



Study of the antibacterial effect of Argan oil from Bechar region of Algeria on hospital resistant strains.

N. Lotfi^{1,2}, N. Chahboun^{1,2}, H. El Hartiti¹, Z. Kabouche³,
M. El M'Rabet⁴, M. Berrabeh⁵, R. Touzani⁶, M. Ouhssine¹, H. Oudda²

¹ Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Qualité (LABEQ), Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Ibn Tofail, BP 133, 14000 Kenitra, Morocco.

² Laboratoire de procédés de séparation, Département de chimie, faculté des sciences, Université Ibn Tofail 133, 14000 Kenitra, Morocco.

³ Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), Département de chimie, Université de Constantine 1, Campus Chaabet-Ersas, 25000 Constantine, Algeria.

⁴ Département DSFA, Unité de chimie, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. Rabat, Morocco.

⁵ Laboratoire du Chimie du Solide Minéral et Analytique, Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université Mohammed 1er, Oujda, Morocco.

⁶ LCAE-URAC18, COSTE, Faculté des Sciences, Université Mohamed 1^{er} – B.P. 524, 60000 Oujda, Morocco.

Received 28 Feb 2015, Revised 05 Aug 2015, Accepted 05 Aug 2015

* Corresponding author. E-mail address: ouddahassan@gmail.com

Abstract

The yield, chemical composition and the antibacterial properties of the oil extracted from the kernels of the argan tree region of Bechar (Algeria) were studied. The average composition of the oil of kernels *Argania spinosa* is 39% relative to the dry matter. Several compounds were identified by GC / MS including sterols, tri- terpenes, tocopherols (vitamin E or F), oleic and linoleic acid. Argan oil has shown a positive effect on resistant strains studied in particular *staphylococcus aureus* and *staphylococcus white*. Bacteria resistant strains are sensitive to the presence synergistic effect of peppermint oil, with remarkable growth inhibition diameter for *white staphylococcus*.

Keywords: Chemical components of the *Argania spinosa* oil, Method GC / MS, resistant strains, antibacterial properties, synergistic effect, peppermint oil.

Etude de l'effet antibactérien de l'huile d'Argan de la région de Béchar de l'Algérie vis-à-vis des Souches résistantes hospitalières.

Résumé

Le rendement, la composition chimique et les propriétés antibactériennes de l'huile extraite des amandons d'arganier de la région de Bechar (Algérie) ont été étudiés. La teneur moyenne en huile des amandons d'*Argania spinosa* est de 39% par rapport à la matière sèche, plusieurs composés ont été identifiés par CPG/SM parmi lesquels des stérols, des tri-terpènes, des tocophérols (vitamine F ou E), de l'acide oléique et linoléique. L'huile d'argan a manifesté un effet positif sur les souches résistantes hospitalières étudiées en particulier *staphylococcus blanche* et *staphylococcus aureus*. Les bactéries des souches résistantes sont sensibles à l'effet de synergie de l'huile d'argan avec l'huile de menthe poivrée, avec une croissance remarquable au diamètre d'inhibition pour *staphylococcus blanche*.

Mots-clés : Composés chimiques de l'huile *Argania spinosa*, méthode CPG /SM, souches résistantes hospitalières, propriétés antibactériennes, effet synergique, huile de menthe poivrée.

1. Introduction

L'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels), également appelé argan et « arbre de fer » est une essence ligneuse appartenant à la famille des sapotacées. Elle est endémique de l'Algérie (région de Tindouf) et du Maroc (région du sud-ouest, en particulier la plaine du Souss). Au sud de ces deux pays maghrébins, l'arganier constitue, le dernier rempart contre la désertification. Arbre forestier à rôle écologique, luttant contre l'érosion des sols et fourrager, alimentant les troupeaux de caprins. Il est également fruitier. C'est une source primordiale pour les populations rurales des espaces semi-arides de l'Algérie. On extrait de son fruit, notamment de son amandon de l'huile d'argan, réputée mondialement pour ses qualités diététiques et cosmétiques. Malheureusement, la vulnérabilité de l'écosystème actuel et la multitude des pressions qui s'y exercent et qui dépassent largement ses possibilités productives, contraignent la pérennité de l'arganerie en déclin continue. Cette menace d'extinction est une préoccupation majeure aussi bien pour la population locale que pour les scientifiques.

