

THÈSE EN COTUTELLE

Entre

L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE ARDENNES, FACULTE DE PHARMACIE- FRANCE

&

L'UNIVERSITE MOHAMMED V AGDAL, FACULTE DES SCIENCES RABAT - MAROC

En vu d'obtenir le titre de

DOCTEUR

Spécialité : Phytochimie et Chimie Thérapeutique

Par

Mme Hanae EL MONFALOUTI

CONTRIBUTION A LA DETERMINATION DES PROPRIETES PHOTO- PROTECTRICES ET ANTI-OXYDANTES DES DERIVES DE L'ARGANIER: ETUDES CHIMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES

Soutenue publiquement le **09 Mars 2013** devant le jury:

- | | |
|----------------------------|--|
| Président | : Pr. Boujemaâ DAOU , Faculté des Sciences Rabat. |
| Directeurs de thèse | : Pr. Dominique GUILLAUME , Faculté de Pharmacie Reims ;
: Pr. Zoubida CHARROUF , Faculté des Sciences Rabat ; |
| Rapporteurs | : Dr. Gilles PAULY , Directeur Scientifique BASF, Nancy ;
: Pr. Yahya BENSOUDA , Faculté de Médecine et Pharmacie Rabat ; |
| Examineurs | : Pr. Annelise LOBSTEIN , Faculté de Pharmacie de Strasbourg ;
: Pr. Daniel PIOCH , Directeur de Recherche au CIRAD, Montpellier ;
: Pr. Abdelkader IL IDRISSE , Faculté des Sciences Rabat . |

A mes parents,

A mon mari Badr,

A mon frère Amine,

A la mémoire de ma tante Wafaa et mon petit cousin Soufiane.

REMERCIEMENT

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la cotutelle entre l'Université de Reims Champagne Ardennes, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Chimie thérapeutique (France) et l'Université Mohammed V Agdal, Faculté des Sciences Rabat, Laboratoire de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bio organique (Maroc).

Qu'il me soit permis de présenter ici mes remerciements à tout un petit monde de personnes qui ont rendu possible la présente thèse et qui ont contribué à son élaboration sous quelque forme que ce soit.

Faire sa thèse n'est pas toujours simple. J'ai eu la chance d'être entourée professionnellement par mes directeurs de thèse Mme Zoubida CHARROUF, Professeur à la Faculté des Sciences Rabat, et Mr Dominique GUILLAUME, Professeur à la Faculté de Pharmacie Reims.

Par leur aide, leur disponibilité et leurs conseils, ils m'ont permis d'accomplir cette thèse et de dépasser ce dont je me pensais capable. Par leur exigence et par leur rigueur, ils m'ont initiée et formée au métier de la recherche et m'en ont donné le goût, même si tout n'a pas toujours été facile. Je voudrais leur adresser ma plus profonde reconnaissance et leur dire toute mon admiration pour leurs valeurs tant humaines que professionnelles.

À la fin de ces années, au moment de la soutenance, je tiens à remercier Mr Boujemaâ DAOU, Professeur à la Faculté des Sciences Rabat, qui me fait l'honneur de juger ma thèse.

J'exprime ma gratitude à Mr Gilles PAULY, Directeur Scientifique de BASF, et Mr Yahya BENSOUHA, Professeur à la Faculté de Médecine et Pharmacie de Rabat, qui me font l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Qu'ils trouvent l'expression de ma haute considération.

Mes remerciements vont également à Mr Abdelkader IL IDRISSI, Professeur à la Faculté des Sciences Rabat, qui me fait un réel plaisir en acceptant de siéger parmi le jury de ma thèse. J'ai toujours apprécié ses qualités humaines et sa rigueur scientifique au long de mon cursus universitaire. Je le prie de bien vouloir trouver ici l'expression de mon estime et ma haute considération.

J'adresse également toute ma reconnaissance à Mme Annelise LOBSTEIN, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg et Mr Daniel PIOCH, Directeur de recherche au Centre

de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) pour m'avoir honoré et accepté d'être membres de mon jury. Qu'ils trouvent ici l'assurance de ma profonde gratitude.

J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'équipe de laboratoire de chimie thérapeutique de l'UFR de Pharmacie à Reims. J'aimerais adresser un remerciement particulier à Mr Clément DENHEZ, Maître de Conférences à UFR de Pharmacie Reims et mon co-encadrant, pour sa précieuse aide, sa sympathie, sa gentillesse et son soutien tout au cours de mon séjour à Reims.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Professeur Pascale CLIVIO, pour m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de son laboratoire et accéder à l'appareillage et aux matériels pour réaliser mes recherches dans les meilleures conditions. Mes remerciements vont également à Dr Stéphanie CASTEX pour ses nombreux conseils techniques et son aide. Je n'oublierais pas de remercier Dr Stéphanie GOURDAIN pour tous ses conseils scientifiques et techniques afin de bien maîtriser l'HPLC. Une pensée spéciale à Mr Christian PETERMANN pour avoir analysé mes échantillons par RMN tout en souriant.

Je tiens à adresser mes amitiés à Stephanie, Traminou et Jouda, je vous remercie pour tous les moments qu'on a passés ensemble, je me suis réjouie de votre amitié et jamais j'oublierai les bons moments qu'on a passés ensemble...

Merci à toutes les personnes dont j'ai eu le plaisir de faire leur connaissance à Reims !

Au cours de cette thèse, j'ai eu la chance de passer un stage au sein de laboratoire de technologie alimentaire à l'Université de Turin en Italie. A travers ce stage j'ai rencontré des personnes formidables et j'ai eu l'occasion d'apprendre de nouvelles techniques.

A cet effet, je tiens à remercier vivement Mr Giuseppe ZEPPA, Professeur à l'Université de Turin, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je lui suis également reconnaissante pour sa disponibilité, ses qualités humaines, pédagogiques et scientifiques. J'ai beaucoup appris à ces côtés et je lui adresse toute ma gratitude.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux à Dr Simona BELVISO pour sa gentillesse et son aide généreuse. Je suis reconnaissante aux Pr Manuela GIORDANI, Dr Daniela GHIRARDELLO et Dr Bernardo SCURSATONE pour m'avoir offert leur collaboration et pour toutes les méthodes analytiques qu'ils n'ont pas hésité de me faire partager.

J'ai développé une spéciale amitié lors de ce stage avec Roberta. Sa bonne humeur son sourire et sa générosité m'ont toujours touchée... on a passé d'agréables moments ensemble, ça va beaucoup me manquer.. Merci Robina!!

Je tiens à exprimer ma gratitude envers Mme Michela LENTA qui m'a aidé à bénéficier de la bourse de recherche de la Fondation Slow Food, qu'elle trouve dans ces lignes l'expression de mes vifs remerciements...

Je n'oublierai pas de remercier mes amis Italiens Rosi et Amedeo, qui m'ont accueilli chaleureusement et qui ont toujours été à mes côtés tout au long de mon séjour à Gruliasco..

A travers ce travail j'ai eu l'opportunité de faire parti de l'équipe du projet ARFEM. Je ne raterai pas cette occasion pour remercier vivement tous les porteurs du projet, je citerai bien, Pr Hassane AGNAOU, Directeur de l'Unité Mixte de Recherche en Nutrition et Alimentation, Université Ibn Tofaïl – CNESTEN, Mr Abdelfattah DEROUICHE, Professeur à la Faculté des Sciences de Ben M'Sik, Mr Yahya BENSOUA, Professeur à la Faculté de médecine et de Pharmacie, Université Mohammed V, Soussi, Rabat. Qu'ils trouvent dans ce travail l'assurance de mon profond respect et le témoignage de ma sincère reconnaissance pour leur encadrement et leur accueil chaleureux au sein de l'équipe ARFEM.

Mes sincères remerciements vont à Mr Mohammed EL MZIBRI, Docteur, Responsable de l'Unité Biomédicale, Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires, de m'avoir accueilli dans son laboratoire pour effectuer les analyses par HPLC. Je remercie Dr Khalid EL KARI, Responsable de la plateforme analytique, et Dr Asmae EL HAMDOUCHI pour leur contribution à la réalisation du dosage de la vitamine E. Merci de votre précieuse aide.

Je remercie mes collègues Dr Hicham HARHAR et Dr Said GHARBY de mon laboratoire maternel, le LCPSOB à la Faculté des sciences de Rabat, pour leurs qualités humaines et scientifiques, pour tous les moments qu'on a partagés et pour toutes les discussions et les sujets qu'on a débattus alors qu'on avait toujours des avis opposés moi et Hicham.. C'était sympa !!

Un immense merci à Nazik, une amie très spéciale, qui m'a énormément soutenu dès le début et m'a aidé dans les périodes de doute.

Je remercie également l'ensemble de mes amis pour leur présence et leur soutien pendant ma thèse. Certains ont su trouver les mots pour m'encourager dans les moments de doute et je leur en suis très reconnaissante. Je remercie en particulier mon amie Nezha El IDRISSI.

Je passe ensuite une dédicace spéciale à des personnes que j'ai eu le plaisir de côtoyer durant ces quelques années, à savoir mes amis ; Fatoum, Shama, Naima, Zhor et Habib.

Et comme on garde toujours le meilleur pour la fin,

Je tiens à remercier mes parents, tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi. Je vous rends hommage par ce travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

Je remercie mon mari bien aimé Badreddine KARTAH, sans lequel cette thèse n'aurait jamais vu le jour, pour la rigueur et la qualité de son approche scientifique, et plus encore pour l'amour qu'il m'a démontré pendant toutes ces années, me permettant de me construire comme chercheur. Tu étais toujours à mes côtés même aux moments les plus critiques. Merci pour me soutenir et m'encourager à continuer jusqu'au bout....

Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers mon petit frère Amine. Ton aide, ta générosité, ton soutien ont été pour moi une source de courage et de confiance.

Mes dernières pensées iront vers les membres de ma famille, particulièrement mes chères cousines Ahlam et Siham.

Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude à la Fondation Slow Food pour la biodiversité, l'Académie Hassan II des Sciences et Techniques et l'association Ibn Albaytar, qui m'ont accordé des bourses de recherches me permettant ainsi de mener à bien la réalisation de ce travail dans les meilleures conditions.

LISTE DES PUBLICATIONS

- H. El Monfalouti**, Z. Charrouf, A. El Hamdouchi, H. Labraimi, B. Kartah, K. El Kari, Y. Bensouda, A. Derouiche, S. Dodin, C. Denhez, D. Guillaume, H. Agnaou, Argan oil and postmenopausal Moroccan women: Impact on the vitamin E profile. *Natural Product Communications* **2013** ; 8 (1), 55-57.
- H. El Monfalouti**, Z. Charrouf, M. Giordano, D. Guillaume, B. Kartah, H. Harhar, S. Gharby, C. Denhez, G. Zeppa, Volatile Compound Formation During Argan Kernel Roasting, *Natural Product Communications* **2013** ; 8 (1), 33-36.
- H. El Monfalouti**, Z. Charrouf, S. Belviso, D. Ghirardello, B. Scursatone, D. Guillaume, C. Denhez, G. Zeppa, Analysis and antioxidant capacity of the phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa* (L.) Skeels)” *European Journal of Lipid Science and Technology* **2011**; 114, 2012, 446–452.
- H. El Monfalouti**, D. Guillaume, C. Denhez, Z. Charrouf, Therapeutic potential of argan oil: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**; 62, 1669-1675
- Saïd Gharby, Hicham Harhar, Badr Eddine Kartah, **Hanae El Monfalouti**, Clément Denhez, Miloudi Hilali, Dom Guillaume and Zoubida Charrouf, Can Fruit-form be a Marker for Argan Oil Production? *Natural Product Communications* **2013** ; 8 (1), 25-28.
- S. Gharby, H. Harhar, **H. El Monfalouti**, B. Kartah, N. Maata, D. Guillaume, Z. Charrouf. Chemical and oxidative properties of olive and argan oils sold on the Moroccan market. A comparative study. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* **2011**, 44, 1-8.
- H. Harhar, S. Gharby, B. Kartah, **H. El Monfalouti**, D. Guillaume, Z. Charrouf, Influence of Argan Kernel Roasting-time on Virgin Argan Oil Composition and Oxidative Stability. *Plant Foods for Human Nutrition* **2011**, 66, 163-168.
- S. Gharby, H. Harhar, B. Kartah, **H. El Monfalouti**, A. Haddad, Z. Charrouf. Chemical and sensory analysis of argan oil (Analyse chimique et sensorielle de l’huile d’argane). *Les Technologies des Laboratoires* **2011**, 22, 13-23.
- H. Harhar, S. Gharby, B. Kartah, **H. El Monfalouti**, D. Guillaume, Z. Charrouf Long Argan-fruit Drying Time is Detrimental for Cosmetic Argan Oil Extraction and Quality *Natural Product Communications* **2010**, 5, 1799 - 1802.
- H. Harhar, S. Gharby, M. Ghanmi, **H. El Monfalouti**, D. Guillaume, Z. Charrouf —Composition of the Essential Oil of *Argania spinosa* (Sapotaceae) Fruit Pulp” *Natural Product Communication*. **2010**; 5(6):935-6.
- M. Ghanmi, B. Satrani, A. Aafi, M.R. Isamili, H. Houti, **H. El Monfalouti**, K.H. Benchakroun, M. Aberchane, L. Harki, A. Boukir, A. Chaouch, Z. Charrouf Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des HE de l’armoise blanche de la région de Guerçif *Phytothérapie* **2010** ; 8, 295-301.

LISTE DES COMMUNICATIONS

Communications Orales

El Monfalouti, H.; Denhez, C.; Kartah, B.; Harhar, H.; Gharby, S.; Clivio, P.; Charrouf, Z.;Guillaume, D.Protective effect of argan oil against DNA damage caused by UV light. *4th Spanish-Moroccan Symposium on Organic Chemistry (SMSOC-4) and 7th Andalusian-Moroccan Meeting on Natural Products Chemistry (AMMNPC-7)*. 20-22 September **2012**. Université d'Almeria (Espagne)

El Monfalouti, H.; Denhez, C.; Kartah, B.; Harhar, H.; Gharby, S.; Clivio, P.; Charrouf, Z.;Guillaume, D.Protective effect of argan oil against DNA damage caused by UV light. *Journées Internationales « Substances Naturelles et Développement Durable »*.22 et 23 Juin **2012**. La Faculté des Sciences Rabat.

H. El Monfalouti, S. Belviso, D. Ghirardello, B. Scursatone, D.Guillaume, Z. Charrouf, G. Zeppa —dentification and quantification of phenilics compounds from the shell of argan fruit and determination of the antioxidant capacity” *Congrès International sur les plantes aromatique et médicinales*. 13-15 Avril **2011**. Cagliari (Italie)

H. El Monfalouti « L’huile d’argane : Or vert du Maroc » *Terra Madre Day*. 11 Décembre **2010**. <http://www.scattidigusto.it/2011/01/05/olio-di-argan-loro-del-marocco-e-la-birra-del-borgo/>. Rome (Italie)

H. El Monfalouti, B. Kartah , H. Harhar, D. Guillaume, Z. Charrouf, G. Zeppa —Le polyphénols de la pulpe du fruit de l’arganier « *Argania Spinosa* (Skeels) L » *1ère Journée Doctorale de la Faculté des Sciences*. 31 Décembre **2010**. Rabat

H. El Monfalouti, S. Belviso, D. Ghirardello, B. Scursatone, B. Kartah, H. Harhar, S. Gharby, D. Guillaume, Z. Charrouf, G. Zeppa —Composition phénolique et activité antioxydante de la pulpe du fruit de l’arganier « *Argania Spinosa* (Skeels) L » *Congrès International sur les plantes aromatique et médicinales*.14-16 Octobre **2010**. Fès.

Communications par affiche

Hanae EL Monfalouti, Badreddine Kartah, Hicham Harhar Saïd Gharby, Dominique Guillaume, Zoubida Charrouf, Manuela Giordano And Giuseppe Zeppa Volatils compounds from argan oil. *Journées Internationales « Substances Naturelles et Développement Durable »*. 22 et 23 Juin **2012**. Faculté des Sciences Rabat.

H. El Monfalouti, G. Zeppa, B. Kartah, H. Harhar, S. Gharby, D.Guillaume, Z. Charrouf, —Qualitative & Quantitative analysis of phenolic compounds from argan fruit, evaluation of their antioxidant capacity ” *1er congrès International sur l’arganier*. 15-17 Décembre **2011**. Agadir

Hanae El Monfalouti, Badreddine Kartah, Saïd Gharby, Hicham Harhar, Dominique Guillaume, Zoubida Charrouf, Giuseppe Zeppa. —Analysis and antioxidant capacity of the phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa* (L.) Skeels)”. *Colloque international sur "Chimie, Environnement et développement Durable"*. 20-21 Septembre **2011**. Rabat.

Hanae El Monfalouti , Badreddine Kartah, , Hicham Harhar, Said Gharby, Dominique Guillaume, Zoubida Charrouf, Manuella Giordano, Guiseppe Zeppa.—Identification of volatils compounds by HS–SPME analysis coupled with GC–ITMS from argan oil”. *Colloque international sur "Chimie, Environnement et developpement Durable"* 20-21 Septembre **2011**. Rabat.

H. El Monfalouti, B. Kartah, M. Giordello, H. Harhar, S. Gharby, D.Guillaume, Z. Charrouf, G. Zeppa —Determination of volatils compounds from cosmetic and alimentary argan oil (*Argania Spinosa*) by HS-SPME » *Congrès International sur les plantes aromatique et médicinales*. 13-15 Avril **2011**. Cagliari (Italie).

H. EL Monfalouti, M. Ghanmi, B. Kartah, B. Satrani, H. Harhar, Z. Charrouf « Valorisation de l'huile essentielle de l'armoise blanche de la région de Guercif (Orientale du Maroc) » *3 ème Symposium International Sur les PAM et 1er Congrès sur les Molécules Bioactives*. 29-30 Mai **2008**. Oujda.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	: Classification botanique de l'arganier	22
Tableau 2	: Caractères physico-chimique de l'huile d'argane.....	28
Tableau 3	: Pourcentage des majeurs triglycérides trouvés dans l'huile d'argane.....	28
Tableau 4	: Pourcentage des acides gras dans l'huile d'argane.....	29
Tableau 5	: Les tocophérols de l'huile d'argane.....	30
Tableau 6	: Composition en stérols de l'huile d'argane.....	32
Tableau 7	: Composés phénolique de l'huile d'argane.....	32
Tableau 8	: Le pourcentage des photoproduits (%) après irradiation UV des échantillons pendant 1h.....	128

Article 1#

Table 1	: Percentage of oleic, linoleic, stearic and palmitic acid in common (corn, olive, soybean, sunflower and peanut) and less common (grape seed, argan) oils Classification botanique de l'arganier	43
Table 2	: Differences between the four argan oil types.....	43
Table 3	: Key papers on the pharmacology of argan oil and their scientific findings	44

Article 2#

Table 1	: Regression data, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) for phenolic compounds in argan parts.....	68
Table 2	: Total and individual phenolic compounds detected in the different parts of argan fruit by HPLC. Concentration is expressed in mg/100g or mg GAE/g for measurements by the Folin-Ciocalteu.....	74
Table 3	: Radical scavenging and antioxidant activity of the crude polyphenols extracted from different parts of argan fruit.....	75
Table 4	: Pearson correlation coefficient (R) between antioxidant capacity assays and total phenolic content (TPC) in different argan fruit parts.....	76

Article 3#

Table 1	: Quantified volatile compounds ($\mu\text{g/kg}$ of oil $\pm\text{SD}$) isolated in argan oil from kernels roasted for different times.....	92
----------------	--	-----------

Article 4#

Table 1	: Average composition of virgin argan oil (VAO) and virgin olive oil (VOO)....	105
Table 2	: Initial characteristics of the studied population.....	106
Table 3	: Vitamin E blood concentration ($\mu\text{mol/L}$) during the intervention.....	106

LISTE DES FIGURES

Figure 1	: Distribution géographique de l'arganier au Maroc	21
Figure 2	: L'arganier	22
Figure 3	: Fruit de l'arganier	24
Figure 4	: Le noyau de fruit de l'arganier	24
Figure 5	: 1) Dépulpage du fruit, 2) concassage des noix et 3) torréfaction traditionnelle des amandons	25
Figure 6	: 1) Trituration 2) malaxage et 3) pressage anuelle	26
Figure 7	: Les machines utilisées pour l'extraction de l'huile argane	27
Figure 8	: Structure du squalène de l'huile argane	28
Figure 9	: Structure des tocophérols de l'huile argane	30
Figure 10	: Triterpènes et méthylstérols abondants de l'huile d'argane	31
Figure 11	: Principaux stérols de l'huile d'argane	32
Figure 12	: Quelques composés phénoliques isolés de l'huile d'argane	33
Figure 13	: Schéma de la réaction de Caramélisation (Selon Kroh , 1994) (a), La	84
Figure 14	: Schéma d'autooxydation	85
Figure 15	: Schéma simplifié de la réaction de Maillard	86
Figure 16	: Le spectre électromagnétique solaire	117
Figure 17	: Structure de nucléotide naturel	118
Figure 18	: Les bases nucléiques de l'ADN	118
Figure 19	: Les principaux photoproduits induits par les ultraviolets	121
Figure 20	: Les CPDs cis syn et trans syn induits par irradiation du TpT	125
Figure 21	: L'adduit 6-4 PP induit par irradiation du TpT	126
Figure 22	: Comportement photochimique du TpT Après irradiation à 254nm pendant 1h	126
Figure 23	: Comportement photochimique du TpT couvert par un film de paraffine après irradiation à 254nm	127
Figure 24	: Comportement photochimique du TpT couvert par un film de l'huile d'argane diluée par la paraffine (1 :9) après irradiation à 254nm	129
Schéma 1	: Représentation des principaux groupes de flavonoïdes	60
Schéma 2	: Synthèse du thymidylyl- (3' → 5')- thymidine TpT	123

ABREVIATIONS

(6-4)PP	: Pyrimidine (6-4) pyrimidone
A	: Adénine
AA	: Argane alimentaire
ABTS	: 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AC	: Argane cosmétique
AGE	: Acides gras essentiels
AGPI	: Acides gras polyinsaturés
Apo	: Apolipoprotéine
ARFEM	: ARgan FEmmes Ménauposée
BGL	: Blood glucose level
BHT	: Hydroxytoluène butylé
BMI	: Body mass index
DBP	: Diastolic blood pressure
DVB	: Divinylbenzene
C	: Cytosine
CAR	: Carboxen
CID	: Collision induced dissociation
CML	: Carboxyméthyllysine
CPD	: Cyclobutane photoproduits dimères
DCM	: Dichlorométhane
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
ESI	: Electrospray ionization
FC	: Folin- Ciocalteu
FT3	: Free tri-iodothyronine
FT4	: Tetra-iodothyronine
G	: Guanine
GAE	: Gallic acid equivalents
GC-MS	: Gaz chromatography coupled with mass specrometry
HMF	: Hydrométhylfurfural
HP	: Hypertension prevalence
i	: Irradié
LC-MS	: Liquid chromatography coupled with mass specrometry
LOD	: Limit of detection
LOQ	: Limit of quantification
MDP	: Maximum production diène
MHz	: Mega Herz
O	: Olive
OMS	: Organisation mondiale de la santé
P	: Paraffine
PON1	: Paraoxonase 1
PDMS	: Polydimethylsiloxane
R	: Correlation coefficient
RMN	: Résonance magnétique nucléaire
RSA	: Radical scavenging activity

Rt	: Retention time
T	: Thymine
TAA	: Total antioxidant activity
t-BuOOH	: Tert-butyl hydroperoxide
TE	: Trolox equivalent
TEAC	: Trolox equivalent antioxidant capacity
TIC	: Total ion current
TFA	: L'acide trifluacetique
THS	: Traitement hormonal substitutif
TMS	: Tétraméthylsilane
TPC	: Total phenolic content
TPt	: Thymidylyl-(3', 5')-thymidine
Trolox	: 6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid
SBP	: Systolic blood pressure
SD	: Standard deviation
SPME	: Solid phase microextraction
SOD	: Enzymes superoxyde dismutases
UV	: Ultra-Violet
VAO	: Virgin argan oil
VOO	: Virgin olive oil

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	16
CHAPITRE I : Revue Bibliographique	20
I- Généralités sur l'Arganier	21
II- L'huile d'argane	25
II-1 Extraction de l'huile d'argane	25
II-2 Phytochimie de l'huile d'argane	27
II-3 Propriétés pharmacologiques de l'huile d'argane	33
III- Article 1: Therapeutic potential of argan oil: a review	37
CHAPITRE II : Les polyphénols de l'Arganier	58
I-Introduction	59
II-Article 2: Analysis and antioxidant capacity of the phenolic compounds from argan fruit <i>(Argania spinosa (L.) Skeels)</i>	63
III- Synthèse de l'article	80
CHAPITRE III : Effet de la torréfaction des amandons sur la composition volatile de l'huile d'argane	81
I- Introduction	82
II- Article 3: Volatile Compound Formation During Argan Kernel Roasting	87
III- Synthèse de l'article	97
CHAPITRE IV : Etude de l'effet de la consommation de l'huile d'argane sur la teneur sérique en vitamine E chez les femmes ménopausées	98
I- Introduction.....	99
II- Article 4: Argan oil and postmenopausal Moroccan women: Impact on the vitamin E profile	103
III- Synthèse de l'article	112
CHAPITRE V : Etude préventive des photodommages de l'ADN par l'huile d'argane	113
I- Introduction	114
II- Généralités	115
III- Matériels et Méthodes	122
IV- Résultats et Discussion	125
V- Conclusion.....	133
CONCLUSION GENERALE	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	138
ANNEXES	151
RESUME	191

Introduction Générale

L'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) est un arbre endémique au Maroc. C'est un arbre très résistant à la sécheresse et à la chaleur qui pousse d'une façon sauvage et en abondance dans les zones arides et semi-arides du sud-ouest marocain. Dans cette zone géographique, l'arganier joue un rôle irremplaçable dans l'équilibre écologique et dans la préservation de la biodiversité. En plus de ce rôle environnemental, l'arganier présente un intérêt économique très important ; l'huile d'argane étant le principal produit issu de l'arganier.

