. Donc, pour s'adapter au climat tempéré de cette région, l'arganier réagirait probablement aux changements environnementaux en synthétisant et en accumulant des composés phénoliques.

Références

1. Boukhobza, M., Pichon-Prum, N., *Phytotherapy* 27 (1988) 21-6.
2. Radi, N., Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de Nantes, faculté de pharmacie. (2003) 55p.
3. Emberger, L., *Bull. Soc. Sci. Nat. Phys. Maroc* 4 (1924) 151-153.
4. Emberger, L., *Bull. Soc. Bot. Fr.* 72 (1925) 770-774.
5. Maire, R., *Bull. Soc. Hist. Nat. Af. Nord* 16 (1925) 150.
6. Maire, R., *Bot. Not.* (1939) 447-84.
7. Díaz-Barradas, M.C., Zunzunegui, M., Ain-Lhout, F., Jáuregui, J., Boutaleb, S., Álvarez-Cansino, L., Esquivias, M.P., *Plant and soil* 337 (2010) 217-31.
8. Nouri, M., Dehshiri, M.M., Mehrdost, N., *International Journal of Botany* 8 (2012) 165-169.
9. Harborne, J.B. Ed. Chapman & Hall, New York, USA. ISBN-13 : 9780412480706 (1994) pages: 676.
10. Hussain, J., Bukhar, N., Bano, N., Hussain, H., Naeem, A., Green, I.R., *Records of Natural Products* 4 (2010) 242-249.
11. Bénard, C., Thèse de Doctorat. INRA. Université de Nancy (2009) 260 pp.
12. Muanda, F.N., Thèse de Doctorat. Université Paul Verlaine Metz (2010) 238 pp.
13. Hadi, M., Thèse de Doctorat. Université Louis Pasteur (2004).
14. Diabate, S., Konan, K.E., Allou, D., Coulibaly, O.A., De Franquville, H., *Sciences & Nature* 6 (2009) 117-123.
15. Tahrouch, S., Thèse de Doctorat d'Etat. Université Ibn Zohr (2000).
16. Andary, C., Documentation chimique et pharmaceutique pour l'AMM du MERALOPS Comprimés. Laboratoire Allergan-Dulcis, Monaco, France (1990).
17. Neu, R., *Naturwissenschaften* 43 (1956) 82.
18. Hariri, E.B., Salle, G., Andary, C., *Protoplasma* 162 (1991) 20-26.
19. Tahrouch, S., Andary, C., Rapior, S., Mondolot, L., Gargadennec, A., Fruchier, A., *Acta botanica gallica* 147 (2000) 225-232.
20. Tahrouch, S., Hatimi, A., Rapior, S., Mondolot, L., Gargadennec, A., Andary, C., *The Online Journal of Science and Technology* 1 (2011) 17-23.
21. Jaakola, L., Hohotola, A., *Plant, Cell and Environment* 33 (2010) 1239-1247.
22. Harborne, J.B., Presented at The biochemistry of plant phenolics. Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe (1985) 393-408.
23. Dai, G., Andary, C., Mondolot-Cosson, L., Boubals, D., *Phytopathology* 85 (1995) 149-154.
24. Naczki, M., Shahidi, F., *Journal of Chromatography* 1054 (2004) 95-111.
25. Misirli, A., Küden, A., Demir, G., Gülcan, R., *Cahiers Options Méditerranéennes* 56 (2000) 71-87.

(2013) ; <http://www.jmaterenvironsci.com>