On assiste en effet depuis plusieurs années à une diminution du couvert arboré, à la fois en surface occupée et en densité d'arbres. Les efforts doivent être multipliés pour reconstituer artificiellement et sauvegarder ce patrimoine national et mondial à la fois d'*Argania spinosa*. En Algérie, le développement de l'arganier dans la région de Tindouf, par des boisements et de la création d'une pépinière pour la production de plants d'arganier, font partie des mesures retenues au titre d'une ambitieuse opération de valorisation et de préservation de cet arbre saharien. Des études ont été réalisées sur le pulpe d'arganier [1-2], d'autres études dans le domaine de corrosion ont montré que l'huile des amandons de Souss au Maroc ont un effet inhibiteur en milieu acide [3-5].

La menthe poivrée est connue par son effet antibactérien sur plusieurs souches résistantes d'après des études antérieures qui ont jugé utiles d'utiliser la menthe poivrée dans l'effet de synergie [6]. *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus*, *staphylococcus blanche*, *enterobacter*, *pseudomonas aeruginosa* et *acinetobacter baumannii* ont été étudiées comme des souches résistantes hospitalières pour l'étude de l'effet antimicrobien [7-9].

Notre objectif dans ce travail est l'évaluation de l'effet antibactérienne des amandons d'arganier sur les souches résistantes hospitalières (*escherichia coli*, *staphylococcus aureus*, *staphylococcus blanche*, *enterobacter*, *pseudomonas aeruginosa*, *acinetobacter baumannii*) ainsi qu'un effet de synergie d'amandons d'arganier avec la menthe poivrée.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel végétal

L'*Argania spinosa* L., plante arbustive endémique de l'Algérie et du Maroc, appartient à la famille des Sapotacées qui comprend environ 10 genres et 600 espèces [10]. Cette essence est connue sous plusieurs noms vernaculaires dont l'arganier, l'argan et le bois de fer. Sa classification botanique présente comme suit:

Tableau 1: Classification botanique de l'arganier *Spinosa* de Bachar [10].

Régne	Végétale
Embranchement	Phanérogames
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Ebénales
Famille	Sapotacées
Genre	<i>Argania</i>
Espèce	<i>Argania spinosa</i> L.Skeels

2.2. Répartition géographique

L'Arganier, *Argania spinosa* (L.) Skeels est une angiosperme sapotacée endémique d'Afrique du Nord que l'on rencontre surtout dans le Sud-Ouest Algérien dans la région de Tindouf et dans le sud atlantique Marocain (région d'Agadir) où il couvre environ 800.000 ha[10], signalant qu'au Maroc, la plus grande masse des peuplements à arganier des différentes densités s'étend sur un secteur littoral et para littoral entre l'Oued Tensift au sud de Safi et la plaine du Souss dont la plus grande partie est colonisée par l'espèce en question. Le même auteur signale également qu'au niveau des reliefs

montagneux, l'arganier développe des peuplements sylvatiques essentiellement vers méridional du haut Atlas Occidental et sur les expositions Nord de l'Anti-Atlas jusqu'au massif du djebel Siroua à l'Est.

En Algérie, son aire de répartition géographique couvre un territoire relativement important dans le Nord-Ouest de la wilaya de Tindouf où cette espèce constitue la deuxième essence forestière après l'*Acacia raddiana* [11] Algérienne, entre Djebel Ouarkiz et la hamada de Tindouf [12]. L'*Argania spinosa* est localisée essentiellement sur les lits de certains Oueds, notamment : Oued El-ma, Oued Elghahouane, Oued Bouyadhine, Oued El-khebi, Oued Merkala et Oued Targant. Ainsi, elle est pourvue d'un entrelace éparse de ruisseaux, coulant vers les petites dépressions entre les gorges Hamadienne du Drâa et les falaises de K'reb El-hamada, et la dépression du Nord de Tindouf.