L'arganeraie est traditionnellement habitée par la population Amazigh qui a développé à travers les âges une manière particulière de vie centrée sur l'arganier. L'arganeraie assure ainsi la subsistance de 3 millions de personnes dont 2.2 millions en milieu rural. Les différentes productions de l'arganeraie fournissent plus de 20 millions de journées de travail dont 7.5 millions de journées essentiellement féminines pour la seule extraction de l'huile d'argane. L'arganeraie s'étendait autrefois sur 1.5 million d'hectares. Elle ne couvre actuellement plus que 800 000 ha, en moins d'un siècle plus de 2/3 de la forêt a disparu et environ 600 ha sont perdus chaque année. Cette réduction est la conséquence d'une surexploitation agricole, de la surexploitation domestique des arganiers comme bois de chauffage ou comme fourrage suspendu par les troupeaux et des récentes années d'extrême aridité qui ont frappé le Maroc. L'érosion des sols et l'avancée du désert constituent en conséquence autant d'agressions de ce patrimoine unique (Z. Charrouf et D. Guillaume, 1999).

Préoccupé par cette problématique, l'Organisation des Nations Unies pour l'Education, la Science et la Culture (UNESCO) a déclaré l'arganeraie marocaine Réserve de la Biosphère en 1998. Depuis lors, un vaste programme visant à sauver l'arganeraie selon un mode de développement durable est en cours au Maroc (Z. Charrouf et D. Guillaume, 2009). Dans ce programme les préoccupations écologiques et économiques ont été étroitement associées. Avec le soutien du gouvernement Marocain, de quelques gouvernements étrangers et de nombreuses organisations non gouvernementales, ce programme continue actuellement d'être activement développé ; il recouvre les aspects botaniques, scientifiques, sociologiques et économiques.

Un résultat spectaculaire de ce programme d'études a été la confirmation des vertus connues en médecine traditionnelle de l'huile d'argane. Ces résultats ont conduit à la popularisation mondiale de l'huile d'argane. Jusqu'à présent, un réseau de coopératives de production d'huile d'argane s'est développée au Maroc, les bénéfices de ces coopératives permettant le développement des populations locales qui doivent assurer la sauvegarde de l'arganier.

Deux catégories d'huile d'argane existent : l'huile cosmétique provenant des amandons non torréfiées, et de l'huile comestible extraite à partir des amandons torréfiées. Les propriétés physico-chimiques de ces deux types d'huile d'argane ont été bien étudiées (Matthäus B *et al.* 2010 ; Hilali M *et al.*, 2005) ainsi que leur production de façon contrôlée et reproductible (Gharby S *et al.*, 2010; Harhar H *et al.* 2010) et leurs propriétés pharmacologiques (Charrouf Z et Guillaume D, 2010 ; Adlouni A., 2010 ; Charrouf Z et Guillaume D, 2008). En effet, les propriétés nutritionnelles de l'huile d'argane sont dues à sa composition chimique. Elle est composée de 80% d'acides gras insaturés (Norme Marocaine NM 08.5.090, 2003) et particulièrement riche en tocophérols, molécules dotées de fortes propriétés anti-oxydantes. La forte teneur en tocophérol et la faible teneur en acide linoléique sont responsables de sa résistance à l'oxydation. Les phospholipides de l'huile d'argane contribuent à la préservation de l'huile (S. Gharby *et al.*, 2012).

L'huile d'argane possède de propriétés nutritionnelles importantes. Des études d'observations expérimentales et des essais d'intervention ont montré que la consommation d'huile d'argane peut réduire le risque cardiovasculaire à travers un mécanisme biologique passant par des actions sur la pression artérielle, les lipides plasmatiques et le statut antioxydant.

L'huile d'argane est caractérisé par sa teneur en antioxydants (Khallouki *et al.*, 2003). Bien qu'ils soient présents en petite quantité, ces substances confèrent à l'huile d'argane des propriétés essentielles pouvant jouer un rôle très important dans des processus physiopathologiques conduisant au vieillissement tissulaire, à l'athérosclérose et au cancer. Cette composition a déclenché des travaux de recherche visant à promouvoir l'utilisation de l'huile d'argane comme produit pharmacologique. En effet, il a été montré que l'huile d'argane comestible présente un effet hypocholestérolémiant (Cherki *et al.*, 2005) et antioxydant (Drissi *et al.*, 2004). La fraction insaponifiable de l'huile d'argane a également montré un effet antiprolifératif sur des lignées cancéreuses humaines de prostate (Drissi *et al.*, 2006 ; Bennani *et al.*, 2007).

L'huile d'argane cosmétique est dotée de nombreuses propriétés dermo-cosmétique (Guillaume & Charrouf, 2011). Traditionnellement, cette huile est revendiquée pour guérir toutes sortes de boutons de la peau avec une efficacité particulière pour l'acné juvénile et la varicelle (Z. Charrouf et D. Guillaume, 1999). Elle ralentirait également la formation des rides. L'huile d'argane cosmétique présente des propriétés anti-sébum (H. Dobrev, 2007). Elle est généralement utilisée en cosmétologie comme hydratant pour la peau et pour guérir les peaux dévitalisées. Cependant l'effet protecteur contre le rayonnement UV clamé par certains laboratoires cosmétiques n'a, à ce jour, jamais été mis en évidence. De façon similaire, l'impact de la consommation d'huile d'argane par les femmes ménopausées n'est l'objet que de rapport dans la médecine traditionnelle. Nous nous sommes donc attachés particulièrement à démontrer ces deux points. Nous avons aussi étudié la fraction phénolique de différentes parties de l'arganier puisque les polyphénols sont souvent présents comme étant responsables des propriétés anti-UV et antioxydantes. Enfin, nous avons étudié l'effet de la torréfaction sur la composition volatile de l'huile d'argane.

Le travail de la présente thèse s'inscrit dans le cadre de la continuité des séries de recherches effectuées pour la valorisation et la sauvegarde de l'arganier. Ce manuscrit sera présenté sous forme de thèse sur publications.

Dans le 1^{er} chapitre, une synthèse bibliographique est présentée, détaillant en premier lieu l'arganier, le contexte économique de la filière, les différentes procédés d'extraction de l'huile d'argane, sa composition chimique et les bienfaits nutritionnels, et sera achevé par une revue publiée à ce sujet et intitulée : Le potentiel thérapeutique de l'huile d'argane.

Dans le 2^{ème} chapitre, nous nous sommes intéressés à la valorisation du fruit et des sous produits d'arganier, à travers l'étude de leurs compositions phénoliques et activité antioxydante, ce travail a permis pour la première fois de quantifier les polyphénols.

Le 3^{ème} chapitre est consacré à l'étude de l'effet de la torréfaction des amandons d'arganier sur la composition volatile de l'huile d'argane. L'originalité de cette étude est la caractérisation macroscopique de la cinétique de la formation de ces composés et leur quantification pendant différents temps et à température constante.

Du côté nutritionnel, le 4^{ème} chapitre fera l'objet de l'étude de l'influence de la consommation de l'huile d'argane, durant 8 semaines, sur la teneur sérique en vitamine E chez les femmes ménopausées.

Enfin, le dernier chapitre permet pour la première fois d'évaluer, *in vitro*, l'effet photoprotecteur de l'huile d'argane, en le comparant avec l'huile d'olive, contre les photodommages de l'ADN provoqués par les rayons UV.

Chapitre I

Revue Bibliographique

I- GENERALITES SUR L'ARGANIER

L'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) est un arbre endémique du Sud-Ouest du Maroc (Figure 1). Il peut croître en zones de plaine ou sur les versants abrupts de l'Atlas jusqu'à une altitude de 1500m. Il joue un rôle irremplaçable dans l'équilibre écologique et économique du Sud Maroc en protégeant les sols de l'érosion éolienne ou par ravinement et son ombrage étendu abrite souvent une activité agricole familiale.

L'arganeraie constitue ainsi la deuxième essence forestière du Maroc après le chêne vert et juste avant le thuya. La superficie de l'arganeraie sud marocaine est actuellement estimée à 800 000 ha et elle compte plus de 20 millions d'arbres (Charrouf 1999).

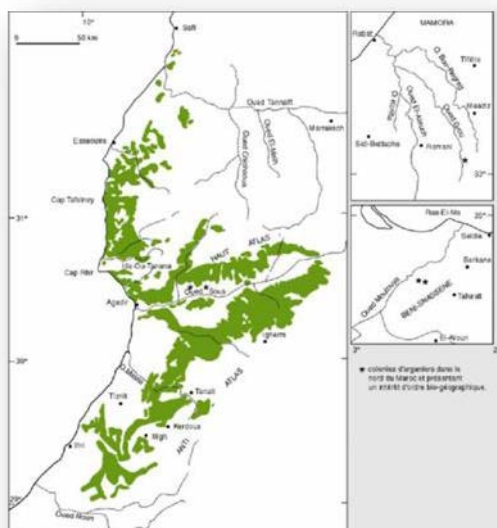


Figure 1 : Distribution géographique de l'arganier au Maroc

L'arganier appartient à la famille des Sapotacées, du genre *Argania* et d'espèce *spinosa*. Sa classification botanique se présente comme suit (tableau 1).

Tableau 1 : Classification botanique de l'arganier

Nom	<i>Argania spinosa</i> L. (skeels)
Embranchement	Phanérogammes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Gamopétales
Ordre	Ebenales
Famille	Sapotacées
Genre	Argania
Espèce	Spinosa

L'arganier est un arbre épineux. C'est un "arbre relique" de 1^{ère} tertiaire et il est le seul représentant de la famille des sapotacées à se développer en dehors de la zone intertropicale. Parfaitement adapté à l'aridité du sud-ouest marocain, il supporte des températures allant de 3° à 50° C. L'arganier présente sous forme de buissons ou dressé (7 à 10m). Sa croissance est lente mais l'arganier est un arbre très résistant qui peut vivre de 150 à 200 ans. Sa silhouette est caractéristique : cime large et ronde, tronc noueux, tortueux et assez court, souvent formé de plusieurs parties entrelacées (Figure 2).



Figure 2 : L'arganier

Le bois de l'arganier est très dur. Il est utilisé essentiellement comme bois de chauffage, ce bois ne possède pas de cernes annuels nettement caractérisés (Emberger L. 1960).

L'arganier possède des mécanismes qui limitent ou ralentissent la chute du potentiel foliaire et relèvent de la stratégie d'évitement.

Les racines de l'arganier plongent très profondément dans le sol. Elles permettent ainsi la récupération des eaux à partir de couches profondes. Ceci permet à l'arganier de s'adapter à un climat semi-aride et aride (Emberger L. 1960).

Les rameaux de l'arganier sont très épineux, et garnis de petites feuilles ; les épines qui assurent une certaine défense de l'arbre, sont l'équivalent d'un rameau.

Les feuilles de l'Arganier sont petites, pratiquement persistantes, coraces, vert sombre sur la face inférieure. Les feuilles sont alternes, souvent réunies en fascicules, lancéolées ou spatulées insensiblement atténuées en un pétiole plus ou moins distinct, avec une nervure médiane très nette et les nervures latérales très fines et ramifiées. Les feuilles sont subpersistantes, l'arbre ne les perd ainsi que transitoirement, en cas de grande sécheresse.

Les feuilles sont consommées par les dromadaires et les chèvres qui grimpent dans les arbres où elles mangent de jeunes pousses et le fruit, laissant le noyau qu'il contient.

Les fleurs de l'arganier sont blanches à jaune verdâtre, hermaphrodites, gamopétales à tube très court et sont réunies en glomérules.

Le calice de la fleur est composé de cinq sépales pubescents succédant à deux bractées (Emberger L. 1960 ; Mensier P. H. 1957). La corolle, en cloche, est formée de cinq pétales obtus et arrondis.

Les fleurs apparaissent à la fin du printemps (mai-juin) et conduisent à des fruits qui atteindront leur maturité vers septembre.

Le fruit d'arganier est formé d'un péricarpe charnu ou pulpe qui recouvre un noyau très dur (noix d'argane) représentant environ un quart du poids du fruit frais. La noix renferme une à trois amandons albuminées et huileuses.

Selon la forme et la dimension, six types de fruits ont été distingués : fusiforme, ovale, ovale apiculée, goutte, arrondie, globuleuse.

La production fruitière varie selon l'âge de l'arbre, la densité du peuplement, le milieu et la pluviométrie. L'ordre de grandeur est de 8 kg/arbre/an, soit 128000 tonnes/ an pour l'arganeraie marocaine avec une densité moyenne de 200 souches/ha.

La production des différentes composantes du fruit pour 100 kg de fruits mûrs donnent 60 kg de fruits sec dont 30 kg de pulpe sèche et 30 kg de noyaux. Ces 30 kg de noyaux donnent environ 27 kg de coques et 3 kg d'amandon.

Les dimensions du fruit varient de 17 à 30 mm de long et de 10 à 17 mm de large. Sa couleur est verdâtre avant maturation, puis elle évolue vers le jaune ou jaune-brun clair suivant les arbres.

La couleur sombre se développe après abscission.



Figure 3 : Fruit de l'arganier

La pulpe du fruit de l'Arganier, appelée également péricarpe, est la partie la plus externe qui enveloppe la graine. Cette pulpe est charnue, amère mais très riche en glucides solubles ou facilement hydrosolubles. Elle contient également de la cellulose et constitue un apport très important dans l'alimentation du bétail (Collier & Lemaire 1974).

Suivant le degré de maturation du fruit, la pulpe change de couleur. Elle passe du vert au jaune veiné de rouge à la maturation puis au brun foncé une fois desséchée.

Le fruit de l'Arganier renferme une graine composée, appelée noyau. Ce dernier est très dur et renferme une ou plusieurs amandes.



Figure 4 : Le noyau de fruit de l'arganier

L'amande elliptique, oléagineuse et aplatie représente au plus le vingtième du poids du fruit (Emberger L. 1960).

L'huile d'argane est extraite de l'amande, il en résulte une huile comestible et un tourteau. Cette huile représente 25 % de l'apport en corps gras dans la région où pousse l'arganier. Le rendement en huile dépend de la méthode d'extraction et peut varier entre 35 et 55 %.

II- L'HUILE D'ARGANE

II-1 Extraction de l'huile d'argane

L'huile d'argane est extraite à partir des amandons de fruit d'arganier. L'extraction de l'huile d'argane à partir des amandons s'effectue soit de manière manuelle, de façon mécanisée ou industrielle.

II-1-1 Méthode traditionnelle

Une fois les fruits mûrs collectés, la pulpe est mise au rebut, offrant les noix d'argane de la taille d'une grosse olive (dépulpage). Les noix d'argane sont ensuite brisées manuellement par les femmes, en les tenant entre le pouce et l'index le long de la plus longue diagonale de semences et en les frappant violemment avec une pierre (concassage). Les amandons sont ensuite collectés, torréfiés quelques minutes dans des plaques d'argile (Figure 5).

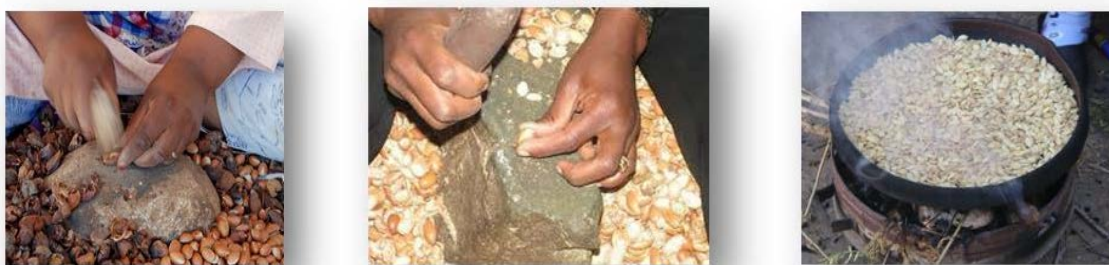


Figure 5: 1) Dépulpage du fruit, 2) concassage des noix et 3) torréfaction traditionnelle des amandons

Les amandons torréfiés sont ensuite broyées à l'aide d'une meule manuelle (trituration), offrant ainsi une pâte brunâtre qui est ensuite mélangée avec de l'eau chaude pendant plusieurs minutes. La pâte est ensuite pressée à la main pour libérer une émulsion brune qui est

décantée après plusieurs minutes à fournir à l'huile d'argane (malaxage). Le résidu d'extraction (tourteau) est très amer, riche en huile, il est utilisé pour nourrir le bétail (Figure 6).



Figure 6: Trituration, malaxage et pressage manuel.

La préparation d'huile d'argane par la méthode traditionnelle est très lente, la durée de travail pour une personne, à partir des fruits récoltés, est 20 h pour préparer une 1 litre d'huile.

L'extraction artisanale de l'huile d'argane souffre de nombreux inconvénients, excluant ainsi sa commercialisation à grande échelle. L'ajout de l'eau et les conditions sanitaires insatisfaisantes réduisent la durée de conservation de l'huile d'argane, parfois à quelques semaines. Toutefois, lorsque la préparation traditionnelle se déroule selon des règles hygiéniques contrôlées, l'huile d'argane peut être conservée pendant 1 an au maximum.

II-1-2 Méthode par presse mécanique

Dans les coopératives féminines, des normes hygiéniques strictes, pour la préparation de l'huile d'argane, ont été mise en œuvre (Charrouf, Guillaume & Driouich. 2002). En outre, l'huile d'argane est extraite à l'aide de presse mécanique ce qui rend le malaxage avec de l'eau inutile. Simultanément, l'utilisation de la presse a augmenté considérablement le rendement en huile par la récupération de 10% de l'huile qui reste dans le tourteau.

Pour cette méthode, la seule étape de concassage des noix est manuelle. Les fruits sont déulpés grâce à une machine (dépulpeuse) qui sépare la pulpe de la noix, la torréfaction s'effectue à l'aide d'un torréfacteur de gaz, et l'huile est extraite par la presse mécanique (figure 7).



Figure 7 : Les machines utilisées pour l'extraction de l'huile d'argane

Grâce à la méthode d'extraction mécanique, deux types d'huiles sont extraites ; l'huile d'argane alimentaire à partir des amandons torréfiés, et l'huile d'argane à usage cosmétique à partir des amandons non torréfiés.

L'huile d'argane alimentaire est caractérisée par son goût de noisette qui est une conséquence de la torréfaction. La normalisation de cette étape a permis la production d'une l'huile de saveur reproductible à grande échelle.

Le temps total nécessaire pour préparer 1 Litre de huile a été réduit à 16h. La tâche la plus pénible est le concassage. Il est restée traditionnel.

II-1-3 Méthode industrielle

Pour des fins industrielles ou de laboratoire, l'huile d'argane peut être extraite à l'aide des solvants lipophiles. Dans les année 80, l'industrie des cosmétiques utilisait ce procédé. La teneur en insaponifiable dans ce type d'huile est trois fois plus faible que celui de l'huile extraite par presse.

II-2 Phytochimie de l'huile d'argane

II-2-1 Caractéristiques physico-chimiques

La densité d'huile d'argane est de 0,906 à 0,919. Son indice de réfraction est de 1,463 à 1,472 et son indice d'acide compris entre 0,8 et 2,5. L'indice d'acide de l'huile d'argane extra vierge doit être inférieur à 0,8 selon le Service de normalisation industrielle Snima (Tableau 2).

Tableau 2 : Caractères physico-chimiques de l'huile d'argane

Constantes	Norme marocaine
Indice d'acide g%g	≤ 3.3
Indice de peroxyde meq/kg	≤ 20
Indice de réfraction à 20 °C	1.463-1.472
Indice de saponification	189-199.1
Insaponifiable %	≤ 1.1
Teneur en eau et matières volatiles % m/m	≤ 0.2
Teneur en impuretés %m/m	≤ 0.3

II-2-2 Composition chimique

L'huile d'argane est constituée essentiellement de la fraction glycéridique (99%) et la fraction insaponifiable (1%).

II-2-2-1 Fraction glycéridique

La fraction glycérique est composée majoritairement de triglycérides (97,30%) ; 1,53 %, de diglycérides et acides gras libres et 0,27 % de monoglycérides (Farines et *al.*1984). Les principaux triglycérides trouvés dans l'huile d'argane (Hilali et al 2005) sont décrits dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Pourcentage des triglycérides majeurs trouvés dans l'huile d'argane

TG	%	TG	%	TG	%
LOO	13,7-16,3	OOO	9-14,9	LLP	5,8-6,6
LOP	12,6-14,6	POO	14,9-17,4	SOO	4,1-6
LLO	11,5-16,7	LLL	5,8-8,1	OPP	3,6-5,2

TG : Triglycérides ; O, acide oléique ; L, acide linoléique ; P, acide palmétique ; S, acide stéarique

L'huile d'argane est riche en acide gras insaturés : les acides gras mono-et poly-insaturés représentent 80 % environ des acides gras totaux : l'acide oléique (C 18:1), représentant 45 % des acides gras, l'acide linoléique (C 18:2 n-6), dont la part est de 35 %, l'acide palmitique (C 16:0) avec 12 % environ et l'acide stéarique (C 18:0), à hauteur de 5 % environ (Dubois et *al.* 2007 ; Hilali et *al.* 2005 ; Kazantzis et *al.* 2003). Les autres acides gras sont trouvés à l'état de traces (Norme marocaine homologuée de corps gras. 2002) (Tableau 4).

Tableau 4 : Pourcentage des acides gras dans l'huile d'argane

Acide	%	Acide	%	Acide	%
Oleique	43-49	Linoleique	29-36	Palmetique	11-15
Stearique	4-7	Palmitoleique	0,3-3	Arachidique	<0,5
Linolenique	<0,2	Behenique	<0,2	Myristique	<0,1

II-2-2-2 Fraction insaponifiable

La fraction insaponifiable d'un corps gras correspond à l'ensemble de ses constituants qui, après hydrolyse basique (saponification à l'aide de la potasse alcoolique ou aqueuse), sont très peu solubles dans l'eau et solubles dans les graisses. Généralement l'insaponifiable des huiles contient des molécules de hauts poids moléculaires, non volatiles et qui sont faiblement solubles dans les solvants aqueux (Khallouki et *al.* 2003).

Malgré leur faible teneur, les composés qui constituent cette fraction sont hautement responsables des propriétés pharmacologiques. On y retrouve la majorité des composés mineurs de l'huile d'argane qui sont les phytostérols, les alcools triterpéniques, les tocophérols et les xanthophylles (Khallouki et *al.* 2003 ; Khallouki et *al.* 2005).

Cette fraction ne constitue qu'une partie infime de l'huile d'argane (environ 1 %). Elle est constituée des carotènes (37,5 %), de tocophérols (7,5 %), d'alcools triterpéniques (20 %), des méthyl-stérols et stérols (20 %) et de xanthophylles (6,5 %) (Collier & Lemaire 1974 ; Farines et *al.* 1984 ; Rojas et *al.* 2005).

- Caroténoïdes et hydrocarbures

Parmi les caroténoïdes, on trouve des xanthophylles (Charrouf, Guillaume & Driouich 2002). Les hydrocarbures en plus des carotènes représentent 37,5% de l'insaponifiable, le taux du squalène est à raison de 320 mg/100 g (Khallouki et *al.* 2003). Les hydrocarbures dans les huiles sont présents en quantité généralement inférieure à 0,2 %, l'exception est faite sur l'huile d'olive qui en contient 0,5 %, constitué principalement du squalène.

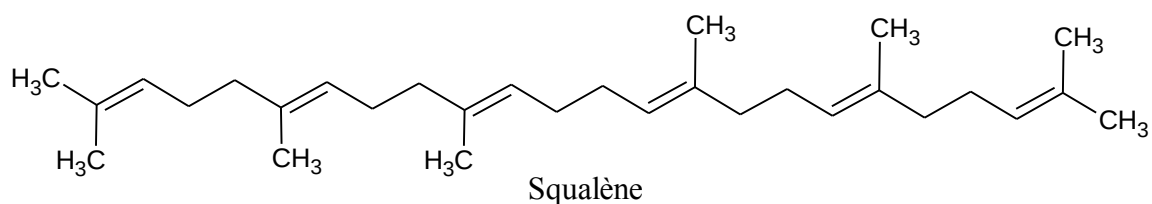


Figure 8 : Structure du squalène

- Tocophérols

L'huile d'argane constitue une ressource de vitamine E non négligeable. L' α -tocophérol (7%) et le γ -tocophérol (85 %) sont responsables de la principale activité de la vitamine E. le β et le δ - tocophérols sont en quantité faibles (Charrouf et *al.* 1998 ; Khallouki et *al.* 2003).

Les tocophérols possèdent à la fois un pouvoir vitaminique (vitamine E notamment α tocophérol) et des propriétés antioxydantes (Timmermann V.E 1990 ; Sandert et *al.* 1996).

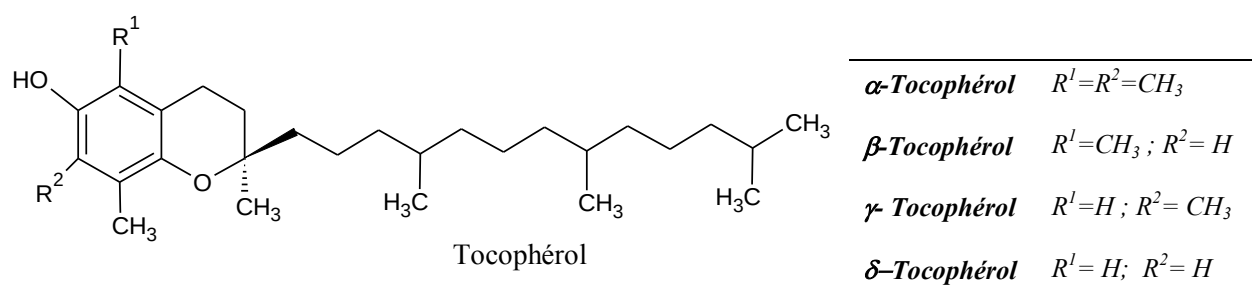


Figure 9 : Structure des tocophérols

Tableau 5: Les tocophérols de l'huile d'argane

α-tocophérol	2,4-4,8 %
β-tocophérol	0,1-0,2 %
γ-tocopherol	81-89 %
δ-tocophérol	6,2-8,2 %
Tocophérols totaux	600-700 mg/100g

-Phytostérols et alcools triterpéniques

La fraction insaponifiable contient également 20 % de stérols, dont le schotténol et le spinastérol sont les majoritaires (Farines et al.1984b), et 20% de méthylstérols et triterpènes. Les structures identifiées dans l'huile d'argane sont :

- ✓ Cinq alcools triterpéniques dont le bytuospermol (18.1 %), la β -amyrine (27.3 %) et le turicallol (27.9 %) Ces trois alcools triterpéniques sont les plus abondants (Figure 10).
- ✓ Deux méthylstérols (citrostadiénol (3.9 %), cycloeucalénol (<6 %)) (Figure 10).

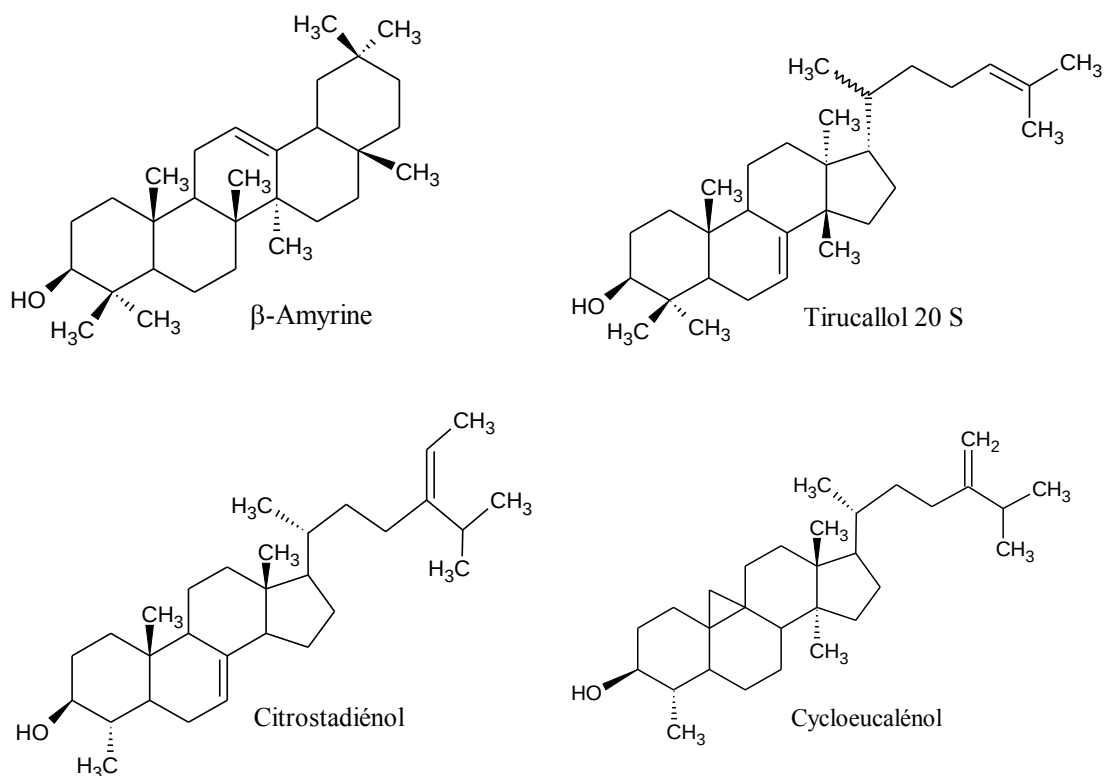


Figure 10 : Triterpènes et méthylstérols abondants de l'huile d'argane

- ✓ L'huile d'argane renferme quatre stérols dérivés du stigmastane. Ce sont le spinastérol et le schottenol (environ 88 % de cette fraction stérolique à eux deux), ainsi que le δ -7-avénastérol et le stigmastadiène. Les δ -7 stérols sont rarement rencontrés dans les huiles végétales (Figure 11).

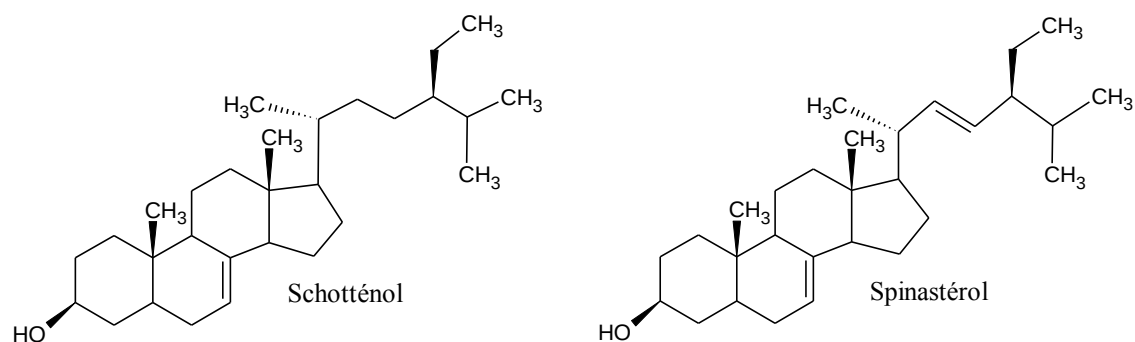


Figure 11 : Principaux stérols de l'huile d'argane

Tableau 6 : Composition en stérols de l'huile d'argane

Schotténol	44 - 49 %
Spinastérol	34 - 44 %
7 avénastérol	4 – 7 %
Stigmastadiène	3.2 – 5.7 %
Campestérol	0.4 %
Stérols totaux	170 mg/100g

- Composés phénoliques

Les phénols isolés de l'huile d'argane sont l'acide vanillique, ferulique, syringique, p-hydroxybenzoïque et 18 protocatéchiques. De même que le tyrosol, le résorcinol, le catécol, la catéchine, l'épicatéchine et la vanilline. Ces phénols simples sont présents en faible concentration dans l'huile alimentaire et presque nulle dans l'huile cosmétique (Rojas et al. 2005 ; Khallouki et al. 2003) (Tableau 7 ; Figure 12).

Tableau 7 : Composés phénoliques quantifiés de l'huile d'argane (Khallouki et al. 2003)

Composés phénoliques (µg/kg)	
Acide Vanillique	67
Acide Syringique	37
Acide Ferulique	3147
Tyrosol	12
Total	3263

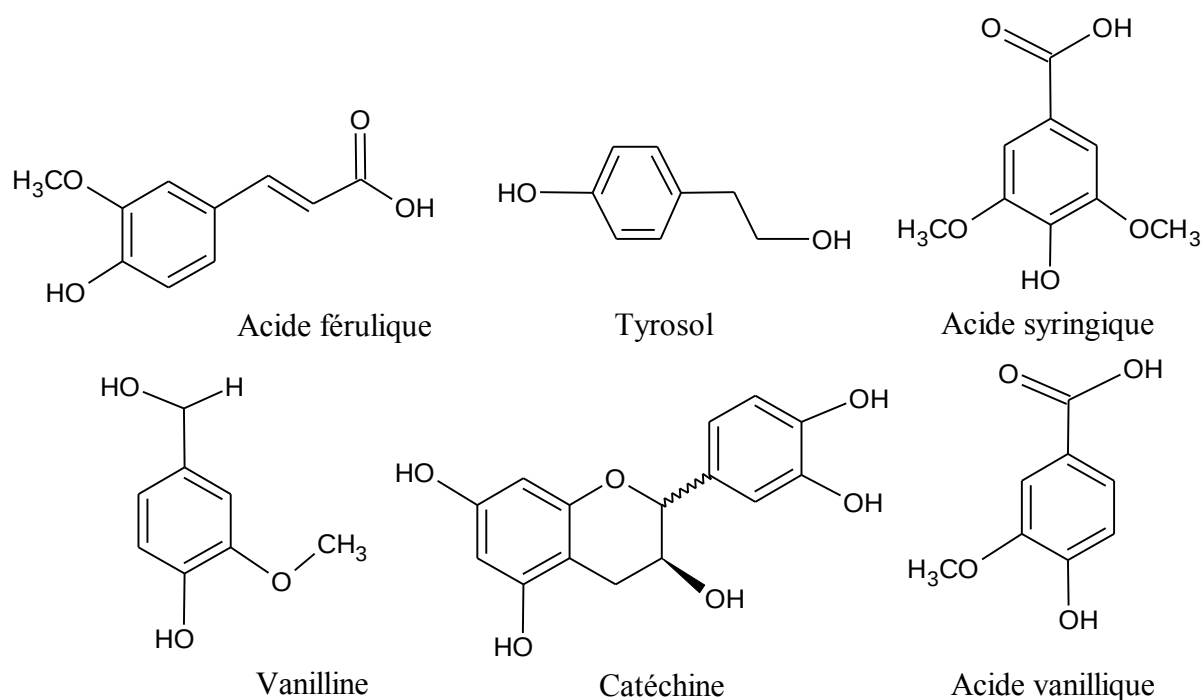


Figure 12 : Quelques composés phénoliques isolés de l'huile d'argane

II-3 Propriétés pharmacologiques de l'huile d'argane

II-3-1 Propriétés alléguées traditionnellement

L'huile d'argane est utilisée traditionnellement pour l'alimentation des populations du sud marocain, elle est recommandée, selon la pharmacopée marocaine, pour traiter des maladies de peau. En effet, l'huile d'argane alimentaire est considérée cholérétique, utile pour traiter l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose. Elle est également recommandée pour les rhumatismes (Bellakhdar 1997 ; Moukal 2004). Quant à l'huile d'argane cosmétique, elle est recommandée contre les boutons de la peau, l'acné juvénile, la cicatrisation des brûlures, l'eczéma et la varicelle. Elle permet ainsi de réduire l'apparition des rides et elle est utilisée pour protéger la peau et les cheveux contre la sécheresse (Moukal 2004).

II-3-2 Propriétés prouvées scientifiquement

En plus de revendications traditionnelles, les bienfaits de la consommation de l'huile d'argane sur la santé humaine ont été mis en évidence par plusieurs études épidémiologiques ou cliniques. Les effets de protection cardiovasculaire et antidiabétique sont les effets pharmacologiques les plus anciens réclamés de l'huile d'argane.

En raison de son niveau élevé en acides oléique et linoléique et des composés antioxydants, l'impact de l'huile d'argane sur les maladies cardiovasculaire a été étudié à travers des modèles animaux, des cellules isolées, des organes ou des études épidémiologiques humaines (Derouiche et *al.*, 2005 ; Berrada et *al.*, 2000 ; Benajiba et *al.*, 2002 ; Berrougui et *al.*, 2004 ; Berrougui et *al.*, 2005). En effet, il a été montré que la consommation quotidienne de 25 mL de l'huile d'argane augmente le niveau du cholestérol HDL et diminue le taux de triglycérides chez les hommes sains (Derouiche A et *al.* 2005). Par conséquent, la consommation régulière de l'huile d'argane peut prévenir les maladies cardiovasculaires (Cherki *al.* 2006). L'huile d'argane inhibe également l'agrégation plaquettaire sans provoquer ni une prolongation du temps de saignement, ni un changement au niveau des plaquettes (Mekhfi H et *al.* 2008).

Les composés mineurs de l'huile d'argane, tels que les stérols, peuvent être impliqués dans son effet hypocholestérolémiant (Khallouki et *al.* 2003). En effet, la structure moléculaire de ces stérols est très similaire à celle du cholestérol humain, par conséquent, l'apport en stérols réduit l'absorption du cholestérol par la concurrence avec le cholestérol endogène (Ostlund et *al.* 2002 ; Plat & Mensink 2001). Des essais cliniques contrôlés ont démontré que l'augmentation de la quantité de stérols dans l'alimentation améliore positivement le profil lipidique sanguin (Plat & Mensink 2005). Berrada et *al.* (2000) et Berrougui et *al.* (2003) ont montré que le traitement chronique avec de l'huile d'argane améliore le profil lipidique chez les rats hyperlipidémiques. Dans ces deux études, une diminution significative du poids ; du cholestérol total, du LDL ont été observés, alors que l'augmentation de la concentration du cholestérol HDL n'était pas significative.

Ces données ont également été confirmées chez l'homme (Drissi et *al.* 2004 ; Derouiche et *al.* 2005). Drissi et *al.* (2004) ont montré, chez des adultes sains et vivant dans la sud-ouest du Maroc, que la consommation régulière de l'huile d'argane est associée à des taux très faible en cholestérol LDL et la lipoprotéine (A) par rapport aux adultes sains vivant dans la même région mais ne consommant pas l'huile d'argane. Une autre intervention nutritionnelle a permis de comparer l'effet de la consommation de l'huile d'argane vs huile d'olive extra vierge sur le profil lipidique chez 60 hommes adultes sains et recevant 25 mL / jour d'huile. Cette étude randomisée et contrôlée a permis d'obtenir des résultats intéressants (Derouiche et *al.* 2005). En effet, le profil lipidique a montré une augmentation significative du cholestérol HDL et d'apolipoprotéine A1 (apo-AI) pour les deux groupes. Concernant les triglycérides, il a été observé une diminution significative de 17,5% pour le groupe de l'huile d'argane. Par

conséquent, ces études renforcent les résultats obtenus *in vivo* et confirment l'effet protecteur de l'huile d'argane contre les maladies cardiovasculaires.

L'effet antidiabétique de l'huile d'argane a été revendiqué pendant longtemps en médecine traditionnelle, cependant le mécanisme de la régulation du niveau de glucose dans le sang reste encore inconnu. La seule démonstration scientifique de l'activité antidiabétique, étudiée chez des rats sains ou rendus diabétiques, a montré qu'un régime à base d'huile d'argane réduit significativement la glycémie (Emonard H *et al.* 1999).

L'effet anti-hypertenseur de l'huile d'argane et son mécanisme d'action, a été étudié par Berrougui et al. (2004). Le traitement des rats SHR (agés de 4 semaines) par l'huile d'argane réduit de manière significative la pression artérielle au bout de 7 semaines de traitement. Subséquemment, ces résultats montrent l'effet bénéfique de l'huile d'argane pour le traitement de l'hypertension et l'hyperlipidémie. Ce résultat est attribué aux AGPI, stérols, ainsi qu'aux composés mineurs de l'huile d'argane (Berrougui et al. 2004).

L'impact de la consommation de l'huile d'argane sur le statut antioxydant chez des adultes sains a été bien étudié (Drissi et al. 2004 ; Cherki et al. 2005). La première étude a montré que la consommation régulière d'huile d'argane diminue de manière significative les peroxydes de lipides plasmatiques (58,3%) et augmente de façon significative le rapport molaire de l' α -tocopherol/total cholestérol (21,6%), ainsi que la concentration de l' α -Tocophérol (13,4%) par rapport à un groupe non consommateur d'huile (Drissi et al. 2004). Dans la seconde étude, les résultats ont montré que 25 mL / jour d'huile d'argane pendant 3 semaines chez les hommes sains induit une augmentation significative de l'activité de paraoxonase 1 (PON1) (29-45%) et la concentration de vitamine E (16%) et diminue de façon significative les peroxydes lipidiques et la formation de diène conjugué (18 et 8%, respectivement). Ces résultats confirment l'effet bénéfique de l'huile d'argane sur le statut antioxydant chez les hommes.

Il a bien été démontré que l'huile d'argane possède des propriétés antioxydantes (Cherki et al. 2005 ; Drissi et al. 2004). Ces propriétés sont dues essentiellement à ses composés mineurs (Khallouki et al. 2005), parmi ces composés, la fraction phénolique qui s'est montrée capable d'empêcher l'oxydation des lipoprotéines de basse densité (Berrougui et al. 2006) et d'avoir un effet antiprolifératif sur les lignes de cellules humaines cancéreuses de la prostate (Bennani et al. 2007). Tandis que la fraction stérolique, elle a montré une forte activité anti-proliférative

contre une lignée cellulaire DU145 humaine (Emonard H *et al.* 1999). Le niveau élevé de γ -tocophérol, et la teneur élevée en squalène dans l'huile d'argane lui attribuent un effet chimioprotecteur. Sa consommation est fréquemment citée pour la prévention contre le cancer (Blouin JM *et al.* 2006). Les antioxydants présents dans l'huile d'argane (Russo GL 2009) sont censés prévenir ou retarder l'apparition des espèces réactives de l'oxygène (Pauly G *et al.* 2006).

L'huile d'argane possède des propriétés revitalisantes grâce à sa teneur élevée en acide linoléique. En effet, les acides gras insaturés s'introduisent dans les phospholipides membranaires, hydratent la peau et la nourrissent. L'effet hydratant et restructurant de l'huile d'argane a été confirmé par des tests sur des animaux carencés en acides gras essentiels (AGE) (Fabre 1999). Le traitement par l'huile d'argane contribue rapidement et à long terme la perspiration chez l'animal carencé en AGE, dès le 4ème jour d'application. Il s'agit d'une réelle reconstitution du stratum corneum. Cet effet hydratant a été confirmé en clinique (Galli et Calder 2009). La carence en AGE, inévitable avec l'âge, cause un vieillissement cutané qui se traduit par un dessèchement et une perte d'élasticité de la peau, favorisant ainsi l'apparition de rides. La correction d'une carence en AGE permet de retarder le vieillissement cutané.

III- ARTICLE 1



Journal of
Pharmacy and Pharmacology

Therapeutic potential of argan oil: a review_{jphp_1190 16695}

Hanae El Monfalouti^{a,b}, Dom Guillaume^a, Clément Denhez^a and Zoubida Charrouf^b

^a *Université de Reims Champagne Ardenne, Laboratoire de Chimie Thérapeutique, 51 Rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France*

^b *Université Mohammed V-Agdal, Laboratoire de Chimie des Plantes, Faculté des Sciences, BP 1014, Rabat, Morocco*

JPP 2010, 62: 1669–1675

© 2010 The Authors JPP © 2010 Royal

Pharmaceutical Society of Great Britain Received February 26, 2010 Accepted August 10, 2010

DOI 10.1111/j.2042-7158.2010.01190.x ISSN 0022-3573

Correspondence: Dom Guillaume, Université de Reims Champagne Ardenne, Laboratoire de Chimie Thérapeutique, 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France.
E-mail:dominique.guillaume@univ-reims.fr

Abstract

Objectives The therapeutic benefits of argan oil consumption have been claimed by natives of Morocco and explorers for more than eight centuries. However, argan oil has remained unresearched for a long time. Traditionally, argan oil has been well known for its cardioprotective properties and it is also used in the treatment of skin infections. Argan oil is principally composed of mono-unsaturated (up to 80%) and saturated (up to 20%) fatty acids. As minor components, it contains polyphenols, tocopherols, sterols, squalene, and triterpene alcohols. Together with the mono-unsaturated fatty acids, these minor components are likely

to be responsible for its beneficial effects. This review aims to present an overview of the known pharmacological properties of argan oil.

Key findings Antiproliferative, antidiabetic, and cardiovascular-protective effects of argan oil have been particularly actively evaluated over the last 5 years in order to build on phytochemical studies that indicate the presence of large amounts of possibly pharmacologically active compounds.

Summary This review shows that a lack of clinical data constitutes a serious weakness in our knowledge about argan oil, therefore it is difficult to correlate the reported pharmacological activities to any potential clinical relevance.

Keywords *Argania spinosa*; edible oil; fatty acid; food supplement; tocopherol

Introduction

‘Cold-pressed oils’ and ‘virgin oils’ are two terms that can be confusing. Clarification was recently brought to this problem by Matthäus.[1] The term ‘cold-pressed oil’ can be used when a careful, gentle mechanical extraction of the raw material without application of heat is used. However, heat-treatment is allowed during preparation of the raw material and/or of the oil after the pressing process.

Following this definition, edible argan oil is a cold-pressed oil. It is prepared by pressing the slightly roasted kernels of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] fruit. *A. spinosa* is only endemic in south-western Morocco, where it covers an area of 3200 square miles that constitutes a unique biotope, named ‘the argan forest’. In Morocco, the argan forest has an essential agro-economic function.[2] Because the argan tree is drought-resistant, it is also a powerful weapon for slowing down desertification.[3]

Sustainable development of the argan forest was initiated 15 years ago but its success was only recently ascertained.[4,5] The first step in this ambitious programme was the search for argan tree products possessing an economic value.