L'*Argania spinosa* est un arbre fruitier-forestier dont la taille varie selon les conditions écologiques du milieu entre 8 et 10 m de hauteur. La cime est très grande et étalée, dense et à contours arrondis en générale. Le tronc de cet arbre de couleur brunâtre à l'âge juvénile et grisâtre à l'âge adulte, est très vigoureux et court [13]. Il est constitué assez souvent par plusieurs tiges entrelacées provenant de la soudure de rejets très voisins ou de tiges issues d'un même noyau. L'écorce du fut et des grosses branches est rugueuse et présente un aspect du type « peau de serpent ». Les ramifications sont denses et les extrémités des rameaux sont souvent épineuses [14]. Le fruit de l'arganier renferme une graine composée, appelée vulgairement noyau. Ce dernier est très dur et renferme une ou plusieurs amandes (Figure1).



Figure 1: La graine de l'arganier.

A l'intérieur de la pulpe charnue se trouve un noyau très dur avec en général 2 à 4 cavités contenant des amandes, encore appelées localement « amandons » (Les graines, qui par ailleurs se soudent entre elles, possèdent un tégument qui s'indure très fortement et de façon totalement inhabituelle, simulant un noyau [15]. La récolte des échantillons d'argan utilisés dans cette étude a été effectuée dans la région de béchar (Algérie) en mois de Juillet, cette région est connue par une production importante d'argan.

2.3. Extraction d'huile d'amandon d'arganier spinosa

Un procédé classique d'extraction par Soxhlet a été choisi pour extraire des quantités importantes de poudre sèche obtenues par broyage des graines de la plante d'argan. On introduit une quantité de poudre, environ 150 g dans une cartouche filtrante, et on utilise 75% du volume du ballon par l'éther de pétrole comme solvant d'extraction.

L'extraction est lancée en continue jusqu'à récupération totale des composés extractibles. Le solvant est éliminé du filtrat par évaporateur rotatif de type «Buchi Heating Bath B-490.

2.4. Microorganismes étudiés

Dans cette étude, les microorganismes utilisés sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus blanche*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, les souches hospitalières choisies au cours de cette étude sont à l'origine de plusieurs infections nosocomiales (urinaire, intestinale, Respiratoire, etc...) [16,17]. Ces germes présentent généralement une résistance aux antibiotiques elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance.

2.5. Procédure microbiologique

2.5.1. Méthode de diffusion sur les disques stériles

Nous avonsensemencé par inondation une gélose *Muller-Hinton* avec une souche bactérienne pathogène en bouillon nutritif de titre connu. Puis nous avons organisé les disques stériles sur gélose. Ces disques sont formés par des papiers filtre stérilisés de 6 mm de diamètre. Ces disques seront imbibés par des solutions d'huile essentielle. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, des zones d'inhibition apparaissent autour de ces disques stériles. Les essais sont répétés trois fois.

2.5.2. Méthode de dilution en série

Une mise en émulsion de l'huile essentielle a été préalablement réalisée grâce à une solution d'agar agar à 0,2 % [18][19] ; étant donné que cette huile n'est pas miscible à l'eau et donc aux milieux de culture. Elle permet d'obtenir, dans le milieu une répartition homogène des composés à l'état dispersé et augmenter au maximum le contact germe/composé. L'huile essentielle est diluée d'abord au 1/10e dans la solution agar agar. Des quantités de cette dilution ont été ajoutées aux tubes à essais contenant la gélose nutritive pour les bactéries et le PDA pour les moisissures. Ils sont ensuite stérilisés, refroidis à 45°C et versés dans des boîtes de pétri. Les concentrations finales en huiles essentielles sont 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000 et 1/5000 (V/V). Des témoins contenant le milieu de culture plus la solution d'agar agar à 0,2 %, sont également préparés. L'ensemble se fait par stries à l'aide d'une anse de platine calibrée afin de prélever le même volume d'inoculum. Ce dernier, se présente sous forme de bouillon de culture de 24 heures pour les bactéries. La température d'incubation est de 37°C pendant 24 heures. Chaque essai est répété trois fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

3. Résultats et Discussion

3.1. Rendement d'huile d'argan

Le rendement moyen en huile des amandons arganiers est de 39,5%, ce rendement est inférieur à celui cité par Charrouf (50 %) [20], nous remarquons que l'arganier étudié est relativement faible en huile d'argan. Ces différences sont due peut être à l'origine de l'espèce, le climat et le sol. Par contre les rendements sont élevés par rapport à d'autres graines oléagineuses alimentaires comme le tournesol, le soja et l'olive (de 20 à 35%) (Karleskind, 1992) [21], Ce qui permet de conclure que l'amande d'arganier est relativement riche en huile essentielle possédant une couleur brune claire, assez fluide et d'odeur agréable.