Cell-wall polymers of plants constitute the functional matrix that controls plant growth, development and interactions with biotic and abiotic environments. Some of these polymers have a cosmetic or nutraceutical value. Cell-wall polymers of *A. spinosa* leaves and fruit pulp include potentially valuable xyloglucans, galacturonans and pectins.[6–8] However, none of these compounds have yet been commercially exploited. Early phytochemical studies led to the identification of several saponins from *A. spinosa*.[9] The high saponin content of the trees was more recently confirmed.[10–12] Some of these saponins appear to have promising antiviral[13] or antioxidant[14] properties. Their introduction in cosmetic creams has also been commercially investigated.[15] Other metabolites from *A. spinosa* also have potential value in the cosmetic domain, and their industrial use is being actively investigated. In particular, its press-cake – the residue that remains after pressing the kernels – is a rich source of valuable proteins,[16] and its leaves contain high level of flavonoids (mainly quercetin and myricetin derivatives), which have potential uses in cosmetics.[17] The use of *A. spinosa* triterpenes is also being commercially evaluated.[18] Essential oils are also highly valuable derivatives, due to their pharmacological properties.[19–21] Essential oils contained in *A. spinosa* fruit pulp may also be of interest for use as an insect repellent.[22]

However, argan oil is by far the most valuable product derived from the argan tree. Its dietary and medicinal qualities are responsible for argan oil's important position in the oil market. Today, not only is argan oil quoted as 'the world's most expensive oil' but in 2009, it was ranked the number one cosmetic ingredient by Pierce Mattei, an important public relations firm working in the fashion and beauty area. For years, argan forest dwellers have claimed that argan oil is hepatoprotective and choleric, that it prevents diabetes and that it has anti-

inflammatory properties. Edible argan oil is therefore the basis of the ‘amazigh diet’.[23] As a cosmetic, argan oil revitalises the skin, cures acne, hydrates dry skin, makes hair shine and so on. This review presents an overview of argan oil’s medicinal properties as presently understood.

Chemical Constituents and Bioactive Compounds

Glycerides are the main chemical constituents of argan oil (up to 99%). Triglycerides compose not less than 95% of this fraction. The main fatty acids in these triglycerides are oleic and linoleic acids (47 - 1% and 33 - 3%, respectively), and two n-6 (omega-6) fatty acids.[24] There are also small amounts of saturated fatty acids in the triglycerides of argan oil: stearic acid (5.5 -1.5%) and palmitic acid (13.5 -1.5%).[24] For comparison purposes, the fatty acid content of some common and ‘less common’ oils[25,26] is reported in Table 1. Minor components of argan oil include other organic derivatives such as (poly)phenols. Phenolic concentrations are very low,[27] but among those compounds unambiguously identified are vanillic acid, syringic acid, ferulic acid, tyrosol, catechol, resorcinol, (-)-epicatechin and (+)-catechin.[28–30] The presence of caffeic acid and oleuropein has been reported[31] but this finding has never been confirmed.

Squalene, carotenes, triterpene alcohols (butyrospermol, tirucallol, b-amyrine, lupeol, 24-methylene cycloartanol, citrostadienol and cycloeucalenol), sterols (spinasterol, schottenol, stigma-8,22-dien-3b-ol (22*E*, 24*Z*), stigmasta-7,24-28- dien-3b -ol (24*Z*)), and a-, b-, g- and d-tocopherols (13%, 16%, 69% and 2%, respectively)[28,32] are other minor organic components of argan oil. There are also traces of inorganic elements (iron, copper, manganese and lead).[33]

The chemical composition of most of the edible vegetable oils is responsible for their favourable pharmacological profiles.[34] The particularly beneficial and healthful properties

of argan oil have mainly been attributed to its specific polyphenol, squalene and tocopherol content.[28]

Unsaturated fatty acids are involved in several metabolic pathways, including chronic inflammation, a causative factor in a variety of cancers.[35] Although fatty acids belonging to the n-3 series are sometimes presented as the most efficient cardioprotectors, n-6 fatty acids are also essential in the composition of an equilibrated lipid diet.[36] Indeed, oleic acid is directly responsible for the reduction of blood pressure, through regulation of membrane lipid structure[37] and inhibition of the activity of gelatinase A (MMP-2),[38] an enzyme involved in cancer proliferation and Alzheimer's disease.

Moreover, linoleic acid, the second major fatty acid of argan oil, is the metabolic precursor of arachidonic acid and its multiple bioactive eicosanoid derivatives.

Because of their free-radical scavenging and antioxidant properties, phenolic compounds and tocopherols also dramatically contribute to the beneficial pharmacological properties of argan oil. γ -Tocopherol is also known for its role in the primary prevention of heart disease[39] and possibly prostate cancer.[40]

Types of Oil

Traditional argan oil

The traditional process for argan oil extraction has already been reported in detail several times[2,3,32] and therefore will not be presented here. This is the type of oil that has been prepared for centuries by Moroccan women on a family scale.

However, traditionally prepared argan oil chemical composition is poorly reproducible.[3] Such oil is generally of low quality and has a short shelf-life (Table 2).[41] For a single person, 2–2.5 l of oil are obtained from 100 kg of dry fruit after 58 h of work.

Cold-pressed argan oil

To produce large quantities of high-quality argan oil, women's cooperatives have been started in south-western Morocco.[2,42] In these cooperatives, argan oil is prepared by mechanically cold-pressing argan kernels. Using this technology, 4–6 l of oil can be obtained from 100 kg of dry fruit after 13 h of work by a single person.

Edible argan oil is prepared from roasted kernels, whereas unroasted kernels are used in the production of cosmetic argan oil (Table 2). The origin of the fruit and the processing method used dramatically influence the quality of the argan oil produced.[43] Because of this, stringent preparation rules have been implemented in the cooperatives. These include the use of mechanical pressing in place of hand-pressing and mechanical fruit peeling. Also, the use of goat-digested argan nuts has been strictly outlawed, even though such a picking method was never general practice, as has sometimes been stated.[44] The polyphenol and tocopherol content of traditionally extracted and cold-pressed argan oils is similar. Their different shelf life is mainly due to the selection of the argan nuts and the frequent use of water of poor bacteriological quality during the traditional process.

Edible argan oil is also the major constituent of *_Amlou'*, a highly nutritive preparation whose composition also includes large quantities of crushed almonds and honey.

Cosmetic argan oil is directly used for skin application or as a hair lotion. It does not have the hazelnut taste of edible argan oil. Its content of volatile components is lower than that of edible argan oil[45] and its shelf life is also shorter, the latter extending up to 2 years, probably due to the formation during roasting of Maillard compounds, which favour preservation.[46]

Table 1 Percentage of oleic, linoleic, stearic and palmitic acid in common (corn, olive, soybean, sunflower and peanut) and less common (grape seed, argan) oils

Fatty acid	Corn oil	Olive oil	Soybean oil	Sunflower oil	Peanut oil ^a	Grape seed oil	Argan oil
Oleic	20–42.2	55–83	17.7–28	14–39.4	35–69	12–28	43–49.1
Linoleic	34–65.6	3.5–21	49.8–59	48.3–74	12–43	58–78	29.3–36
Stearic	<3.3	<5	2–5.4	2.7–6.5	1–4.5	<3.3	4.3–7.2
Palmitic	8.6–16.5	7.5–20	8–13.5	5–7.6	8–14	8.6–16.5	11.5–15

^a Contains also behenic, arachidic and eicosenoic acids (1.5–4.5%, 1–2% and 0.7–1.7%, respectively).

Solvent-extracted argan oil

Industrially, cosmetic argan oil is prepared by solvent extraction of crushed argan kernels. No quality control is required for argan nuts (Table 2). Solvent-extracted argan oil, which is also sometimes flash distilled and deodorised, is used exclusively in the composition of creams, shampoos and body lotions. Preservatives are frequently added to compensate for the naturally protective agents lost during extraction and/or distillation (tocopherols, polyphenols etc.).

Table 2 Differences between the four argan oil types

	Traditional oil	Cold-pressed edible oil	Cold-pressed cosmetic oil	Industrial cosmetic oil
Material	Uncontrolled fruit , roasted kernels	Hand-picked fruit, roasted kernels	Hand-picked fruit, unroasted kernels	Uncontrolled fruit, unroasted kernels
Process	Hand malaxing	Press	Press	Solvent
Preservation	One to two weeks	Several months	Up to one month	Several months
Colour	Yellow to brown	Copper-like	Gold-like	No colour
Taste	Not reproducible	Hazelnut like	Bitter	Not suitable as food
Quality	Low	Very high	Very high	Very high
Moisture	Variable	Low	Some amount	None
Antioxidants	Variable	High	High	None

Human Health and Argan

Oil Consumption

Argan oil has been used as a food and as a food ingredient, and has been applied to the skin for centuries, therefore its acute and chronic toxicity is assumed to be nil, particularly when orally administered at ordinary doses. Initially, argan oil's pharmacological properties have simply been deduced by consideration of the properties of its constituents, which have been isolated and pharmacologically evaluated, often in simple models. The chemical composition of argan oil has already been reviewed in detail,[32] and this aspect will therefore not be discussed here. Recently, scientific evaluation of the traditionally claimed benefits of argan oil consumption has begun, using animal models or cohort or clinical studies.

These studies (Table 3) were aimed at determining if argan oil has only nutritional properties or if it can be said to also possess pharmacological properties.[65] Nevertheless, the general benefits indicated by some primary results have already triggered the preparation of argan oil-based emulsions for parenteral nutrition.[47]

Table 3 Key papers on the pharmacology of argan oil and their scientific findings

Reference	Keys papers and their scientific findings
Khallouki <i>et al.</i> [28]	Chemical composition of argan oil indicates its potential interest in preventing cancer
Bensouada[47]	Emulsion containing argan oil can be used for parenteral nutrition
Berrougui <i>et al.</i> [48]	Argan oil phenolic extract inhibits low-density lipoprotein oxidation and has hypolipemiant properties
Berrougui <i>et al.</i> [49]	Argan oil has hypolipidemic and hypocholesterolemic effects in rats
Drissi <i>et al.</i> [50]	Argan oil has hypolipemiant and antioxidant properties
Derouiche <i>et al.</i> [51]	Argan oil has an hypolipemiant effect in man
Berrougui <i>et al.</i> [52]	Argan oil lowers blood pressure in rats
Adlouni <i>et al.</i> [53]	Argan oil prevents obesity risk
Cherki <i>et al.</i> [54]	Argan oil presents an antiatherogenic effect in humans
Mekhfi <i>et al.</i> [55]	Argan oil inhibits platelet aggregation but has no influence on bleeding time
Bennani <i>et al.</i> [56]	Argan oil polyphenols and sterols have an antiproliferative effect on human prostate cancer cell lines
Bennani <i>et al.</i> [57]	Argan oil polyphenols have an antiproliferative effect on human prostate cancer cell lines
Drissi <i>et al.</i> [58]	Argan oil tocopherols have an antiproliferative effect on human prostate cancer cell lines

Samane <i>et al.</i> [59]	Argan oil has a potential interest as an antidiabetic
Bnouham <i>et al.</i> [60]	Antidiabetic activity of argan oil is confirmed
Samane <i>et al.</i> [61]	Argan oil is less efficient than fish oil to treat diabetes
Derouiche <i>et al.</i> [62]	Argan oil has no impact on thyroid hormone profile
Benzaria <i>et al.</i> [63]	Argan oil does not influence immune system
Astier <i>et al.</i> [64]	Argan oil triggers allergic reaction

Cancer chemoprotective effects

Because argan and olive oils share a similar composition, the cancer chemoprotective effect attributed to olive oil has also been attributed to argan oil.[28] Argan oil's high levels of γ -tocopherol – by far the most potent antioxidant of the tocopherols – and its high squalene content have even led to a suggestion that its chemoprotective effect may even be greater.[66] Antioxidants present in argan oil[67] are believed to prevent or delay the onset of reactive oxygen species after lipid peroxidation observed in rats or human plasma.[48,49] Specific investigations on prostatic cells have shown that, *in vitro*, argan oil polyphenols and sterols have cytotoxic properties and exert an inhibitory effect on the proliferation of hormone-independent (DU145 and PC3) as well as of hormone-dependent (LNCaP) prostate cancer cell lines. The relative cytotoxic activity of argan oil polyphenols measured by means of the MTT assay indicates IC₅₀ values of 75, 100 and 50 mg/ml for the DU145, LNCaP and PC3 cell lines, respectively.[56] For argan oil sterols, the IC₅₀ values are 25, 75 and 70 mg/ml for the DU145, LNCaP and PC3 cell lines, respectively.[56]

In respect of cell proliferation, the calculated polyphenol concentrations inhibiting cell growth by 50% (GI₅₀) at 24 h, in comparison with 2-methoxyestradiol, were 75, 100 and 50 mg/ml for the DU145, LNCaP and PC3 cell lines, respectively.[56] The sterol GI₅₀s, in the same conditions, were 25, 75 and 70 mg/ml for the DU145, LNCaP and PC3 cell lines,

respectively.[56] On the canine prostate cancer epithelial cell line (DPC-1), argan oil polyphenols showed a dose-dependent antiproliferative effect at an IC₅₀ of 10 mg/ml.[57]

However, only a weak antiproliferative effect was observed when argan oil polyphenols were evaluated on the SV40- immortalised human prostate epithelial cell line PNT1A.[57]

A cell cycle arrest mediated by up-regulation of the P27 cell cycle regulatory protein may explain the observed physiological activity of the tocopherols.[58] Large-scale epidemiologic studies using a γ -tocopherol-enriched diet have confirmed the beneficial effects of γ -tocopherol on prostate cancer prevention in humans.[40] Consequently, these results have encouraged the study of the antiproliferative effects of the polyphenol and sterol fractions of argan oil.

Inhibition of several enzymes, including ornithin decarboxylase, an enzyme highly expressed in prostate cancer, and NO synthase, or of the autophosphorylation of the epithelial growth factor receptor could explain the observed antiproliferative activity.[68] In an independent study, the antiproliferative effect of the squalene and polyphenol-rich unsaponifiable extract of argan oil on two cell lines (human HT-1080 fibrosarcoma and the transformed and invasive MSV-MDCK-inv cells) was clearly evidenced.[59] Using hepatoma tissue culture cells, it was shown that the squalene and polyphenol-rich extract of argan oil reduces the ability of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) to respond to increasing doses of insulin.[59] Conversely, the response of the serine/threonine kinase (Akt), whose major function is to promote growth-factor-mediated cell survival and to block apoptosis response, remained undisturbed.

Further in-vitro studies showed that argan oil polyphenols specifically interrupt the insulin-signalling cascades at the MEK1/2-ERK1/2 interface.[59]

Prevention of obesity and adverse cardiovascular outcomes

Hypercholesterolemia and platelet hyperactivity are associated with an increased risk of adverse cardiovascular outcomes (coronary artery disease, hypertension etc.). Phenolic compounds, phytosterols and tocopherols are well known as efficient hypocholesterolemic agents. Not surprisingly, argan oil's phenolic fraction prevents low-density lipoprotein (LDL) oxidation in isolated human plasma.[48] Phenolic compounds also enhance reverse cholesterol transport by increasing highdensity lipoprotein (HDL) lipid-bilayer fluidity.[48] The presence of these derivatives is therefore commonly used to explain the anti-atherogenic potential of argan oil.[48] Initially evidenced on rats,[49,52] the hypolipidemic and hypocholesterolemic potency of argan oil in humans has been demonstrated by mean of a cohort study on 60 men.[54] The effect was shown to be due to a paraoxonase-related improvement of the plasma oxidative status. The anti-atherogenic properties of argan oil have been evidenced by significant increases in paraoxonase activity and a decrease in lipoperoxide and conjugated diene formation.[54] Other complex pathways, initially resulting from an intracellular accumulation of squalene and ultimately triggering the liver X receptors,[69] may also explain argan oil's anti-atherogenic effects. A series of nutritional interventions has also shown that argan oil induces a lowering of LDL cholesterol and has antioxidant properties, as shown by a cohort study of 96 persons.[50] Here, subjects consuming argan oil on a regular basis presented significantly lower levels of plasma LDL cholesterol and lipoprotein (a) and lower concentrations of plasma lipoperoxides.[50] Argan oil also increases HDL cholesterol levels and lowers triglyceride levels in men,[51] therefore, and as might be expected, regular argan oil consumption has the potential to prevent obesity.[53]

Argan oil also inhibits platelet aggregation without causing either prolongation of bleeding time or a change in platelet levels. [55] *In vitro*, an inhibition of thrombin- or epinephrininduced aggregation up to 50% was obtained at a dose of 0.5% of argan oil.[55]

When rats were orally treated for 4 weeks with 10 ml/kg/day of argan oil, the thrombin-induced aggregation of isolated platelets was significantly inhibited (36%).[55]

However, bleeding time remained unchanged,[55] therefore argan oil may act on the attachment of fibrinogen to GPIIb/IIIa platelet receptor without affecting the adhesiveness of platelets to the vascular endothelium.[55] Together, these studies have led to argan oil consumption being recommended for the reduction of cardiovascular risk and the prevention of obesity, as has been traditionally claimed.[70]

Influence on thyroid hormone profile

Thyroid hormones and fatty acid metabolism are closely related. Unsaturated fatty acids have been shown to possibly prevent hypothyroidism.[71] The thyroidic activity of argan oil has been evaluated in a cohort study performed on 149 euthyroidic volunteers consuming non-iodised salt by measuring plasmatic concentrations of free tri-iodothyronine (FT3), tetra-iodothyronine (FT4) and thyroid stimulating hormone.

This study evidenced that no activity on hypothyroidism could be expected from argan oil dietary supplementation.[62]

Antidiabetic activity

The cardiovascular protective and antidiabetic effects of argan oil are the most longstanding claimed pharmacological effects of argan oil.[3] So far, however, the only scientific demonstration of a possible antidiabetic activity has been in rats.[60] Oral glucose test tolerance was performed on healthy or streptozotocin-induced diabetic rats. Intraperitoneal administration of argan oil (2.5 ml/kg) 30 min before oral glucose loading (1 g/kg) induced a significant glycemia reduction that lasted for 3 h.[60] Argan oil also significantly reduced the amount of absorbed glucose in perfused jejunum segment.[60] Samane *et al.* compared the metabolic response of rats to a free-access high-fat/high-sucrose diet in which 6% of the fat was replaced either by argan oil or fish oil. Intake of argan and fish oil resulted in the

restoration of insulin signalling in fat and liver but fish oil also restored systemic insulin sensitivity.[61]

Influence on the immune system

Recent biochemical studies have shown that fatty acids may modify immune responses.[72] Indeed, lymphocyte proliferation, lymphocyte-derived cytokine production and cell-mediated immunity can all be influenced by dietary lipids.

The effect of dietary argan oil on the immune system has been evaluated on rats.[63] These studies concluded that argan and olive oil's effects on immune cells are similar, and that argan oil has no marked effects on immune cell function.[63]

Anaphylaxis properties

The first, and so far unique, case of an allergy to argan oil has recently been presented.[64] Allergen was characterised as a 10 kDa protein, probably belonging to the family of oleosins that is also encountered in peanut and sesame.

Argan Oil Versus Other Edible Oils

The quality of an edible oil can be reflected in different factors. Among these, the most important are its sensory quality, its nutritional value and its pharmacological effect. If the sensory quality is important to get consumer acceptance and hence to occupy a reasonable market share, nutritional and pharmacological qualities are essential from a dietary standpoint.

In evaluating the nutritional quality of oil, fatty acid composition occupies a special place. More particularly, (poly)unsaturated fatty acids are essential nutrients, for they are the biological precursors of leukotrienes and prostaglandins, two types of compounds acting as hormone-like cell messengers.

However, the simple presence of a high amount of linoleic acid does not necessarily imply an oil of high nutritional value, as reported for grape seed oil.[73]

Olive oil is oleic acid-rich (Table 1). It is a globally used edible oil that is considered to be a key ingredient in the Mediterranean diet. Hence, its nutritional quality is recognized as high,[74] as are its unique biological properties.[75] Olive and argan oil contain high levels of oleic acid, with linoleic acid as the second major unsaturated fatty acid of each oil. The saturated fatty acids of both oils are palmitic and stearic acids, therefore the general nutritional qualities of olive and argan oils are likely to be identical. If only average values are considered, olive oil contains statistically higher values of monounsaturated fatty acid than argan oil.

Argan oil is therefore nutritionally close to peanut oil, even though the latter contains small amounts of arachidic and behenic acids, saturated fatty acids that are not found in argan oil.[26] Nevertheless, this type of classification relies only on statistical analysis. The major difference between argan and olive oil is the large chemical variability tolerated for olive oil. Indeed, olive oil is produced in the whole Mediterranean basin and, because of its multiple geographic origins, olive oil fatty acid composition varies greatly. For example, its composition in linoleic acid can be either 3.5 or 21% and its level of oleic acid can be up to 83% but can be as low as 55%. Since consumers are not necessarily aware of the geographical origin of the olive oil they purchase, they cannot be certain of the precise nutritional value of any particular olive oil. In contrast, argan oil fatty acid composition is much more homogenous and, consequently, its nutritional value is less variable.

Variation in the geographic origin of edible oils also dramatically affects the proportions of the minor oil components. These oils also contribute to the pharmacological quality of the oil. Several of olive oil's minor components (polyphenols, sterols, tocopherols etc.) have been presented as responsible for the oil's pharmacological properties,[75] but large variations have also been observed in terms of concentration, suggesting that not all olive oils have the

same pharmacological potential.[76] Again, the minor component profile of argan oil has little variation and is likely to be responsible for a more reproducible pharmacological profile.

Argan Oil as a Food Supplement

Argan oil's specific taste and its claimed pharmacological properties are at the origin of the culinary and medicinal interest directed at this oil in the last 10 years. The benefits for the elderly of a long-term diet rich in argan oil are currently being evaluated. Even slightly encouraging results could rapidly lead to argan oil gaining a place in the lucrative food supplement field.

However, quality matters could prevent this happening. Because of the elevated price of argan oil and since there are many other vegetable oils on the market, adulteration of argan oil is a risk. To prevent this fraudulent behaviour, simple analytical methods have been designed to unambiguously distinguish argan oil from other oils, based on the presence of a marker in low quantity oils.[77] Argan oil's recently granted status as a product of protected geographic indication is also going to be an efficient means to control its sensory, nutritional and pharmacological quality. Processing parameters as simple as argan kernel storage conditions influence oil quality and levels of minor components,[78] therefore each processing parameter is currently being investigated. Optimum parameters will become mandatory after inclusion in the geographic indication file in order to maintain argan oil's chemical and pharmacological quality.

Conclusions

This review shows that while the chemistry and a few pharmacological aspects of argan oil have been studied, there are still no strong clinical data available that provide evidence of the efficacy of argan oil in humans. That argan oil constituents have pharmacological properties *in vitro* is not sufficient to ascertain the clinical potential of whole argan oil. More studies are necessary to determine its impact on human health.

Considering the elevated price of argan oil, these studies should be aimed at demonstrating the intrinsic as well as relative efficacy of argan oil compared to other oils. Interestingly, the position of argan oil as a natural product with strong consumer expectations resulting from traditional claims of activity that are insufficiently supported by scientific proof is shared by several other plant extracts or products.[79,80] Such a trend is likely to continue in view of the strong current demand for food supplements. This demand justifies pharmacological studies on these products.

Declarations

Conflict of interest

The Author(s) declare(s) that they have no conflicts of interest to disclose.

Funding

This review received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

References

1. Matthäus B, Spener F. What we known and what we should know about virgin oils-A general introduction. *Eur J Lipid Sci Technol* 2008; 110: 597–601.
2. Charrouf Z, Guillaume D. The rebirth of the argan tree or how to give a future to Amazigh women. In: Harpelle RL, Muirhead B, eds. *Long-Term Solutions for a Short-Term World: Canada and Research Development*. Waterloo: WLU Press, 2010, ISBN 13: 978-1-55458-223-5.
3. Charrouf Z *et al.* [The argan tree, an asset for Morocco]. *Biofutur* 2002; 220: 54–57
4. Charrouf Z *et al.* Enhancing the value of argan oil is the best mean to sustain the argan grove economy and biodiversity, so far. *Oléag Corps Gras Lipides* 2008; 15: 269–271.
5. Charrouf Z, Guillaume D. Sustainable development in Northern Africa: the argan forest case. *Sustainability* 2009; 1: 1012–1022.
6. Aboughe-Angone S *et al.* Cell wall carbohydrates from fruit pulp of *Argania spinosa*: structural analysis of pectin and xyloglucan polysaccharides. *Carbohydr Res* 2008; 343: 67–72.
7. Habibi Y *et al.* Isolation and charaterization of xylans from seed pericarp of *Argania spinosa*. *Carbohydr Res* 2006; 340: 1431– 1436.

8. Ray B *et al.* Structural investigation of hemicellulosic polysaccharides from *Argania spinosa*: characterization of a novel xyloglucan motif. *Carbohydr Res* 2004; 339: 201–208.
9. Charrouf Z *et al.* Triterpenoid saponins from *Argania spinosa*. *Phytochemistry* 1992; 31: 2079–2086.
10. Oulad-Ali A *et al.* Structure elucidation of three triterpene glycosides from the trunk of *Argania spinosa*. *J Nat Prod* 1996; 59: 193–195.
11. Guillaume D, Charrouf Z. [Saponines et métabolites secondaires de l'arganier (*Argania spinosa*): état des connaissances]. *Cah Agric* 2005; 15: 509–516 [in French].
12. El Fakhar N *et al.* New triterpenoid saponins from *Argania spinosa*. *J Nat Med* 2007; 61: 375–380.
13. Gosse B *et al.* Antiviral saponins from *Tieghemella heckelii*. *J Nat Prod* 2002; 65: 1942–1944.
14. Amzal H *et al.* Protective effect of saponins from *Argania spinosa* against free radical-induced oxidative haemolysis. *Fitoterapia* 2008; 79: 337–344.
15. Henry F *et al.* Use of an extract from the plant *Argania spinosa*. Patent US 2006/0083794 A1, 2006.
16. Pauly G *et al.* Cosmetic and/or dermatopharmaceutical preparations containing native proteins from the plant *Argania spinosa*. Patent US 2004/42996 A1, 2004.
17. Pauly G *et al.* Cosmetic and/or dermatopharmaceutical preparations containing leaf extract of the plant *Argania spinosa*. Patent US 7,105,184 B2, 2006.
18. Henry F *et al.* Composition containing a plant extract and process for producing same. Patent US 2007/0281047 A1, 2007.
19. De Menezes IAC *et al.* Cardiovascular effects induced by *Cymbopogon winterianus* essential oil in rats: involvement of calcium channels and vagal pathway. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62: 215–221.
20. Koch C *et al.* Efficacy of anise oil, dwarf-pine oil and chamomile oil against thymidine-kinase-positive and thymidinekinase- negative herpesviruses. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60: 1545–1550.
21. Sousa OV *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60: 771–777.
22. Harhar H *et al.* Composition of the essential oil of *Argania spinosa* (Sapotaceae) fruit pulp. *Nat Prod Commun* 2010; 5: 935–936.
23. Charrouf Z, Guillaume D. Should the amazigh diet (regular and moderate argan-oil consumption) have a beneficial impact on human health? *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010; 50: 473–477.
24. Charrouf Z, Guillaume D. Ethnoeconomical, ethnomedical and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *J Ethnopharmacol* 1999; 67: 7–14.

25. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, Joint FAO/WHO Food Standards Programme: Codex Alimentarius Commission. In: *Codex Alimentarius Volume 8, Fats, Oils and Related Products*, 2nd edn. Codex Standard for named Vegetable Oils Codex-STAN 210 (Amended 2003, 2005). Rome, WHO, 1993: 1–16.
26. Dubois V *et al.* Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regards to their nutritional potential. *Eur J Lipid Sci Technol* 2007; 109: 710–732.
27. Mouhajir F *et al.* Phenolics in moroccan medicinal plant species as studied by electron spin resonance spectroscopy. *Pharm Biol* 2001; 39: 391–398.
28. Khallouki F *et al.* Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12: 67–75.
29. Rojas LB *et al.* Colorimetric evaluation of phenolic content and GC-MS characterization of phenolic composition of alimentary and cosmetic argan oil and press cake. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 9122–9127.
30. Charrouf Z, Guillaume D. Phenols and polyphenols from *Argania spinosa*. *Am J Food Technol* 2007; 2: 679–683.
31. Chimi H *et al.* Etude de la fraction phénolique des huiles d'olive vierge et d'argan du Maroc. *Actes Inst Agron Vét* 1998; 8: 17–21.
32. Charrouf Z, Guillaume D. Argan oil: occurrence, composition and impact on human health. *Eur J Lipid Sci* 2008; 110: 632–636.
33. Marfil R *et al.* Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil: influence of the extraction method. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 7279–7284.
34. Foster R *et al.* Culinary oils and their health effects. *Nutr Bull* 2009; 34: 4–47.
35. Blouin JM *et al.* [Effet des acides gras sur l'inflammation et le cancer]. *Oléag Corps Gras Lipides* 2006; 13: 331–336 [in French].
36. Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol* 2009; 77: 937–946.
37. Terés S *et al.* Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proc Natl Acad Soc USA* 2008; 105: 13811–13816.
38. Emonard H *et al.* Inhibition of gelatinase by oleic acid. *Ann NY Acad Sci* 1999; 878: 647–649.
39. Dietrich M *et al.* Does α -tocopherol play a role in primary prevention of heart disease and cancer? A review. *J Am Coll Nutr* 2006; 25: 292–299.
40. Wright ME *et al.* Supplemental and dietary vitamin E intakes and risk of prostate cancer in a large prospective study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 1128–1135.

41. Matthäus B *et al.* Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food chem* 2010; 120: 426–432.
42. Charrouf Z, Guillaume D. Argan oil, functional food, and the sustainable development of the argan forest. *Nat Prod Commun* 2008; 3: 283–288.
43. Hilali M *et al.* Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 2081–2087.
44. Marcone MF. Characterization of the edible bird's nest the 'caviar of the east'. *Food Res Internat* 2005; 38: 1125–1134.
45. Charrouf Z *et al.* Influence of roasting and seed collection on argan oil odorant composition. *Nat Prod Commun* 2006; 1: 399–404.
46. Gharby S *et al.* Oxidative stability of edible argan oil: a two year-study. *LWT-Food Sci Technol* 2010 (in press) doi:10.1016/j.lwt.2010.07.003.
47. Bensouada Y. Formulation of argan-oil based lipid emulsion for parenteral nutrition. Patent WO/2008/002116, 2008.
48. Berrougui H *et al.* Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from THP-1 macrophages. *Atherosclerosis* 2006; 184: 389–396.
49. Berrougui H *et al.* Hypolipidemic and hypocholesterolemic effects of argan oil (*Argania spinosa* L.) in *Meriones shawi* rats. *J Ethnopharmacol* 2003; 89: 15–18.
50. Drissi A *et al.* Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clin Nutr* 2004; 23: 1159–1166.
51. Derouiche A *et al.* Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Ann Nutr Metab* 2005; 49: 196–201.
52. Berrougui H *et al.* Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr* 2004; 92: 921–929.
53. Adlouni A *et al.* The nutritional benefits of argan oil in obesity risk prevention. *Atheroscler Suppl* 2008; 9: 137–138.
54. Cherki M *et al.* Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 15: 352–360.
55. Mekhfi H *et al.* Effect of argan oil on platelet aggregation and bleeding time: a beneficial nutritional property. *J Compl Integr Med* 2008; 5: 18.
56. Bennani H *et al.* Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev* 2007; 31: 64–69.
57. Bennani H *et al.* [Impact of argan oil on prostate cancer antiproliferative effect: study of polyphenols]. *Rev Franco Lab* 2009; 416: 23–26 [in French].

58. Drissi A *et al.* Tocopherols and saponins derived from *Argania spinosa* exert an antiproliferative effect on human prostate cancer. *Cancer Invest* 2006; 24: 588–592.
59. Samane S *et al.* Insulin-sensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seed extracts. *Evid-based Compl Alt Med* 2006; 3: 317–327.
60. Bnouham M *et al.* Antidiabetic activity assessment of *Argania spinosa* Oil. *J Complement Integr Med* 2008; 5: 32.
61. Samane S *et al.* Fish oil and argan oil intake differently modulate insulin resistance and glucose intolerance in a rat model of dietary-induced obesity. *Metabolism* 2009; 58: 909–919.
62. Derouiche A *et al.* Hormones thyroïdiennes et bilan lipidique de deux populations du sud marocain consommatrices de l’huile d’argan et du sel non iodé. *Biol Santé* 2005; 5: 185–192.
63. Benzaria A *et al.* Effect of dietary argan oil on fatty acid composition, proliferation, and phospholipase D activity of rat thymocytes. *Nutrition* 2006; 22: 628–637.
64. Astier C *et al.* Anaphylaxis to argan oil. *Allergy* 2010; 65: 662– 663.
65. Adlouni A. [Argan oil: from nutrition to health]. *Phytothérapie* 2010; 8: 8–97 [in French].
66. Hübner J, Micke O. [Extra-european phytotherapeutics in oncology-part 1]. *Onkologe* 2009; 15: 302–310. [in German].
67. Khallouki F *et al.* Thermal stability and long-chain fatty acid positional distribution on glycerol of argan oil. *Food Chem* 2008; 110: 57–61.
68. Bennani H. Quel impact de l’huile d’argan sur le cancer de la prostate? *Technol Lab* 2007; 6: 8–10.
69. Joseph SB *et al.* Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7604–7609.
70. Cherki M *et al.* Argan oil: which benefits on cardiovascular diseases? *Pharmacol Res* 2006; 54: 1–5.
71. Makino M *et al.* Effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester on hypothyroid function. *J Endocrinol* 2001; 171: 259–265.
72. Yaqqob P. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications. *Proc Nutr Soc* 2004; 63: 89–104.
73. Matthäus B. Virgin grape seed oil: is it really a nutritional highlight? *Eur J Lipid Sci Technol* 2008; 110: 645–650.
74. Garcia-Gonzalez DL *et al.* Virgin olive oil – chemical implications on quality and health. *Eur J Lipid Sci Technol* 2008; 110: 602–607.
75. Pauwels EKJ, Covas MI. The Mediterranean diet, Part 1: the anticancer effect of olive oil. *Drugs Future* 2009; 34: 307–313.

76. Medina E *et al.* Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 4954–4961.
77. Hilali M *et al.* Detection of argan oil adulteration using campesterol GC-analysis. *J Am Oil Chem Soc* 2007; 84: 761–764.
78. Harhar H *et al.* Effect of argan kernel storage conditions on argan oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol* 2010 112: 915–920.
79. Obolskiy D *et al.* *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. *Phytother Res* 2009; 23: 1047–1065.
80. Napimoga NH *et al.* Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. *J Pharm Pharmacol* 2010; 62: 809–820.

Chapitre II

Les polyphénols du fruit de l'arganier

I- INTRODUCTION

L'appellation « polyphénols » ou « composés phénoliques » englobe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules divisées en une dizaine de classes chimiques présentant au moins un cycle aromatique à 6 carbones porteur de plusieurs fonctions hydroxyles (OH).

Les polyphénols sont des métabolites secondaires synthétisés par l'ensemble des végétaux. Ils sont présents dans les vacuoles des tissus, participent aux réactions de défense face à différents stress biotiques ou abiotiques (pathogènes, rayonnements UV...) et contribuent à la qualité organoleptique des aliments issus des végétaux (couleur, astringence, arôme, amertume...). Leur répartition tant qualitative que quantitative dans la plante varie selon les espèces, les organes, les tissus ou encore les différents stades de développement. Ils se caractérisent par la présence de groupements phénoliques dans leur structure (Kühnau 1976). Les plantes consommées par l'homme fournissent plus de 8000 composés phénoliques classés en différentes familles selon la nature de leur squelette carboné.

Les polyphénols présentent une grande diversité de structures, ils sont divisés en flavonoïdes et non flavonoïdes. La classe des non flavonoïdes, est représentée par les acides phénoliques et stilbènes. La classe des flavonoïdes est basée sur un squelette en C6-C3-C6. Elle comprend plusieurs groupes qui se distinguent par le degré d'oxydation de l'hétérocycle central en C3. Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants de notre alimentation et plus de 4000 composés ont pu être identifiés (D'Archivio et al. 2007) (schéma 1).

Les polyphénols limitent l'oxydation des structures cellulaires par piégeage des radicaux libres, ils peuvent également agir en modulant l'expression et l'activité des systèmes de défense enzymatiques (Ashokkumar et al. 2008).

De nombreux travaux attribuent aux polyphénols un effet bénéfique sur la santé. Ils sont ainsi capables de protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres (Zheng et al. 2010 ; Sies, H 2010), ils peuvent également prévenir l'athérosclérose, les maladies dégénératives (Del Rio et al. 2010), et la progression du cancer (Clement, 2009 ; Kar et al. 2006). Les polyphénols sont susceptibles d'être dotés d'autres propriétés pharmacologiques (Núñez et al. 2008): antibactériennes, anti-inflammatoires, vasodilatatrices, anti-thrombiques,

anti-athérogéniques, anti-pyrétiques, analgésiques et antioxydantes (Gómez et al. 2006 ; Muanda et al. 2009).

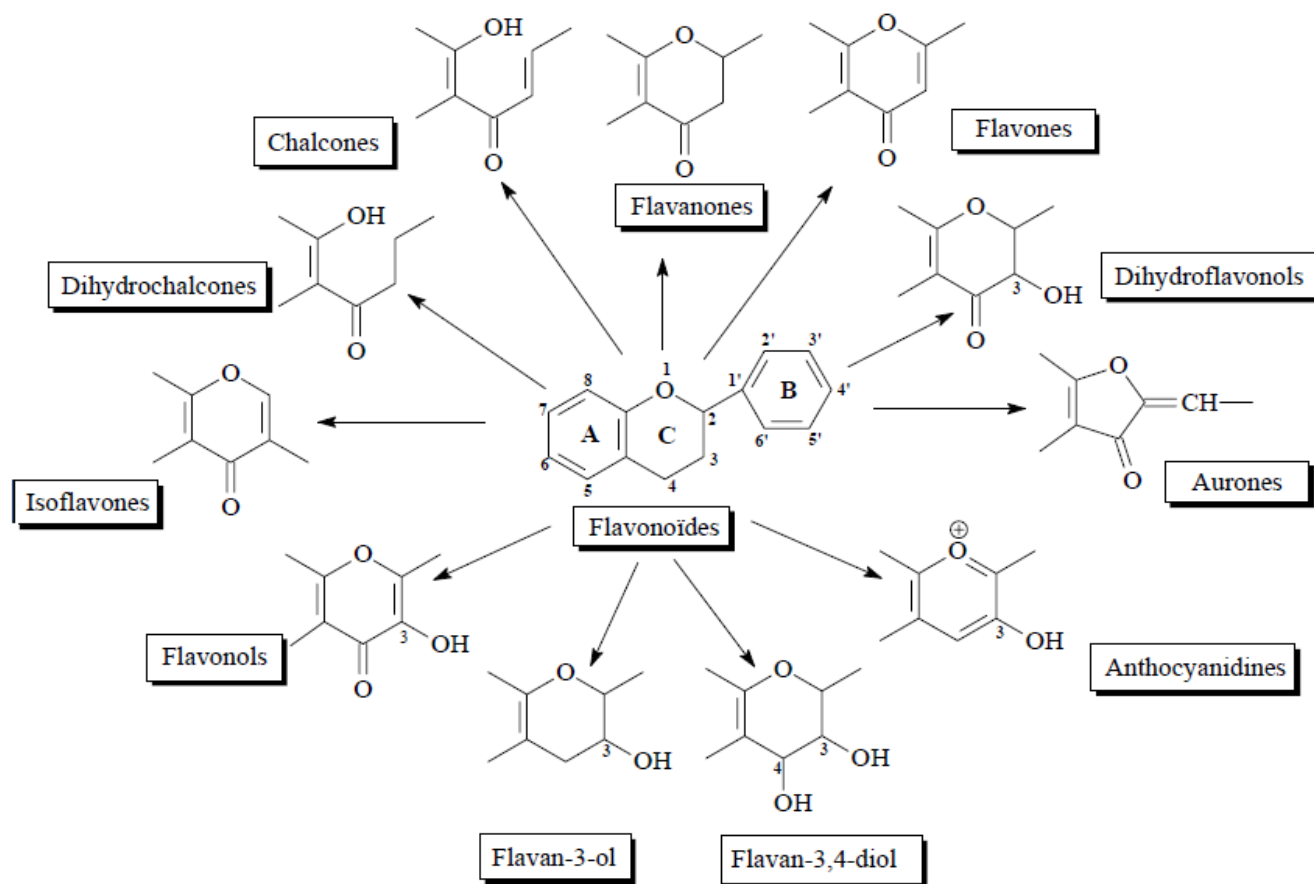


Schéma 1: Représentation des principaux groupes de flavonoïdes

Les propriétés antioxydantes des polyphénols varient en fonction de leur structure chimique, de ce fait les positions et degrés d'hydroxylation jouent une part importante dans l'activité antioxydante des polyphénols.

L'activité antioxydante des polyphénols se détermine *in vitro* par mesure de la capacité de piégeage des radicaux libres et de réduction de certains composés chimiques. Les données obtenues sont comparées à des composés de référence comme le Trolox (dérivé hydrosoluble de la vitamine E), l'acide gallique ou la catéchine.

Les polyphénols sont des molécules naturelles dotées de nombreuses propriétés physiologiques. Afin de valoriser le fruit et les sous produits de l'arganier, il semble particulièrement intéressant d'étudier la nature des polyphénols de cette plante et éventuellement de tenter de les valoriser.

Plusieurs études se sont intéressées à l'identification des polyphénols de la pulpe de fruit de l'arganier. Chernane et *al* (1999) a pu identifier quatre composés phénoliques (catéchine, épicatechine, rutine, et l'acide p-hydroxybenzoïque). Charrouf et *al* (2007) ont pu également séparer et identifier des principaux composés phénoliques présents dans la pulpe du fruit de l'arganier par LC-MS. Seize composés phénoliques ont été identifiés. Les acides phénoliques sont constitués par l'acide gallique (5%) et l'acide protocatéchique (21,1%). Ces derniers sont plus dominants que les flavonoïdes. Parmi les flavonoïdes-O-rhamnoglucosides on retrouve essentiellement l'isorhoifoline (7,2%) et l'hespéridine (4,5%). En revanche, la rutine (0,1%) et la rhamnétine-O-rutinoside (0,5%) sont peu abondants. Les flavonoïdes-O-glycosides sont représentés majoritairement par l'hypéroside (13,4%) et l'isoquercétine (10%). La naringénine-7-O-glucoside constitue le composé minoritaire de ce type de flavonoïde. Le pourcentage de naringénine-7-O-glucoside et quercétine- 3-O-arabinose est de 15,3%. D'autres composés phénoliques dans la pulpe de l'arganier sont présents : catéchine (2,8%), épicatechine (14,7%), procyanidine (2,7%), quercétine (1,6%), lutéoline (0,2%) et naringénine (0,07%). L'épicatechine constitue le composé le plus abondant dans la pulpe du fruit de l'arganier après l'acide protocatéchique (21,1%).

La pulpe des fruits de l'arganier est riche en épicatechine et d'autres dérivés catéchiques dont le pouvoir antioxydant naturel est important d'après de nombreuses études.

La teneur en composés phénoliques de l'huile d'argane et les tourteaux à visée alimentaire et cosmétique, a été évaluée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Leur composition phénolique a été analysée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC /MS) après extraction avec le mélange méthanol et eau 80:20 (v/v) et silylation. Dix-neuf phénols simples ont été détectés, seize pour le tourteau, six dans l'huile alimentaire, et sept dans l'huile cosmétique. Parmi les composés identifiés on retrouve, la 3-hydroxy pyridine (3-pyridinol), la 6-méthyl-3-hydroxypyridine, le catéchol, le résorcinol, l'alcool 4-hydroxybenzylique, la vanilline, l'acide 4-hydroxyphénylacétique, l'alcool

vanillique, l'alcool 3,4-dihydroxybenzyle, le 4-hydroxy-3-méthoxyphénéthyle alcool, hydroxytyrosol, l'acide protocatéchique, l'épicatéchine et la catéchine (Rojas et *al* 2005).

Ces études phytochimiques préliminaires sur les différentes parties de l'arganier ou sous-produits, ont permis d'identifier les polyphénols dans la pulpe et le tourteau. Cependant leur quantification n'a jamais été rapportée.

L'objectif de ce travail est d'identifier et de quantifier sur le même lot du fruit la teneur en composés phénoliques de la coque, de la pulpe du fruit, des amandons torréfiées et non torréfiées et les tourteaux, par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode ionisation électrospray (HPLC-ESI-MS). Par ailleurs et afin de valoriser ces composés en cosmétique et/ou pharmacologique, l'activité antioxydante et l'activité de piégeage des radicaux libres ont été évalués par les dosages d'ABTS et le DPPH respectivement.

II- ARTICLE 2

Analysis and antioxidant capacity of the phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa* (L.) Skeels)

Hanae El Monfalouti^{1,2}, Zoubida Charrouf¹, Simona Belviso³, Daniela Ghirardello³, Bernardo Scursatone³, Dominique Guillaume², Clément Denhez², Giuseppe Zeppa³

1 Université Mohammed V-Agdal, Laboratoire de Chimie des Plantes, Faculté des Sciences, BP 1014, Rabat, Morocco

2 Université de Reims Champagne Ardenne, Laboratoire de Chimie Thérapeutique, 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France

3 Department of Valorization and Exploitation of Agroforestry Resources, Food Microbiology and Technology Sector, University of Turin, Via Leonardo da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco (TO), Italy.

Correspondence: Dominique Guillaume, UFR Médecine-Pharmacie, 51 Rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France. Tel: + 33 326918473. Fax: +33 326918029
E-mail: dominique.guillaume@univ-reims.fr

Keywords: argan tree fruit, argan oil byproduct, polyphenol, antioxidant, HPLC-ESI-MS

© 2011 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Received: June 16, 2011 / Revised: July 15, 2011 / Accepted: August 16, 2011

DOI: 10.1002/ejlt.201100209

Abstract

Polyphenol composition of the shell, pulp, roasted, and unroasted kernels of the argan fruit was qualitatively and quantitatively determined by HPLC coupled with electrospray negative ionization ion trap mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). Eleven phenolic compounds were identified.

Unroasted kernels and shell contained various polyphenols but the pulp was characterized by a very high amount of total polyphenols (75.78 mg of gallic acid equivalent/g). The radical scavenging (DPPH• method) and antioxidant activity (ABTS method) of each fruit part was also determined.

Argan fruit pulp showed the highest radical scavenging activity (0.17 ± 0.005 μ M Trolox equivalent/mg) and antioxidant activity (0.375 ± 0.07 μ M Trolox equivalent/mg). Therefore,

argan fruit polyphenols are good candidates to be exploited as health supplements and nutraceuticals.

1 Introduction

The argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) of the Sapotaceae family exclusively grows in south-western Morocco where it covers an area of about 320,000 square miles and plays an essential function for the sustainable development of this part of the world [1]. Fresh argan fruit is composed of latex-rich sticky pulp that covers a big stone where two or three kernels are located. When the fruit is dry, it can be peeled by scratching and its black pulp can be collected. Kernels of argan fruit are used for the preparation of argan oil, the basic ingredient of the amazigh diet [2]. Traditionally, argan oil is prepared by argan forest dwellers who manually collect then pulp argan fruit to get argan nuts whose shell is subsequently broken. Resulting argan kernels are amassed, then eventually roasted, then mechanically cold-pressed to afford virgin argan oil of beauty (unroasted kernels) or edible (roasted kernels) grade. Each oil type possesses its own set of pharmacological properties [3, 4]. Since 2010, annual argan oil production has exceeded 5,000 tons. By-products generated during the oil preparative process are the nut-shell, the fruit pulp and the press-cake. Two types of press cake exist because kernels can be roasted or not. For the moment, fruit pulp and press-cakes that are palatable to cattle are used as cheap protein-rich material in all animal farms; the shell is generally simply recycled as fuel.