3.2. Composition chimique de l'huile d'Argan identifiée par la méthode CPG /SM

L'analyse de l'huile d'Argan a été effectuée au Laboratoire du Chimie du Solide Minéral et Analytique du Département de Chimie de la Faculté des Sciences - Université Mohammed 1er, Oujda, Maroc. Les acides gras constitutifs des triglycérides rencontrés dans l'huile d'argan sont à 80% des acides gras insaturés. L'acide oléique dont les propriétés très intéressantes pour le traitement du cancer du sein ont été récemment suggérées [22] représente près de 48% de ces acides gras. L'acide linoléique (vitamine F ou E) est présent avec 32%. Les acides gras saturés sont l'acide palmitique (environ 13%) et l'acide stéarique (environ 5%).

La spécifique de l'huile d'argan est sa forte teneur en acide linoléique (acide gras essentiel de la série oméga 6) dont les bienfaits pour la santé humaine sont bien connus [23]. La teneur en acide linoléique de l'huile d'argan peut, dans certains cas être 10 fois supérieure à celle de l'huile d'olive, une teneur proche de celle rencontrée pour l'huile d'arachide ou de sésame. Il est établi qu'une protection maximale des risques survenue des accidents cardiovasculaires est obtenue lorsque l'alimentation en lipide contient un rapport acide gras oméga 6 /acide gras oméga 3 entre 3 et 5. La forte teneur en acide gras oméga 6 de l'huile d'argan justifie donc sa consommation régulière à côté d'une source d'acide gras oméga 3 (poisson gras ou huile de lin). La fraction insaponifiable de l'huile d'argan renferme en quantité égale (20%) des stérols et des terpènes. Le schotténol et le spinastérol sont les deux stérols majoritaires et ces molécules semblent posséder des propriétés protectrices pour l'épiderme. Enfin, l'huile d'argan est riche en dérivés phénoliques [20] parmi lesquels les composés majoritaires sont les tocophérols (7,5%), composés aussi appelés vitamines E. La teneur en tocophérols de l'huile d'argan est deux fois supérieure à celle de l'huile d'olive. En particulier, l'huile d'argan contient des taux élevés en γ -tocophérol, considéré comme protecteur contre les radicaux libres. Avec les polyphénols rencontrés dans l'huile d'argan à l'état de traces, les tocophérols participent sans aucun doute à la conservation de l'huile d'argan en conservant ses propriétés anti-oxydantes.

3.3. Activité antibactérienne

Il s'agit de déterminer le diamètre d'inhibition selon la méthode de diffusion sur les disques stériles. Nous avons testé l'effet antimicrobien de l'huile d'argan, sur six souches bactériennes. En général, les huiles d'argan présente un spectre d'activité contre les micro-organismes testés. Les propriétés antibactériennes de l'huile d'argan sont attribuées à la présence des stérols, des tri-terpènes et les tocophérols ce sont des composés phénoliques.

En ce qui concerne notre étude, les résultats expérimentaux présentés dans le Tableau 2 montrent que l'huile d'argan extraite est inactive sur toutes les souches à l'exception de *Staphylococcus Aureus* et *Staphylococcus blanche*. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés en présence de l'huile de pulpe dans les travaux [1,2]. La zone d'inhibition est

observée dans le cas de *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus* blanche. Ces espèces sont donc les plus sensibles à cette huile.

Tableau 2: Activité antibactérienne d'huile d'argan. (Zones d'inhibition en mm).