Polyphenols are highly valuable natural products [5]. They are able to protect cells from the damage caused by free radicals [6, 7]. They could also prevent atherosclerosis, cancer progression [8, 9], or pathogen development [10]. They are likely to be endowed with numerous other pharmacological properties [11]. Not surprisingly, argan oil polyphenols are suspected to possess valuable therapeutic properties [12] and argan oil polyphenols have received special attention lately [13, 14]. Furthermore, a preparation composed of a crude

flavonoid extract from argan leaves is currently marketed as preserving the skin against premature ageing [15]. Therefore, studying polyphenol content in argan oil by-product appears particularly appealing to further support, and possibly reinforce the sustainable development of the argan forest.

Several phytochemical studies on argan tree parts or byproducts have already been carried out with particular attention to the polyphenols [16-22]. However, most of these studies were preliminary or only analytical and detailed quantification of polyphenol content in the different parts of argan material has never been reported. Furthermore, since those independent analyses were carried out on different material using different techniques, result comparison is almost impossible.

Consequently, the true industrial potential of argan polyphenols remains still unknown. The purpose of this work was to identify and quantify on the same fruit batch the non-acidic phenolic content of the argan-nut shell, argan-fruit pulp, roasted and unroasted kernels and derived press-cake, by high performance liquid chromatography technique coupled with electrospray ionization mass spectrometry (HPLC–ESI–MS). The antioxidant activity and radical scavenging capacity of these plant parts were evaluated with ABTS and DPPH• assays; respectively.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals

Standards of apigenin, (+)-catechin hydrate, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin gallate, (-)-epigallocatechin gallate, fisetin, (-)-gallocatechin gallate, hesperidin, hyperoside, isoquercitrin, luteolin, naringin, naringenin, myricetin, phloridzin, procyanidin B1, procyanidin B2, quercetin, quercitrin, and rutin were purchased from Sigma-Aldrich (Milan,

Italy), as were 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), potassium persulfate, Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), and formic acid. 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), Folin-Ciocalteu reagent, and gallic acid were purchased from Fluka Chemicals (Milan, Italy). Acetone, methanol, *n*-hexane and ethanol were of analytical or higher grade and purchased from Fluka Chemicals (Milan, Italy). Aqueous solutions were prepared using ultra-pure water produced with a Milli-Q System (Millipore, Milan, Italy).

2.2 Sample preparation

Argan fruit was collected in Ait Baha (Chtouka-Ait Baha, Morocco) in the summer of 2009. After harvest, fruit was dried and pulped. Resulting nuts were manually broken to separate argan shell from kernels. Approximately one half of the kernels was roasted for 30 minutes at 110°C using a mechanical roaster whose temperature was controlled using a Testo 945 sensor/thermometer (Testo, Casablanca, Morocco). Roasted and unroasted kernels were separately mechanically pressed using Komet DD 85 G presses (IBG Monforts Oekotec GmbH, Mönchengladbach, Germany) affording the two types of press-cake.

2.3 Preparation of samples

Shell, pulp, roasted and unroasted kernels and press-cake were separately frozen in liquid nitrogen, ground in a high-speed hammer mill (IKA A11 Basic, Germany) and individually defatted for 6 h with *n*-hexane in a Soxhlet apparatus. The resulting dough was dried in a rotary evaporator (Büchi R-210 Flawil, Switzerland) under vacuum for 30 min at 45°C to afford a powder that was extracted by adapting the method of Xu and Chang [23] with slight modifications. Briefly, 1 g of powder was placed in a 50 ml test tube containing 10 ml of a fresh mixture of acetone/water/formic acid (70:29.5:0.5, v/v/v). The suspension was shaken on an orbital shaker at room temperature for 3 h then centrifuged. The supernatant was

collected in an amber vial and stored at + 4°C. The residue was re-extracted for additional 12 h and extracts were combined. Acetone was evaporated under a nitrogen flux with stirring. Solutions were diluted to 5 ml with methanol/water/formic acid (50:49:1, v/v/v) and filtered (0.45 µm). Each sample was prepared in triplicate then used for the determination of total phenolic content, total antioxidant capacity, and the chromatographic analysis.

2.4 LC-MS analysis

A Thermo-Finnigan Spectra-System high-performance liquid chromatography (HPLC) system (Thermo-Finnigan, Waltham, USA), equipped with a P2000 binary gradient pump system, a SCM 1000 degasser, an AS 3000 automatic injector and a Finnigan MAT LCQ ion trap mass spectrometer with an electrospray ionization (ESI) source was used. The separation was achieved on a Luna C18 column (150 × 2.0 mm, 5 µm; Phenomenex, Castel Maggiore, Italy). The mobile phase was composed of a mixture of solvent A (2% formic acid in water) and B (methanol). Flow rate was 0.2 mL×min⁻¹ and the injection volume 20 µL. Elution program was as follows: initial conditions solvent A 80%, concentration of solvent A was gradually decreased to 70% in 6 min.

This ratio was kept for 14 min and concentration of solvent A was gradually decreased to 50% in 2 min then to 30% in 27 min. Concentration of solvent A was gradually decreased to 0% in 20 min and kept so for 5 min before to return to 80% in 2 min and held for 25 min. Negative electrospray mode was used for the ionization of molecules with spray voltage at 3.50 kV and capillary temperature at 200 °C. The negative masses were monitored in the selected ion mode in 8 segments: *m/z* 289, 457, 577 from retention time (Rt) 0 to 11 min; *m/z* 441 from Rt 11 to 15 min; *m/z* 463, 579 and 609 from Rt 15 to 29 min; *m/z* 435 from Rt 29 to 31 min; *m/z* 285, 317, 447 from Rt 31 to 34 min; *m/z* 301 and 271 from Rt 34 to 38 min; *m/z* 285 from Rt 38 to 41 min; *m/z* 269 from Rt 41 to 44 min. Phenolic identification was obtained

by comparing the retention time and mass spectrum (MS) with that of authentic standards. In addition, MS2 experiments were carried out using helium as collision gas. Collision induced dissociation (CID) spectra were obtained with an isolation width of 1 m/z for parent mass and a normalized collision energy of 24% for procyanidin B1, procyanidin B2, (+)-catechin, (-)-epicatechin, 27% for (-)-epigallocatechin gallate, hesperidin, hyperoside, isoquercitrin and rutin, 29% for naringin, 32% for myricetin, naringenin and quercetin.

Quantification of each polyphenol was achieved using external calibration. Standards were individually dissolved in methanol/water/formic acid (50:49:1, v/v/v), diluted at 5000, 2000, 1000, 500, 100, 50, 20 and 10 $\mu\text{g/L}$, and used to provide the calibration curves. The limit of detection (LOD) was determined by using a signal-to-noise ratio of 3, while limit of quantification (LOQ) was calculated by using a signal-to-noise ratio of 10 (Table 1).

Table 1: Regression data, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) for phenolic compounds in argan parts.

	Calibration curve	R ²	Linear range (ppb)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Procyanidin B1	Y= 6000000 x + 159370	0.9836	50-2000	10	50
(+)-Catechin	Y= 792361 x + 72176	0.9992	50-2000	10	50
Procyanidin B2	Y= 5000000 x + 284603	0.9931	50-2000	50	100
(-)-Epigallocatechin Gallate	Y= 1000000 x + 89051	0.9980	50-2000	20	200
(-)-Epicatechin	Y= 804302 x + 145920	0.9979	50-2000	10	80
Isoquercitrin	Y= 30000000 x - 302815	0.9996	50-5000	10	20
Hyperoside	Y= 30000000 x - 302815	0.9996	50-5000	10	20
Rutin	Y= 60000000 x - 1000000	0.9998	50-5000	10	20
Phloridzin	Y= 10000000 x + 33993	0.9979	30-1000	6	10
Myricetin	Y= 50000000 x - 8000000	0.9950	50-5000	10	30
Quercitrin	Y= 60000000 x + 10000000	0.9812	30-5000	10	30

2.5 Spectrophotometric assays

2.5.1 Determination of total phenolic content (TPC)

The amount of total phenolics was assayed spectrophotometrically by means of the modified Folin– Ciocalteu method [24, 25]. Briefly, 2.5 mL of 10-fold diluted Folin–Ciocalteu reagent, 2 mL of 7.5% aqueous sodium carbonate solution, and 0.5 mL of phenolic extract were mixed well. After 15 min of heating at 45 °C the absorbance was measured at 765 nm with a UV-Visible spectrophotometer (UV-1700 PharmaSpec, Shimadzu, Milan, Italy) [26]. A mixture of solvent and reagents was used as a blank. The phenolic content was expressed as gallic acid equivalents (GAE) per g of sample, using a gallic acid standard curve (0-250 mg l⁻¹).

2.5.2 Determination of DPPH radical scavenging activity (RSA)

Hydrogen-donating ability of the crude extract and radical scavenging activity (RSA) of argan fruit parts were investigated using the DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging assay (RSA) [27, 28]. A volume of 3 mL of 6.1 x 10⁻⁵ M DPPH• methanol solution was used. The reaction was started by the addition of 75 µL of sample extract. The purple color of the radical methanol solution changed gradually to yellow and the decrease in absorbance at 515 nm was recorded, at room temperature, until the absorbance was stable (1 h). All operations were done in the dark or dim light [29]. For control purpose, the absorbance of the DPPH• without samples was measured.

The inhibition percentage (IP) of the DPPH• by the extracts was calculated according the formula $IP = [(A_{0min} - A_{60min})/A_{0min}] \times 100$ [30] where A_{0min} is the absorbance of the control at t = 0 min, and A_{60min} is the absorbance of the samples at 60 min. Ethanolic solutions of 6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) were used for calibration (0-350 µM). The percentage of remaining DPPH• being proportional to the antioxidant concentration in the extracts, the DPPH• scavenging activity was expressed as µM of Trolox equivalent (TE) per mg of sample.

2.5.3 Determination of total antioxidant activity (TAA)

The TAA in crude extracts was determined according to the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay following the original analytical procedure described by Re et al. [31] with slight modifications. ABTS radical cation (ABTS•+) was produced by reacting a 7 mM ABTS stock solution with 2.45 mM potassium persulphate (final concentration). The mixture was allowed to stand in the dark at room temperature for 12-16 h before use. The radical was stable in this form for more than two days when protected from light and stored at room temperature. For the study, the ABTS•+ stock solution was diluted with ethanol to an absorbance of 0.70 ($\pm$ 0.02) at 734 nm, and equilibrated at 30 °C. Sample solutions 30 μ L (or standard) were mixed with ABTS•+ solution 3 mL. Absorbance readings were taken at 30 °C exactly 6 min after initial mixing. Appropriate solvent blank was obtained by mixing absolute ethanol 30 μ L with ABTS•+ solution 3 mL and monitored its absorbance at 6 min. All determinations were carried out in triplicate. The ABTS•+ scavenging effect (% Inhibition) was calculated by the equation: % Inhibition = $[(A_{734\text{blank}} - A_{734\text{sample}})/A_{734\text{blank}}] \times 100$ where $A_{734\text{blank}}$ and $A_{734\text{sample}}$ are the absorbances of ABTS•+ solution at 734 nm before and after the samples addition. Calibration was performed, as described previously, with Trolox stock solutions. Results were expressed as μ M Trolox equivalent (TE) per mg of sample.

2.5.4 Statistical analysis

Results were reported as mean $\pm$ standard deviation ($n=3$). The analysis of variance (one-way ANOVA) was performed with SPSS software (version 12.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, Illinois). Duncan's test was applied to assess significant differences among the variables ($p < 0.05$), while Pearson correlation test was used to show their correlations.

3 Results and discussion

Efforts were made to minimize losses of polyphenol antioxidant capacity during extraction. Therefore samples were freeze-dried and milling performed with a hammer mill as

recommended [32]. Fruit processing, between harvest and polyphenol extraction, was performed using the exact methodology applied in argan oil production centers in order to get raw material whose quality really mimics that of argan oil by-products.

3.1 Identification and quantification of phenolic compounds in argan fruit parts

HPLC presents a lot of advantages for the separation and quantification of polyphenolics in fruits [33]. Some polyphenols have already been identified in argan parts [16-22]. Accordingly, those polyphenols were used as standards. Identification of the free phenolic compounds in argan fruit was carried out by HPLC/ESI-MS and achieved by comparing retention times and MS spectra with those of authentic standards. The MS spectrum showed the ions corresponding to the deprotonated molecule $[M-H]^-$, which provided the molecular weight of each compound. In addition, MS2 was carried out to confirm the polyphenol identity. The MS2 spectra afforded a fragmentation pattern specific for each molecule.

The LC-MS examination resulted in the detection of 12 components among which 11 were unambiguously identified. Identified compounds can be categorized into three groups: flavanols, flavonols, and dihydrochalcones. These components were found in various combinations and ratios (Table 2).

Six compounds were detected in the pulp. Isoquercitrin and hyperoside were predominant (28.4 and 21.1 mg/100g; respectively) followed by rutin (9.8 mg/100g) and quercitrin (0.2 mg/100g).

Epicatechin and procyanidin B2 were also detected but could not be quantified. In a previous qualitative study the presence of additional phenolic compounds had been detected in argan fruit pulp [17]. However, we were unable to reproduce this finding and neither hesperidin nor naringenin were found in the present work. This difference in composition between two

independent studies suggests that argan fruit pulp phenolic composition is not constant, neither in qualitative nor quantitative terms, and could depend on genotypic factors. It also likely depends on several intrinsic and hard-to-control factors such as growing conditions, geographical origin, ripening process, ripening level, or storage conditions [34]. Such variations have already been observed for other fruit [35]. Finally, phenolic content discrepancy might also be the result from different extraction methods [36].

Phenolics from argan fruit shell had never been studied before. The major phenolic compound isolated from the shell was (-)-epicatechin (0.6 mg/100g). Others were isoquercitrin (0.4 mg/100g), rutin and phloridzin (both 0.2 mg/100g), hyperoside, procyanidin B1 and B2 (both 0.10 mg/100g), myricetin (0.05 mg/100g), and finally quercitrin that was detected but could not be quantified.

Both roasted and unroasted kernels contained a large quantity of a yet unidentified compound ($M_w=458.3$; R_t : 8.9 min) as major component: 10.3 and 7.3 mg/100g; respectively. MS fragmentation indicated that this compound was not (epi)gallocatechin gallate despite their similar molecular weight. The polyphenolic nature of this compound remains dubious.

Unroasted kernels also contained (-)-epicatechin (0.6 mg/100g), (+)-catechin (0.4 mg/100g), hyperoside, isoquercitrin, epigallocatechin gallate, procyanidin B2 (both 0.2 mg/100g), procyanidin B1 (0.1 mg/100 g), phloridzin (0.05 mg/100 g), rutin (0.02 mg/100 g), and minute and not quantifiable amount of quercitrin. Roasted kernels contained only five polyphenols: (+)-catechin (0.2 mg /100g), (-)-epicatechin (0.1 mg/100g), and procyanidin B2 (0.1 mg/100g). (-)- Epigallocatechin gallate and quercitrin were detected but could not be quantified. The low content in polyphenols of roasted kernels, compared to unroasted kernels, can likely be attributed to a temperature-assisted polyphenol degradation during the roasting step [28].

The unidentified compound observed in argan kernels was also found in the press-cake at a concentration of 6.4 and 5.1 mg/100g for press-cake from unroasted and roasted kernels; respectively. (-)-Epicatechin was the only identified polyphenol in both type of press cake. Similar levels were observed in both press-cakes (0.2 mg/100g). Traces of procyanidin B1 and B2, myrcetin and quercitrin were detected, but not quantified, in both press-cakes. In addition, the press-cake produced from unroasted kernels also contained traces of (+)-catechin, (-)-epigallocatechin gallate and phloridzin.

The phenolic fraction of the argan press-cake had been previously analytically studied by GC-MS after extraction and phenol silylation [16]. Such method had led to detect sixteen polyphenols. Nine were detected during the present study. The difference observed between the two studies likely has the same origin as for the fruit pulp.

Total phenolic content (TPC) measured by HPLC indicated that argan fruit pulp was 30-fold richer in phenolics than argan shell or unroasted kernels (approx 60 mg/100g vs 2 mg/100g). Our results also showed that kernel roasting resulted in the loss of three-quarters of the total polyphenols (Table 2). We also decided to determine the TPC of our sample using the non-specific Folin Ciocalteu (FC-TCP) method because it is easy to implement and frequently used even though it rather provides information on the chemical reducing capacity of the sample, relatively to an equivalent reducing capacity of gallic acid. TPC of each part of argan fruit was measured by the Folin- Ciocalteu assay and, as expected, argan fruit pulp also displayed the highest FC-TPC (75.8 mg GAE/g). Unroasted kernels and press-cake from roasted or unroasted kernels presented FC-TPC close to 8 mg GAE/g. Shell and roasted kernels FC- TPC was around 4 mg GAE/g (Table 2).

Table 2: Total and individual phenolic compounds detected in the different parts of argan fruit by HPLC. Concentration is expressed in mg/100g or mg GAE/g for measurements by the Folin-Ciocalteu method.

Polyphenols	Shell	Pulp	Unroasted kernels	Roasted kernels	Press cake (unroasted kernels)	Press cake (roasted kernels)
Procyanidin B1	0.1±0.05 ^b	ND	0.1±0.05 ^b	ND	NQ	NQ
(+)-Catechin	ND	ND	0.4±0.05 ^c	0.2±0.05 ^b	NQ	ND
Procyanidin B2	0.1±0.05 ^c	NQ	0.2±0.05 ^d	0.1±0.05 ^b	NQ	NQ
(-)-Epigallocatechin Gallate	ND	ND	0.2±0.1 ^b	NQ	NQ	ND
Unknown (Mw=457.3)	ND	ND	7.3±0.8 ^a	10.3±4.3 ^b	6.4±0.8 ^c	5.1±0.4 ^c
(-)-Epicatechin	0.6±0.1 ^b	NQ	0.6±0.1 ^b	0.1±0.05 ^a	0.2±0.1 ^a	0.2±0.1 ^a
Isoquercitrin	0.4±0.1 ^a	28.4±2.2 ^b	0.2±0.1 ^a	ND	ND	ND
Hyperoside	0.1±0.05 ^a	21.1±3.3 ^a	0.2±0.05 ^a	ND	ND	ND
Rutin	0.2±0.1 ^a	9.8±0.7 ^a	0.02±0.01 ^b	ND	ND	ND
Phloridzin	0.2±0.1 ^c	ND	0.05±0.01 ^b	ND	NQ	ND
Myricetin	0.05±0.03 ^b	ND	ND	ND	NQ	NQ
Quercitrin	NQ	0.2 ± 0.1 ^a	NQ	NQ	NQ	NQ
Total phenolic content (HPLC method)	1.75±0.6 ^a	59.5±6.3 ^b	1.97±0.6 ^a	0.4±0.15 ^a	0.2±0.1 ^a	0.2±0.1 ^a
Total phenolic content (Folin-Ciocalteu method)	4.4±0.5 ^c	75.8±0.8 ^a	8.2±0.7 ^a	4.8±0.2 ^a	7.9±0.6 ^b	7.3±0.6 ^a

Data are expressed as mean ± standard deviation ($n = 3$); ND: not detected; NQ: not quantified; Values followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

3.2 Radical scavenging activity

Argan fruit pulp that is the richest part argan fruit in polyphenols displayed an antioxidant capacity of 0.17 μ M Trolox Eq/mg (Table 3).

RSA of argan shell polyphenols was found to be higher than that of the kernels and press-cake (0.026 vs 0.01 μ M Trolox Eq/mg) but due to the presence of a unidentified compound, comparison with kernel data, as well as with other plant extracts, was difficult.

Table 3: Radical scavenging and antioxidant activity of the crude polyphenols extracted from different parts of argan fruit

Argan fruit part	Radical Scavenging Activity (μM Trolox Eq/mg)	Trolox equivalent antioxidant activity (μM Trolox Eq/mg)
Pulp	0.17 ± 0.005^c	0.37 ± 0.07^b
Shell	0.026 ± 0.003^b	0.025 ± 0.005^a
Unroasted kernels	0.01 ± 0.002^a	0.011 ± 0.002^a
Roasted kernels	0.009 ± 0.001^a	0.006 ± 0.001^a
Press cake from unroasted kernels	0.01 ± 0.001^a	0.009 ± 0.001^a
Press cake from roasted kernels	0.008 ± 0.001^a	0.010 ± 0.001^a

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Means $\pm$ standard deviation in a column with different letters are statistically different ($p < 0.001$).

3.3 Total antioxidant activity

Total antioxidant activity (TAA), was determined by the Trolox-equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay that is based on the suppression of the absorbance of radical cations of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate) (ABTS $\bullet$ +) by antioxidants [38]. Polyphenols from argan fruit pulp displayed the highest measured TEAC ($0.37 \mu\text{M}$ Trolox Eq/mg) followed by those of fruit shell and unroasted kernels (0.025 and $0.011 \mu\text{M}$ Trolox Eq/mg; respectively) (Table 3).

3.4 Correlation between TAA and TPC

TAA of fruit is influenced by the degree of ripening [39, 40] and post-harvest phenomenon [41]. We found a good correlation between the TPC, determined by HPLC/MS, and the TAA of each parts of argan fruit (Table 4). Correlations were: $R = 0.994$ between total phenolics by Folin- Ciocalteu method and total phenolics by HPLC/MS, $R = 0.993$ between ABTS $\bullet$ assay and total phenolics by HPLC/MS, $R = 0.996$ between DPPH $\bullet$ assay and total phenolics by HPLC/MS. In addition, a significant linear relationship was found between the antioxidant capacity determined by ABTS $\bullet$ and DPPH $\bullet$ assays.

Table 4: Pearson correlation coefficient (R) between antioxidant capacity assays and total phenolic content (TPC) in different argan fruit parts

R	TPC	RSA	TEAC
RSA	0,988**	1	
TEAC	0,983**	0,988**	1
TPC by HPLC	0,994**	0,993**	0,996**

** Correlation is significant at the 0.01 level

4 Conclusion

All together, our results evidenced that 1) compounds other than polyphenols are responsible for the antioxidant capacity of each studied argan parts and 2) antioxidants formed during the roasting step (Maillard reaction products) have a strong antioxidant capacity since the FC-TCP of roasted kernels is less than one-half of that of unroasted kernels (4.8 mg GAE/g vs 8.2 mg GAE/ g) whereas its HPLC-calculated TPC is only one fifth that of unroasted kernels (0.4 mg/100 g vs 1.97 mg/100 g) (Table 2).

Therefore, our results demonstrate the importance of the phenolic fraction on the antioxidant activity of argan fruit parts. Even though the composition of the phenolic fraction of argan fruit part may change over the years, crude argan fruit polyphenols deserve to be evaluated as nutraceuticals, health supplements, or preservatives due to their antioxidant properties.

Acknowledgements

We thank the Slow Food Foundation for Biodiversity for its financial support and are grateful to the women of the Ait Baha co-operative and Association Ibn Al Baytar.

References

[1] Charrouf, Z., Guillaume, D., Sustainable Development in Northern Africa: The Argan Forest Case. *Sustainability*. 2009, **1**, 1012-1022.

- [2] Charrouf, Z., Guillaume, D., Should the Amazigh Diet (Regular and Moderate Argan-Oil Consumption) Have a Beneficial Impact on Human Health? *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2010, **50**, 473-477.
- [3] El Monfalouti, H., Guillaume, D., Denhez, C., Charrouf, Z., Therapeutic potential of argan oil- A review. *J Pharm Pharmacol.* 2010, **62**, 1669-1675.
- [4] Guillaume, D., Charrouf, Z., Argan oil and other argan products; use in dermocosmetology. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2011, **113**, 403-408.
- [5] Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006, **99**, 191- 203.
- [6] Zheng, R., Shi, Y., Jia, Z., Zhao, C., Zhang, Q., Tan, X., Fast repair of DNA radicals. *Chem Soc Rev.* 2010, **39**, 2827-2834.
- [7] Sies, H., Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch Biochem Biophys.* 2010, **501**, 2-5.
- [8] Clement, Y., Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. *Prev Med.* 2009, **49**, 83-87.
- [9] Kar, P., Laight, D., Shaw, K. M., Cummings, M. H., Flavonoid-rich grapeseed extracts: a new approach in high cardiovascular risk patients? *Int J Clin Pract.* 2006, **60**, 1484–1492.
- [10] Scalbert, A., Morand, C., Manach, C. Rémésy, C., Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother.* 2002, **56**, 276–282.
- [11] Núñez, M. J., Costoya, N., Natural antioxidants in health and diseases: a perspective. *E-Journal Env Agric Food Chem.* 2008, **7**, 3335-3342.
- [12] Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Owen, R. W., Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur J Cancer Prev.* 2003, **12**, 67-75.
- [13] Marfil, R., Giménez, R., Martinez, O., Bouzas, P. R., Rufian-Henares, J. A., Mesias, M., Cabrera-Vique, C., Determination of polyphenols, tocopherols, and antioxidant capacity in virgin argan oil (*Argania spinosa*, Skeels). *Eur J Lipid Sci Technol.* 2011, in press.
- [14] Cayuela; J. A., Rada, M., Pérez-Camino, D. C., Benaissa, M., Abdelaziz, E., Guinda, A., Characterization of artisanally and semiautomatically extracted argan oils from Morocco. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2008, **110**, 1159-1166.
- [15] Pauly, G., Henry, F., Danoux, L., Charrouf, Z.: US patent 7,105,184 B2, (2006).
- [16] Rojas, L. B., Quideau, S., Pardon, P., Charrouf, Z., Colorimetric evaluation of phenolic content and GC-MS characterization of phenolic composition of alimentary and cosmetic argan oil and press cake. *J Food Agric Chem.* 2005, **53**, 9122-9127.

- [17] Charrouf, Z., Hilali, M., Jauregui, O., Soufiaoui, M., Guillaume, D., Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy. *Food Chem.* 2007, **100**, 1398-1401.
- [18] Chernane, H., Hafidi, A., El Hadrami, I., Ajana, H., Composition phénolique de la pulpe des fruits d'arganier (*Argania spinosa* L. skeels) et relation avec leurs caractéristiques morphologiques. *Agrochimica*, 1999, **43**, 137-150.
- [19] Chimi, H., Rahmani, M., Cillard, J., Cillard, P., Etude de la fraction phénolique des huiles d'olives vierges et d'argan du Maroc. *Actes Inst Agr Vét (Maroc)*. 1988, **8**, 17-21.
- [20] Tahrouch, S., Andary, C., Rapior, S., Mondolot, L., Gargadennec, A., Fruchier, A., Polyphenol investigation of *Argania spinosa* (Sapotaceae) endemic tree from Morocco. *Acta Bot Gall.* 2000, **147**, 225-232.
- [21] El Kabouss, A., Charrouf, Z., Oumzil, H., Faid, M., Lamnouar, D., Miyata, Y., Miyahara, K., Caractérisation des flavonoïdes des feuilles de l'arganier (*Argania spinosa*) et étude de leur activité antimicrobienne. *Actes Inst Agr Vét (Maroc)*. 2001, **21**, 157-162.
- [22] Charrouf, Z., Guillaume, D., Phenols and polyphenols from *Argania spinosa*. *Am J Food Technol.* 2007, **2**, 679-683.
- [23] Xu, B. J., Chang, S. K., A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci.* 2007, **72**, 159-166.
- [24] Singleton, V. L., Rossi, J. A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965, **16**, 144-158.
- [25] Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 1999, **299**, 152-178.
- [26] Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Núñez, M. J., Effect of solvent, temperature and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradicalary activity of extracts from different components of grape pomace. *J Agric Food Chem.* 2005, **53**, 2111-2117.
- [27] Von Gadow, A., Joubert, E., Hansmann, C. F., Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA. *J Agric Food Chem.* 1997, **45**, 632-638.
- [28] Schinella, S. M., Cienfuegos-Jovellanos, E., Pasamar, M. A., Muguerza, B., Ramón, D., Ríos, J. L., Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Res Int.* 2010, **43**, 1614–1623.
- [29] Sharma, O. P., Bhat T. K., DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chem.* 2009, **113**, 1202- 1205.

- [30] Yen, G. C., Duh, P. D., Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active oxygen species. *J Agric Food Chem.* 1994, **42**, 629-632.
- [31] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourization assay. *Free Rad Biol Med.* 1999, **26**, 1231-1237.
- [32] Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Diaz-Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F., Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int*, 2008, **41**, 274-285.
- [33] Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I., A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 2011, **126**, 1821-1835.
- [34] Hilali, M., Charrouf, Z., Soulhi, A. E. A., Hachimi, L., Guillaume, D., Influence of origin and extraction method on argan oil physicochemical characteristics and composition. *J Agric Food Chem.* 2005, **53**, 2081-2087.
- [35] Naczek, N., Shahidi, F., Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2006, **41**, 1523-1542.
- [36] Franco, D., Sineiro, J., Rubilar, M., Sanchez, M., Jerez, M., Pinelo, M., Costoya, N., Núñez, M. J., Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *E-Journal Env Agric Food Chem.* 2008, **7**, 3210-3216.
- [37] Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K., Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005, **53**, 4290– 4302.
- [38] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med.* 1996, **20**, 933-956.
- [39] Olsson, M. E., Ekvall, J., Gustavsson, K. E., Nilsson, J., Pillai, D., Sjöholm, I., Svensson, U., Akesson, B., Nyman, M. G. L., Antioxidants, low-molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): Effects of cultivar, ripening, and storage. *J Agric Food Chem.* 2004, **52**, 2490–2498.
- [40] Prakash, D., Upadhyay, G., Singh, B. N., Singh, H. B., Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chem.* 2007, **104**, 783–790.
- [41] Srivastava, A., Akoh, C. C., Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., Effect of storage conditions on the biological activity of phenolic compounds of blueberry extract packed in glass bottles. *J Agric Food Chem.* 2007, **55**, 2705–2713.

III- SYTHESE DE L'ARTICLE 2

L'objectif de ce travail était d'identifier et de quantifier les composés phénoliques du fruit de l'arganier et des co-produits de l'extraction de l'huile d'argane. La teneur phénolique totale et l'activité antioxydante par DPPH et ABTS ont été évalués.

L'examen LC-MS a abouti à la détection de 12 composés parmi lesquels 11 ont été identifiés sans ambiguïté. Les composés identifiés sont classés en trois groupes: les flavanols, flavonols, et dihydrochalcones.

Les résultats ont montré que six composés ont été détectés dans la pulpe : l'isoquercitrine et hypéroside sont prédominants (28,4 et 21,1 mg/100 g respectivement) ; ils sont suivis par la rutine (9,8 mg/100 g), quercitrine (0,2 mg/100 g). L'épicatéchine et procyanidine B2 ont été également détectés, mais n'ont pas pu être quantifiée. Les composés phénoliques de la coque de fruit de l'arganier n'ont fait l'objet d'aucun travail préalable. Le composé phénolique majeur isolé de la coque est l'(-)-épicatéchine (0,6 mg/100 g), suivi de l'isoquercitrine (0,4 mg/100 g). La rutine et la phloridzine ont le même taux (0,2 mg/100 g), l'hypéroside, la procyanidine B1 et B2 (à la fois 0,10 mg/100 g), myricétine (0,05 mg/100 g), et enfin la quercitrine qui a été détectée, mais n'a pas pu être quantifiée. Quant aux amandons et les tourteaux, un composé majoritaire a été détecté, cependant ce composé n'a pas pu être identifié par spectrométrie de masse en Tandem ($M_w = 458,3$; $R_t: 8,9$ min).

Nos résultats montrent également que les fractions phénoliques étudiées présentent des propriétés antioxydantes remarquables. Même si la composition de la fraction phénolique de fruits peut évoluer au fil des ans, ils méritent une meilleure valorisation dans le domaine pharmacologique, cosmétique et agroalimentaire en raison de leurs propriétés antioxydantes.

Chapitre III

Effet de la torréfaction des amandons sur la
composition volatile de l'huile d'argane

I- INTRODUCTION

La torréfaction est une opération primordiale pour l'extraction de l'huile d'argane alimentaire. Le développement de l'arôme ou flaveur est favorisé considérablement lors de cette étape (Buckholz et *al.* 1980; Mayer 1985 ; Lopez 1997a). La torréfaction permet aussi de détruire les microorganismes indésirables et inactifs et les enzymes qui favorisent la détérioration du produit au cours du stockage (Buckholz et *al.* 1980), elle permet également de donner naissance à des composés antioxydants formés au cours de la réaction de Maillard.

Au cours de cette opération, l'arôme de noisette se développe, cet arôme est également transféré à l'huile d'argane lors de l'extraction. Toutefois, si la torréfaction des amandons d'argane se prolonge plus de 25 minutes, l'huile obtenue présente un goût désagréable, et un goût de brûlé et il est rejeté par les consommateurs (Harhar et *al.* 2011). Un temps de cuisson plus long est également responsable de la formation des produits d'oxydation primaires. De ce fait, le temps et la température joue un rôle très important dans le développement de la couleur, la flaveur, la texture et l'apparence des amandons. Par conséquence, ces paramètres conditionnent la déshydratation et les changements physico-chimiques (Chiou et *al.* 1989; Saklar 1999).

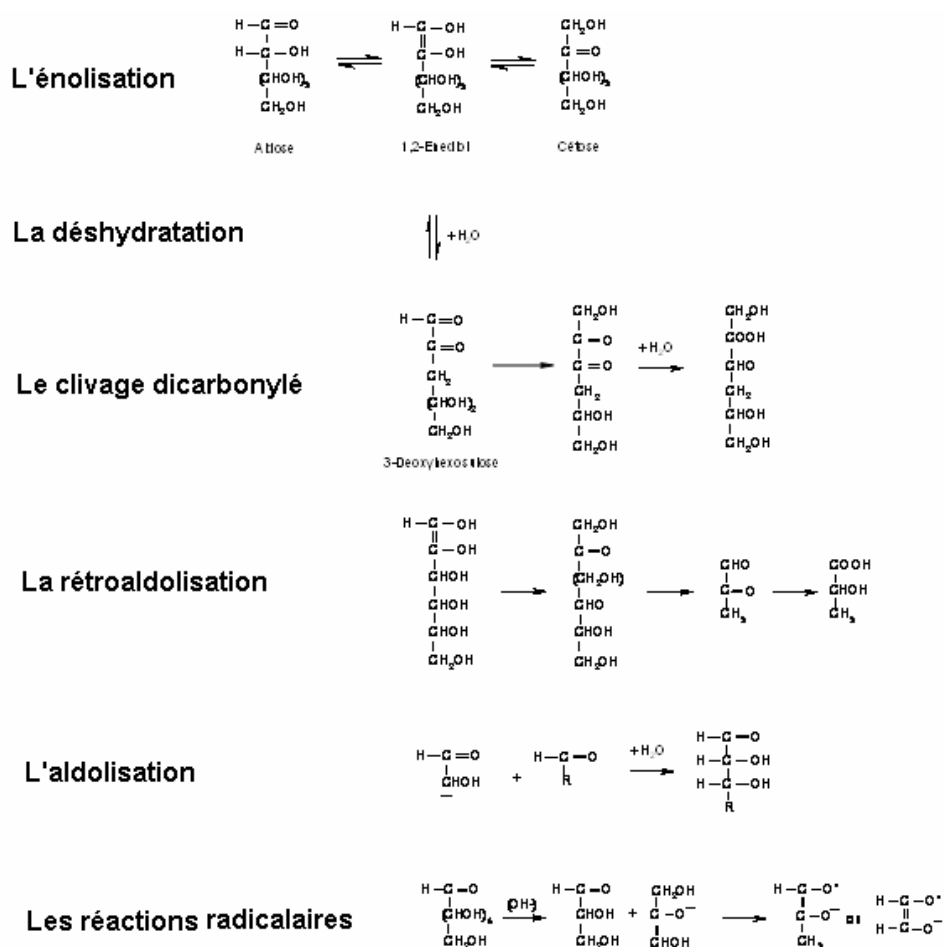
Des études antérieures ont montré que l'augmentation du temps de torréfaction de matières premières ou de la température induit la formation de substances de coloration brunâtre dans les huiles comestibles (Kim et *al.* 2002 ; Yen GC & Shyu SL 1989 ; Yoshida H 1994). Ces substances qui résultent de réactions non enzymatiques possèdent des propriétés de conservation (Yen GC & Shyu SL 1989 ; Lee YC 2004) et sont en partie responsable de la plus grande stabilité de l'huile d'argane alimentaire, par rapport à huile cosmétique (Matthäus et *al.* 2010).

Les trois principales réactions non enzymatiques responsables des différentes modifications physico – chimiques lors de la torréfaction sont successivement: la caramélisation, l'auto-oxydation et la réaction de Maillard

I-1 La réaction de Caramélisation

La caramélisation est un terme qui englobe toutes les réactions de dégradations thermiques des sucres, en particulier le mono- et disaccharides réducteurs. On peut distinguer plusieurs étapes dans les réactions de caramélisation (Kroh, 1994). La première étape de la plupart des réactions de caramélisation comporte des réarrangements internes des sucres (énolisations). La deuxième étape consiste en la perte d'une molécule d'eau et est suivie de différentes réactions selon le type de sucre, les conditions de pH et de température.

Cette énolisation réversible est suivie d'une seconde énolisation irréversible et d'une β -élimination. S'ensuit un clivage dicarboxylique, transformant ainsi les sucres en acides carboxyliques qui sera soumis par la suite à une retroaldolisation et enfin une condensation aldolique, les intermédiaires clés de cette réaction sont les osuloses qui sont des α -dicarbonyl (3-déoxyhexosulose) (Figure 13).



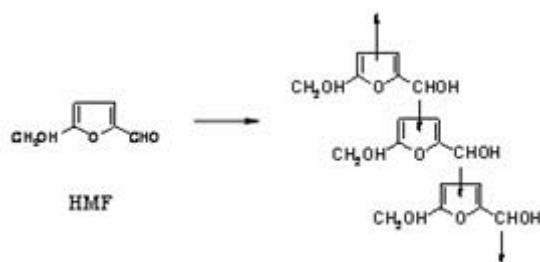


Figure 13 : Schéma de la réaction de Caramélisation (Selon Kroh , 1994) (a), La polymérisation de l'HMF (b)

Certaines des molécules issues de cette réaction sont responsables de la formation d'odeur et de couleur caractéristique du caramel. Kroh (1994) suggère la formation de ce type de molécules colorées à partir de la condensation des molécules de l'hydrométhylfurfural (HMF), donnant naissance à un polymère coloré typique du caramel (Kroh 1994) (Figure 13).

I-2 L'auto-oxydation

Ces réactions nécessitent la présence d'oxygène qui doit être activé en oxygène singulet (Bradley et Min, 1992) soit sous l'action de photons (lumière), soit de radicaux libres déjà présents dans le milieu, soit d'enzymes (peroxydases, lipoxygénases, etc...). Elles se développent en milieu anhydre, plus la température est élevée et plus le milieu s'oxyde. Ce sont les lipides insaturés (triglycérides et phospholipides) qui sont les plus sensibles à ce type de réaction (Gandemer 1999 ; Kanner et al. 1987; Mastrocola et al. 2000 ; Min & Lee 1999) et en particulier les acides gras polyinsaturés.

Les réactions d'oxydation conduisent à la formation de radicaux libres puis d'hydroperoxydes ou composés intermédiaires. Ces derniers se décomposent à leur tour pour donner naissance à des composés volatils, des composés furaniques et surtout des aldéhydes saturés ou insaturés (Figure 14). Ces composés réagissent avec l'ammoniac, les amines ou les acides aminés (dégradation de Strecker) et l'hydrogène sulfuré, provenant de la dégradation des acides aminés soufrés (Chyau C & Mau 1999), pour conduire à de nouveaux composés d'arôme dont les hétérocycles (Whitfield 1992). Tout de suite après la formation de radicaux libres (phase d'initiation), la réaction s'auto-entretient (phase de propagation) et les lipides insaturés disparaissent progressivement au profit des hydroperoxydes qui croissent pour atteindre leur maximum au milieu de la phase de propagation (Figure 14).

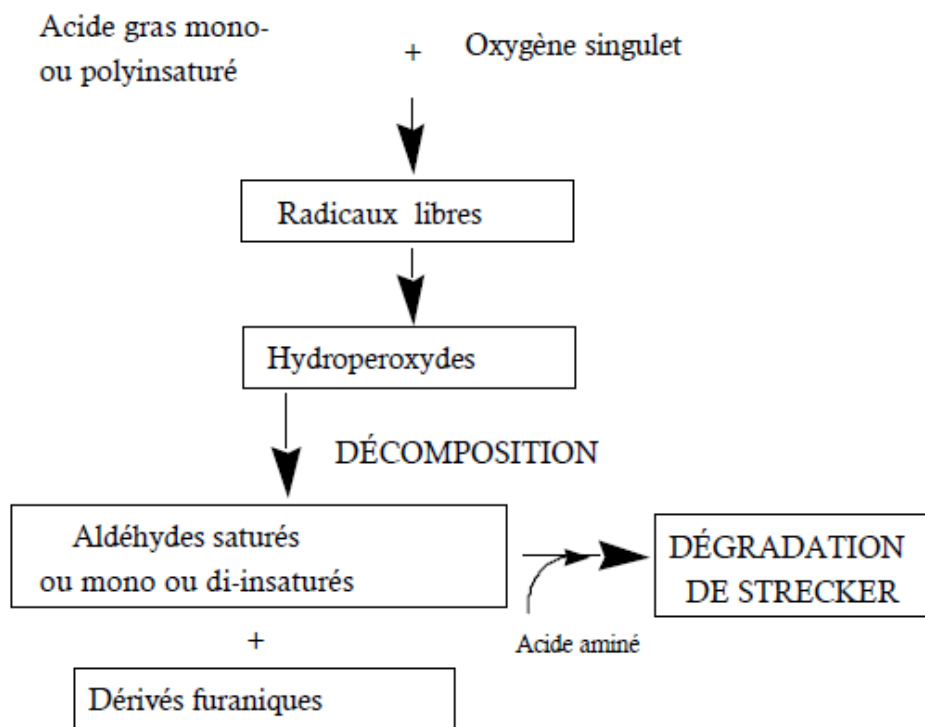


Figure 14 : Schéma d'autooxydation

I-3 Réaction de Maillard

La réaction de Maillard, l'une des réactions de brunissement non enzymatiques entre des groupes amino libres et des groupes carbonyle, a été étudiée pendant une longue période. En effet, cette réaction influe non seulement sur la couleur mais également sur les propriétés fonctionnelles, la valeur nutritive, la flaveur et la saveur des aliments (Ames 2001).

La réaction de Maillard se répartie en quatre étapes (Figure 15),

- La première étape ou étape initiale, consiste à former le produit d'Amadori (cétosamine) ou de Heyns (aldosamine).
- La seconde étape appelé étape de propagation conduit à la formation de petites molécules dicarboxylées et de réductones.
- L'étape avancée de la réaction de Maillard conduit à la formation de divers composés aromatiques et d'aldéhydes de Strecker. Cette étape donne aussi lieu à la formation de furfurals, ainsi que d'autres produits avancés (AGEs) de la réaction de Maillard, tels que la carboxyméthyllysine (CML) ou la pyrroline.
- La dernière étape conduit à la formation de polymères bruns : les mélanoidines.

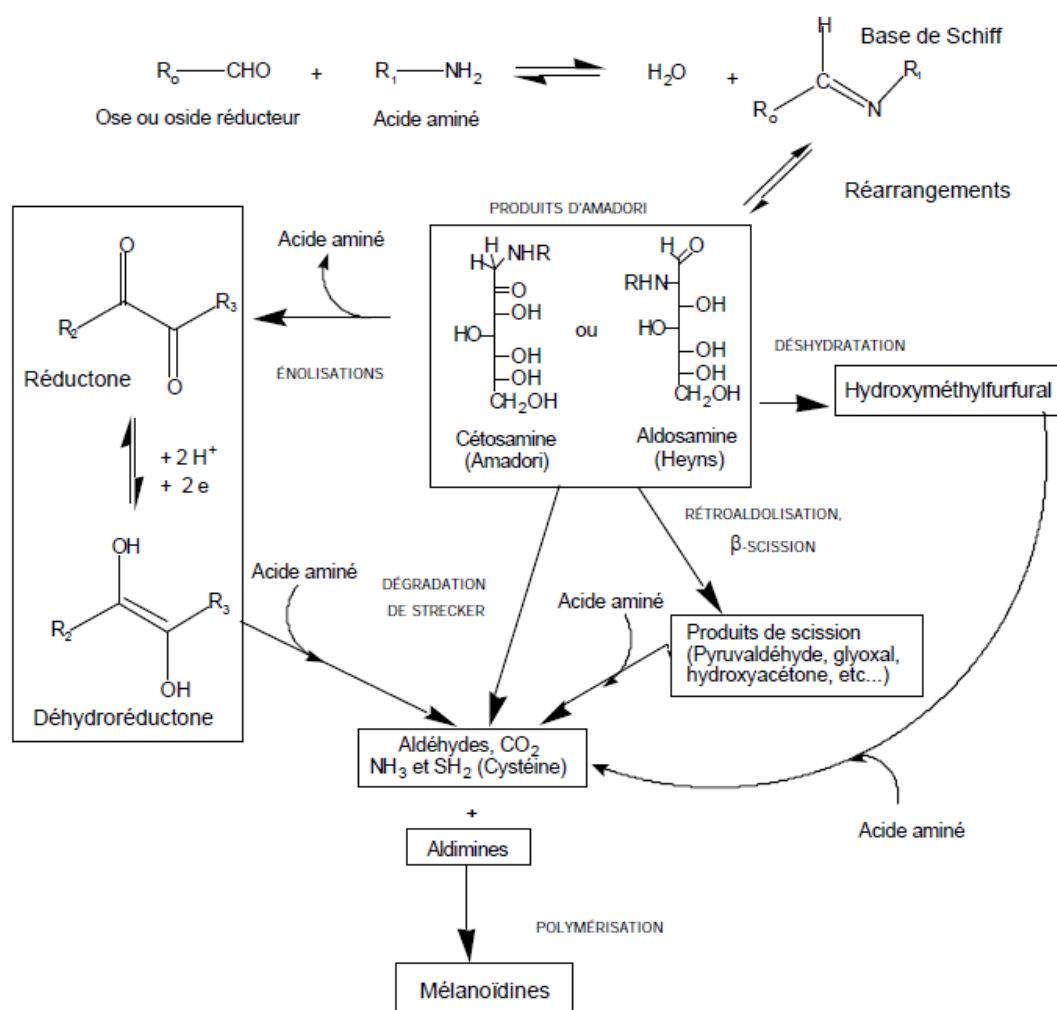


Figure 15: Schéma simplifié de la réaction de Maillard

Un grand nombre de composés chimiques de différentes classes, les aldéhydes, cétones, hydrocarbures, furanes participent à l'arôme final de l'huile d'argane. En effet, 21 composés volatiles ont été séparés et la majorité d'entre eux ont été identifiés. Quatorze et dix neuf substances odorantes ont été détectées respectivement dans l'huile d'argane cosmétique et alimentaire (Charrouf et *al.* 2006). Ces différences dans la composition des substances odorantes induites par la torréfaction nous a semblé intéressantes à investiguer. Pour ce faire nous avons produit des huiles à différents temps de torréfaction afin de caractériser macroscopiquement la cinétique de la formation de composés volatils et leur quantification. La température de la torréfaction est restée constante. Le chapitre ci-après relate les résultats trouvés.