Gram négatif	Zones d'inhibition en mm
- <i>Escherichia coli</i>	–
- <i>Enterobacter</i>	–
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–
- <i>Acinetobacter baumannii</i>	–
Gram positif	Zones d'inhibition en mm
- <i>Staphylococcus</i> blanche	10
- <i>Staphylococcus aureus</i>	8

Les résultats obtenus par la méthode de dilutions en série sont réunis dans le tableau 3. Cette méthode montre que l'huile d'argan présente une activité antibactérienne importante sur les souches testées, Cependant, les microorganismes étudiés n'ont pas manifesté la même sensibilité vis-à-vis de l'huile utilisée. Avec *Staphylococcus blanche*, nous avons constaté une grande sensibilité par rapport à *staphylococcus Aureus*. Il est à noter également que ces bactéries sont inhibées à partir de la concentration de 1/10.

Tableau 3: Activités antibactériennes de l'huile d'argan recherche de concentration minimale.

	1/10	1/25	1/50	1/100	1/200	1/300	1/500	T
Bactéries								
<i>Staphylococcus blanche</i>	–	–	+	+				+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	+	+	+				+++
<i>Acinetobacter B</i>								+++

T : témoin, (-) : inhibition ; (+) : croissance

3.4. Effet de synergie d'huile d'argan couplée avec l'huile de la menthe poivrée

L'effet de synergie a un effet significatif en utilisant (25% et 50%) de la menthe poivrée. On choisi de travailler cet effet sur entérobactérie *acinetobacter baumannii* qui sont résistants à l'huile d'argan seule et sur *staphylococcus aureus* et *staphylococcus* qui ont été inhibés par l'huile d'amondons d'argan,

Les résultats obtenus par l'effet de synergie pour : entérobactérie, *acinetobacter baumannii*, *staphylococcus aureus* et *staphylococcus* blanche sont regroupés dans le tableau 4. Dans cette méthode on a mélangé l'huile d'argan avec différents pourcentages de l'huile de menthe poivrée (25% et 50%). Nous constatons que toutes les bactéries sont sensibles à l'effet de synergie de deux huiles avec une croissance remarquable du diamètre d'inhibition pour *staphylococcus* blanche.

Tableau 4: Zone d'inhibition (mm) par effet de synergie d'huile d'argan avec l'huile de menthe poivrée.

Bactéries	% de menthe poivrée	Zone d'inhibitrice en mm
<i>Entérobactérie</i>	25	–
	50	8
<i>Acinetobacter baumannii</i>	25	–
	50	7
<i>Staphylococcus blanche</i>	25	8
	50	11
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	7
	50	8

Les 4 photos présentées ci-dessous montrent par les zones d'inhibition, l'effet de synergie d'huile d'argan avec l'huile de menthe poivrée (25 et 50%) en présence des quatre souches (entérobactérie (1), *staphylococcus blanche* (2), *acinetobacter* (3), *staphylococcus aureus* (4)).

Photo 1

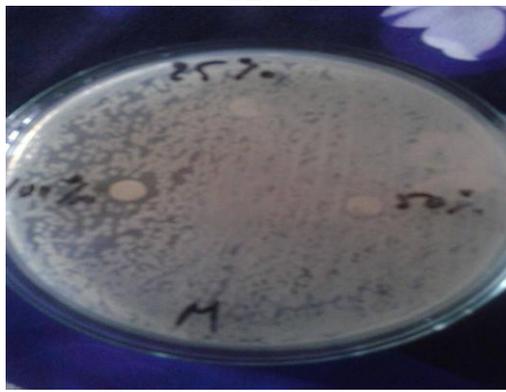


photo 2



Photo 3



photo 4

Conclusion

Le présent travail a visé l'étude antibactérienne de l'huile d'amandons arganiers cultivés dans la région de Bechar en Algérie. L'analyse d'huile d'amandons arganiers par CPG/SM montre que les composés majoritaires dans la phase organique de l'huile des amandons arganiers sont: des acides gras, des stérols, des tri-terpènes et des Tocophérols qui sont des composés phénoliques

L'action de L'huile d'amandons seule sur les bactéries gram positif et les bactéries gram négatif, a montré la présence d'une activité antibactérienne contre *staphylococcus aureus* et *staphylococcus blanche* uniquement.

L'étude de synergie de l'huile d'argan en présence de l'huile de la menthe poivrée a montré une activité antibactérienne contre *entérobactérie*, *acinetobacter baumannii*, *staphylococcus aureus* et *staphylococcus blanche*.

L'activité antimicrobienne observée est due essentiellement à la richesse de l'huile d'argan en constituants suivants : des stérols, des tri-terpènes et des Tocophérols.

Référence

1. Charrouf Z., Fkih-Tétouani S., Charrouf M., Mouchel B., Triterpènes et stérols extraits de la pulpe d'*Argania spinosa* (L.), *Sapotaceae*. Plantes médicinales et *Phytothérapie*, XXV, N° 2-3 (1991) 112.
2. Charrouf Z., Fkih-Tétouani S., Rouessac F., Occurrence of Erythrodiol in *Argania spinosa*, *Al Biruniya*, 6, (2) (1990) 135
3. Afia L., Salghi R., Zarrouk A., Zarouk H., Bazzi L., Hammouti B., Zougagh M., *Trans Indian Inst. Met.* 66 (2013) 43

4. Afia L., Salghi R., Bazzi El., Zarouk A., Hammouti B., Bouri M., Zarouk H., Bazzi L., Bammou L., *Res. Chem. Intermed.* 38 (2012) 1707
5. Afia L., Salghi R., Bammou L., Bazzi L., Bouyanzer El., *J. Saudi Chem. Soc.*, 18 (2012) 19
6. Couic-Marinier F., Lobstein A., *Actual Pharm.*, 525 (2013) 31
7. Shan B., Cai Y.Z., Brooks J.D., Corke H., *Int. J. Food Microbiol.*, 117 (2007)112
8. Percival S.L., *Microbiology of waterborne diseases*. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Boston, (2004) 480
9. Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover F.C., *Manual of Clinical Microbiology* (8th Ed.). Herdon, VA, United States of America (2003)
10. M'hirit O., L'arganier une espèce fruitière forestière à usage multiple. Station de recherches forestière, Agadir, 13-17 (1989) 31
11. Benkheira A., L'arganeraie algérienne. Bulletin d'information, conservation de la biodiversité et gestion durable des ressources naturelles, publication du projet ALG/ G35 (2009) 15
12. Baumer M., Zeraïa L., La plus continentale des stations de l'arganier en Afrique du Nord. *rev. for. fr.* 3 (1999) 446
13. Kenny L., Atlas de l'arganier, Institut agronomique et vétérinaire HassanII, (2007) 41
14. M'hirit O., Benzyane M., Benchekroune F., El yousfi S., Bendaanoun M., L'arganier une espèce fruitière forestière à usage multiples, Pierre Mardaga Edit, Belgique, (1998) 11
15. Bellefontaine R., Bouzoubâa Z., Mathez J., Le fruit de l'arganier. Est-il une drupe ou une baie. Congrès International sur l'Arganier, synthèse des communications, Agadir 15-17 Décembre (2011) 10
16. Lu C.H., Chang W.N., Chuang Y.C., Chang H.W., *J. Hosp. Infect.* 40 (1998) 27
17. Chang S.C., Hsieh W.C., Liu C., *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 36 (2000) 107
18. Remmal A., T-Elaraki A., Bouchikhi T., Rhayour K., Ettayibi M., *J. Essent. Oil Res.* 5 (1993) 179
19. Satrani B., Farah A., Fechtal M., Talbi M., Blaghen M., Chaouch A., *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 956 (2001) 241
20. Charrouf Z., Guillaume D., Phenols and polyphenols from *Argania spinosa*. *Amer. J. Food Tech.*, 2 (2007) 679
21. Karleskind A., Manuel des corps gras Edition Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, 1992
22. Menendez J. A., Vellon L., Colomer R., Lupu R., *Ann. Onc.* 16 (2005) 359
23. Zyriax, B.C, Winder, E., *Eur.J. Lipid Sci.* 102 (2000) 355

(2015); <http://www.jmaterenvironsci.com>