Volatile Compound Formation During Argan Kernel Roasting

Hanae El Monfalouti^{a,b}, Zoubida Charrouf^{a,*}, Manuela Giordano^c, Dominique Guillaume^b, Badreddine Kartah^a, Hicham Harhar^a, Saïd Gharby^a, Clément Denhez^b, and Giuseppe Zeppa^c

^a*Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, Laboratoire de Chimie des Plantes, BP 1014, Rabat, Morocco.*

^b*UFR Medicine-Pharmacy, Med Chem Department, CNRS-UMR6229, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France.*

^c*Department of Valorization and Exploitation of Agroforestry Resources, Food Microbiology and Technology Sector, University of Turin, Via Leonardo da Vinci, 44 – 10095 Grugliasco, Italy.*

zcharrouf@menara.ma

Received: July 25th, 2012; Accepted: August 31th, 2012

Virgin edible argan oil is prepared by cold-pressing argan kernels previously roasted at 110°C for up to 25 minutes. The concentration of 40 volatile compounds in virgin edible argan oil was determined as a function of argan kernel roasting time. Most of the volatile compounds begin to be formed after 15 to 25 minutes of roasting. This suggests that a strictly controlled roasting time should allow the modulation of argan oil taste and thus satisfy different types of consumers. This could be of major importance considering the present booming use of edible argan oil.

Keywords: Argan oil, GC/MS, Flavor variation, Aroma variation.

Argan oil, the basic ingredient of the Amazigh diet [1], has become a major player in the competitive virgin oil kingdom. This is due to its unique taste and numerous nutritional and pharmacological properties [2,3]. Argan oil is prepared by extraction with a mechanical press after the argan kernels have been roasted at 110°C for the appropriate time [4]. During roasting, a hazelnut like-aroma is developed, and this is transferred along with the oil during extraction. However, if kernel roasting is prolonged over 25 minutes, the resulting oil presents an unpleasant taste, then a burning taste, and is rejected by consumers [5]. A large number of chemical compounds of different classes, such as aldehydes, hydrocarbons, ketones, and furans participate in the argan oil final aroma [6]. Most of these compounds are produced by oxidation of fatty acids after enzymatic reactions occurring in the presence of oxygen. C6 and C5 volatile compounds, which come from primary or secondary lipoxygenase pathways, respectively, are particularly well known to participate actively in the edible oil aroma [7]. Prolonged storage of the argan fruit also favors volatile compound formation [8]. However, as also in the case of olive oil, those latter are generally responsible for off-flavors [9]. Interestingly, the distinctive hazelnut aroma of argan oil is also likely to be due to pyrazines, formed from Maillard-type non-enzymatic reactions between reducing sugar and free amino acid during the roasting process [10], as frequently observed in many different types of thermally processed food [11, 12].

This paper intends to macroscopically characterize the kinetics of the volatile compound formation in argan kernels during the roasting time. Such study could permit the tuning of the argan oil aroma and possibly satisfy new types of consumers.

Already known volatile compounds isolated from argan oil belong to six major families: alcohols, aldehydes, ketones, esters, terpenes, and N-heterocycles [6]. Argan oil prepared from animal-processed fruit possesses additional volatile compounds [6], but because of its

low quality [13], such oil was voluntarily excluded from this study. However, the kinetics of the formation of all these families of compounds is still unknown. Therefore, we chose several volatile compounds belonging to each known family of argan oil volatiles and quantified them all along the roasting process. Ten alcohols, three aldehydes, four esters or lactones, three ketones, one terpene, and ten N-heterocycles were selected (Table 1). Additionally, four acid volatiles were also selected, together with five furans, even though their presence had not been previously reported.

Oxygen reacts with unsaturated fatty acids to yield hydroperoxides from which a large variety of volatile and non-volatile secondary products are formed. Elevated temperature greatly favors volatile compound formation through lipoxidation [14]. Aldehydes, acids, and esters result from carbon-carbon cleavage. Other derivatives result from more complex processes that may involve isomerization [14]. For example, Strecker degradation is a well-studied process that is known to afford aldehydes from amino-acids [15].

Acids play an important function in food taste. For example, valeric and hexanoic acids possess a cheesy and barnyard animal flavor, respectively. Whereas in argan oil the butanoic acid level remained unchanged over a roasting period of 35 minutes, the level of valeric, and hexanoic acids started to increase significantly after 20 minutes. Such an increase unambiguously established the occurrence of a process involving linoleic acid oxidation during this period. Among the alcohols, 1-pentanol, 1-heptanol, and 1-octanol, three primary alcohols known to result from secondary oxidation of oleic or linoleic acids by autoxidation [16], were the three volatiles whose content significantly increased after 20 minutes. Other alcohol levels remained stable, attesting to the lack of influence of roasting on either their formation or their fast involvement in subsequent reactions. Interestingly, aldehyde content also increased after 20 minutes of heating. The hexanal level increased particularly rapidly

attesting to an oxidative process involving linoleic acid, consistent with the previously observed formation of 1-hexanol. Concerning benzaldehyde, which is likely to be a degradation product of the amino-acid phenylalanine following the Strecker degradation sequence [17]; its level also increased after 20 minutes. However, the slow rate of formation of benzaldehyde, compared with either hexanal or nonanal, suggests a moderate role for the Strecker degradation in the volatile formation in argan oil at 110°C. Among esters and lactones, ethyl 2-methylbutanoate, iso-amylacetate, γ -butyrolactone, and δ -caprolactone were easily quantified. The concentration of these four molecules decreased during the first ten minutes of heating, likely due to their high volatility. After 20 minutes of roasting, concentration of esters and lactones started to increase. Such a trend was particularly important for iso-amylacetate and γ -butyrolactone. Concentration of the former decreased after 35 minutes of heating, Ethyl 2-methyl butanoate and δ -caprolactone required a slightly longer heating period to accumulate. Ester and lactone formation necessitates two steps: first, alcohol formation, then its esterification with acid. Therefore, their high content in argan oil after 25 minutes of kernel roasting could be explained either by their inherent heat-induced formation or by the initial delay in producing the necessary alcohol and acid derivatives. Like aldehydes, ketones are ultimate secondary lipidoxidation products [16]. The level of acetoin, a ketone known to contribute to the creamy and buttery aroma, peaked after 15 minutes of heating, then decreased to reach its initial low value after 25 minutes.. Concerning the two other ketones quantified, levels of 2-heptanone and 2-undecanone consistently and significantly increased after 20 minutes of roasting. Limonene was the only terpene easy to quantify. Its concentration decreased rapidly after heating, likely due to degradation and/or heat-induced loss. Ten N-heterocyclic volatiles were analyzed. In oils prepared from roasted seeds, pyrazines are generally considered to occur in the course of the Maillard reaction [18, 19]. Very interestingly, most pyrazines are correlated with sensory attributes, such as roasty,

nutty, and woody [20], the attributes looked for to describe quality argan oil [21]. All studied pyrazines started to accumulate after 15 min of heating. For pyrroles, another type of flavor compound eliciting a typical meat or roasted flavor, 20 minutes were necessary for their formation. Interestingly, it has been shown that for pumpkin seed oil, a roasting temperature higher than 100°C is necessary to achieve a large production of N-heterocyclic compounds [20], whereas for perilla seed oil, the roasting temperature must be higher than 150°C. Our study provides evidence that the generally accepted optimum roasting time of 20-25 minutes for argan kernels [5] indeed corresponds to the time necessary to form those specific compounds that present the looked for flavor attributes.

Furans are commonly found volatiles in oilseed products [19]. They can result from two formation pathways: lipid peroxidation or carbohydrate degradation. Four furan derivatives were quantified. 2-Pentyl furan is derived from lipid peroxidation [22]. It is an important compound since it possesses flavor properties [23]. 2-Pentyl furan started to accumulate after 25 minutes of roasting. Once again, reduction in 2-pentyl furan concentration during the first 20 minutes of heating likely results from its high volatility. Levels of furanmethanol and furfural, which are formed by degradation of carbohydrates [24], increased rapidly after 15 minutes. Furaneol that could not be detected in fresh kernels appeared after 20 minutes of heating.

The results of our study clearly show that the roasting process of argan kernels is a major step to obtain the aroma of the final product. Roasting induces the formation of several compounds, including those from Strecker degradation, lipid peroxidation, and Maillard reaction. Because at 110°C the kinetic of formation of these compounds is different, it is reasonable to suggest that the use of appropriate roasting times should afford argan oils whose health benefits would be preserved, but presenting a variety of taste. Such produce is particularly looked for in the haute cuisine domain.

Table 1: Quantified volatile compounds ($\mu\text{g/kg}$ of oil $\pm\text{SD}$) isolated in argan oil from kernels roasted for different times.

Compound	Ions (m/z)	0	10	15	20	25	35	p
Acids								
i-Butanoic	43, 73 ^q , 88	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.05	0.5 $\pm$ 0.05	0.6 $\pm$ 0.02	0.7 $\pm$ 0.4	ns
Butanoic	60 ^q , 73	1.1 $\pm$ 0.1 ^{ab}	1.1 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.2 $\pm$ 0.1 ^{abc}	1.6 $\pm$ 0.2 ^{bcd}	1.9 $\pm$ 0.6 ^{cd}	2.0 $\pm$ 0.8 ^d	**
Valeric	60 ^q	0.5 $\pm$ 0.1 ^a	0.5 $\pm$ 0.04 ^a	0.4 $\pm$ 0.02 ^a	2.1 $\pm$ 0.5 ^c	1.6 $\pm$ 0.6 ^{bc}	1.3 $\pm$ 0.5 ^d	***
Hexanoic	73	2.4 $\pm$ 0.2 ^a	1.9 $\pm$ 0.1 ^a	1.9 $\pm$ 0.1 ^a	7.3 $\pm$ 2.1 ^b	6.7 $\pm$ 2.5 ^b	6.8 $\pm$ 3.3 ^b	**
Alcohols								
i-Butanol	43, 74 ^q	0.5 $\pm$ 0.1 ^b	0.6 $\pm$ 0.1 ^{bc}	0.7 $\pm$ 0.1 ^b	0.5 $\pm$ 0.1 ^b	0.3 $\pm$ 0.1 ^a	0.25 $\pm$ 0.05 ^a	***
1-Butanol	41, 56 ^q	1.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.02	1.6 $\pm$ 0.22	1.4 $\pm$ 0.05	1.6 $\pm$ 0.63	ns
i-Pentanol	41, 55, 70 ^q	7.9 $\pm$ 1.1 ^b	8.4 $\pm$ 0.4 ^b	9.6 $\pm$ 0.1 ^b	8.0 $\pm$ 0.9 ^b	4.9 $\pm$ 0.2 ^a	4.8 $\pm$ 1.6 ^a	***
1-Pentanol	42, 55, 70 ^q	3.0 $\pm$ 0.2 ^a	3.3 $\pm$ 0.2 ^a	3.1 $\pm$ 0.1 ^a	8.3 $\pm$ 1 ^b	8.3 $\pm$ 0.5 ^b	13.6 $\pm$ 4.3 ^c	***
1-Hexanol	56 ^q , 69	25.9 $\pm$ 2.4	20.8 $\pm$ 1.1	21.6 $\pm$ 2.1	20.8 $\pm$ 2.6	19.5 $\pm$ 2.1	20.5 $\pm$ 6.1	ns
1-Heptanol	56, 70 ^q	0.54 $\pm$ 0.03 ^a	0.4 $\pm$ 0.01 ^a	0.5 $\pm$ 0.06 ^a	1.1 $\pm$ 0.1 ^b	1.7 $\pm$ 0.2 ^c	2.2 $\pm$ 0.7 ^c	***
2-Heptanol	45 ^q , 55, 83	2.5 $\pm$ 0.2 ^b	1.5 $\pm$ 0.05 ^a	1.3 $\pm$ 0.2 ^a	1.4 $\pm$ 0.2 ^a	1.1 $\pm$ 0.1 ^a	1.3 $\pm$ 0.4 ^a	***
2,3-Butanediol <i>d,l</i>	45 ^q	37 $\pm$ 8	52.1 $\pm$ 9.3	53.4 $\pm$ 11.3	55.3 $\pm$ 24.1	60.5 $\pm$ 12.8	38.3 $\pm$ 12.4	ns
2,3-Butanediol <i>meso</i>	45 ^q , 57	42.1 $\pm$ 16.3	51.1 $\pm$ 15.7	44.0 $\pm$ 11.6	43.3 $\pm$ 16.6	55.6 $\pm$ 16.4	39.7 $\pm$ 14.6	ns
1-Octanol	56 ^q , 69, 84	0.5 $\pm$ 0.04 ^a	0.5 $\pm$ 0.02 ^a	0.7 $\pm$ 0.1 ^a	0.9 $\pm$ 0.15 ^{ab}	1.4 $\pm$ 0.3 ^{bc}	1.6 $\pm$ 0.6 ^c	***
Aldehydes								
Hexanal	44, 56 ^q , 72	3.95 $\pm$ 1 ^a	2.4 $\pm$ 0.8 ^a	2.1 $\pm$ 0.6 ^a	6.1 $\pm$ 1.9 ^a	20.1 $\pm$ 3.3 ^b	31.9 $\pm$ 12.5 ^c	***
Nonanal	57 ^q	0.8 $\pm$ 0.8 ^{ab}	0.2 $\pm$ 0.02 ^a	0.2 $\pm$ 0.02 ^a	0.6 $\pm$ 0.13 ^a	1.7 $\pm$ 0.5 ^b	2.8 $\pm$ 1.4 ^c	***
Benzaldehyde	105 ^q	0.5 $\pm$ 0.1 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^a	0.5 $\pm$ 0.1 ^a	0.9 $\pm$ 0.2 ^{ab}	1.6 $\pm$ 0.2 ^{bc}	1.7 $\pm$ 0.6 ^c	***
Esters, lactones								
Ethyl 2-methyl butanoate	57, 85, 102 ^q	0.4 $\pm$ 0.05 ^c	0.2 $\pm$ 0.01 ^b	0.1 $\pm$ 0.02 ^a	0.2 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.2 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.2 $\pm$ 0.06 ^a	***
i-Amylacetate	55, 70 ^q	2.1 $\pm$ 1 ^{ab}	1.8 $\pm$ 0.07 ^a	0.9 $\pm$ 0.5 ^a	1.6 $\pm$ 0.4 ^{bc}	1.6 $\pm$ 0.1 ^c	1.1 $\pm$ 0.5 ^c	**
γ -Butyrolactone	42, 56, 86 ^q	2.1 $\pm$ 0.5 ^{ab}	1.4 $\pm$ 0.2 ^a	1.5 $\pm$ 0.04 ^a	3.2 $\pm$ 0.6 ^{bc}	3.8 $\pm$ 1.2 ^c	4.0 $\pm$ 1.8 ^c	**
δ -Caprolactone	42, 70 ^q	0.1 $\pm$ 0.01 ^a	0.09 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.1 $\pm$ 0.01 ^{ab}	0.3 $\pm$ 0.04 ^{bc}	0.4 $\pm$ 0.05 ^c	0.4 $\pm$ 0.2 ^c	***
Ketones								
2-Heptanone	43, 58 ^q , 114	0.8 $\pm$ 0.4 ^a	1.0 $\pm$ 0.05 ^a	1.3 $\pm$ 0.2 ^a	4.4 $\pm$ 0.7 ^b	4.6 $\pm$ 0.6 ^b	6.4 $\pm$ 2.3 ^c	***
Acetoin	43, 45 ^q	6.5 $\pm$ 1.1 ^{ab}	9.21 $\pm$ 2.3 ^b	14.1 $\pm$ 1.4 ^c	12.8 $\pm$ 1.3 ^c	6.4 $\pm$ 0.4 ^{ab}	6.5 $\pm$ 3.4 ^{ab}	***
2-Undecanone	43, 58 ^q , 71	0.2 $\pm$ 0.02 ^a	0.2 $\pm$ 0.05 ^b	0.4 $\pm$ 0.2 ^a	1.9 $\pm$ 0.3 ^c	2.2 $\pm$ 0.4 ^{ab}	3.2 $\pm$ 1.2 ^{ab}	***
Terpene								

Limonene	68, 93 ^q , 121	1.1±0.1 ^b	0.5±0.03 ^a	0.5±0.08 ^a	0.8±0.1 ^a	0.8±0.1 ^a	0.55±0.4 ^b	**
<i>N-Heterocycle</i>								
1-Methyl-1 <i>H</i> -pyrrol	39, 53, 81 ^q	69.3±18.2 ^a	61.6±2.2 ^a	89.1±1.3 ^a	145.5±9.6 ^b	172.4±3.2 ^a	160.1±65.8 ^b	**
2-Methyl pyrazine	67, 94 ^q	3.2±0.25 ^a	0.8±0.07 ^a	7.4±0.5 ^a	52.3±6.4 ^b	134.7±61.0 ^{ab}	158.2±61.5 ^c	***
2,6-Dimethyl pyrazine	42, 81, 108 ^q	10.7±2.6 ^{ab}	1.5±0.1 ^a	17.7±1.3 ^{ab}	106.7±16.4 ^c	88.4±16 ^{bc}	261.1±110.3 ^d	**
2,3-Dimethyl pyrazine	67, 108 ^q	0.1±0.02 ^a	0.1±0.01 ^a	0.5±0.05 ^a	2.7±0.4 ^b	1.8±0.2 ^{ab}	8.8±3.1 ^c	**
2-Ethyl-5-methyl pyrazine	121, 122 ^q	1.8±0.5 ^a	0.06±0.01 ^a	1.4±0.2 ^a	5.4±0.6 ^a	4.9±0.9 ^a	23.4±8.6 ^c	***
2-Ethyl-6-methyl pyrazine	121 ^q , 122	-	0,05±0,08 ^a	2.9±0.15 ^a	15.2±2 ^b	15.4±2.7 ^b	42.5±16.8 ^c	***
Trimethyl pyrazine	42, 81, 122 ^q	1.1±0.2 ^a	0.2±0.02 ^a	3.4±0.3 ^{ab}	14.3±1.9 ^c	13.1±1.6 ^{bc}	39.8±14.6 ^d	***
2-Ethyl-3,5-dimethyl pyrazine	135 ^q	0.6±0.05 ^a	0.1±0.01 ^a	3.6±0.3 ^{ab}	10.9±1.6 ^{bc}	12.7±1.7 ^c	30.5±11.2 ^d	***
Pyrrole	39, 67 ^q	0.3±0.03 ^a	0.3±0.1 ^a	0.3±0.02 ^a	3.12±0.4 ^a	1.7±0.12 ^a	12.6±4.2 ^b	***
1 <i>H</i> -Pyrrole-2-carboxaldehyde	95 ^q	0.3±0.04 ^a	0.03±0.01 ^a	0.08±0.01 ^a	0.4±0.08 ^a	0.6±0.2 ^a	2.6±1.5 ^b	***
<i>Furans</i>								
2-Pentyl furan	53, 81 ^q , 138	9.4±1.1 ^a	4.9±0.3 ^a	6.4±0.8 ^a	10.9±1.1 ^a	13.5±2.5 ^{ab}	20.6±13.4 ^b	*
Furfurol	96 ^q	2.3±0.2 ^a	0.2±0.3 ^a	1.1±0.08 ^a	19.3±2.9 ^a	12.9±2.1 ^a	84.9±33.8 ^b	***
2-Furanmethanol	55, 111 ^q , 126	-	0.8±0.1 ^a	1.1±0.04 ^a	2.8±0.3 ^b	2.9±0.5 ^b	14.0±6 ^c	***
2(5H)-Furanone	55, 84 ^q	-	0.1±0.02 ^a	0.2±0.01 ^a	0.7±0.02 ^{ab}	0.9±0.36 ^b	1.98±0.9 ^c	***
Furaneol	85, 128 ^q	-	-	-	1.2±0.1 ^a	1.9±1.1 ^a	4.1±2.2 ^b	***

^q: Quantifier ion. Different letters in the same row at mean concentration values indicate significant differences ($p < 0.05$) as analyzed by Duncan test .

*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

Experimental

Sample preparation: Argan fruit {*Argania spinosa* (L.) Skeels} was collected during the summer of 2010 in the Ait Baha area (Morocco). Harvested argan fruit was crushed and pulped. Nuts were broken to afford kernels, which were divided into 6 batches. The first was not roasted, but the 5 others were roasted at 110°C using a mechanical roaster whose temperature was controlled using a Testo 945 sensor/thermometer (Testo, Casablanca,

Morocco), for 10, 15, 20 , 25 and 35 min. Then, each batch was separately mechanically cold-pressed using Komet DD 85 G presses (IBG Monforts Oekotec GmbH, Mönchengladbach, Germany) to afford virgin argan oil.

SPME sampling conditions: Analysis was performed as described by Baccouri *et al.* [25]. Each oil sample was spiked with 4-methyl-2-pentanone (internal standard) to a final concentration of 6.7 µg/kg. Then 1.5 g was introduced into a 10 mL vial fitted with a silicone septum. The vial was immersed in a water bath at 40°C and the oily solution maintained under magnetic stirring. After 2 min, a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber (50/30 µm, 2 cm long from Supelco Ltd., Bellefonte, PA) was exposed to the sample headspace for 30 min [35] and immediately desorbed for 2 min at 260°C in the gas chromatograph in splitless condition. All the analyses were performed in triplicate.

GC–MS analysis: GC/MS analysis was performed with a Shimadzu GC-2010 gas chromatograph equipped with a Shimadzu QP-2010 Plus quadrupole mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) and a DB-WAXETR capillary column (30m x 0.25 mm, 0.25 mm film thickness, (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA). The temperature program started at 40°C for 10 min, and increased at a rate of 3°C min⁻¹ to 200°C and held for 5 min. The carrier gas used was He at a flow-rate of 1mL min⁻¹. The injection port temperature was 260°C, the ion source temperature 240°C, and the interface temperature 230°C. Detection was carried out by electron impact mass spectrometry in total ion current (TIC) mode, using an ionization energy of 70 eV. The mass acquisition range was m/z 33–330. The identification of volatile compounds was confirmed by injection of pure standards, and by comparison of their retention indices (a mixture of a homologous series of C₅–C₂₈ was

used), MS data reported in the literature and in the database (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>).

Compounds for which pure standards were not available were identified on the basis of mass spectra and retention indices available in the literature. The relative concentration ($\mu\text{g/kg}^{-1}$ of oil) of the identified compounds was calculated by relating the areas of the internal standard by means of the quantifier ion (m/z 100) to the areas of the characteristic ions (quantifier ions) of each compound.

Statistical analysis: Significant differences among different roasted oils were tested by the one-way analysis of variance and the Duncan test for mean comparison. Statistical analyses were performed using the software package Statistica version 7 (Stat-Soft, Tulsa, OK, USA).

Acknowledgments - We thank the Slow Food Foundation for Biodiversity, Piedmont Region, and Association Ibn Al Baytar for their financial support. We are also grateful to the women of the Tighanimine co-operative. This work was realized in the frame of the emergency program of Université Mohammed V-Agdal, Project N°SCH 15/09.

References

- [1] Charrouf Z, Guillaume D. (2010) Should the Amazigh diet (regular and moderate argan-oil consumption) have a beneficial impact on human health? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **50**, 473-477.
- [2] El Monfalouti H, Guillaume D, Denhez C, Charrouf Z. (2010) Therapeutic potential of argan oil-A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **62**, 1669-1675.
- [3] Charrouf Z, Guillaume D. (1999) Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, **67**, 7-14.
- [4] Charrouf Z, Guillaume D. (2008) Argan oil, functional food, and the sustainable development of the argan forest. *Natural Product Communications*, **3**, 283-288.
- [5] Harhar H, Gharby S, Kartah B, El Monfalouti H, Guillaume D, Charrouf Z. (2011) Influence of argan kernel roasting-time on virgin argan oil composition and oxidative stability. *Plants Food for Human Nutrition*, **66**, 163-168.
- [6] Charrouf Z, El Halima H, Mallia S, Licitra G, Guillaume D. (2006) Influence of roasting and seed collection on argan oil odorant composition. *Natural Product Communications*, **1**, 399-404.
- [7] Angerosa F. (2002) Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **104**, 639-660.

- [8] Harhar H, Gharby S, Kartah B, El Monfalouti H, Charrouf Z, Guillaume D. (2010) Long argan fruit drying time is detrimental for argan oil quality. *Natural Product Communications*, **5**, 1799-1802.
- [9] Kalua CM, Allen MS, Bedgood DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K. (2007) Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, **100**, 273-286.
- [10] Koehler PE, Odell GV. (1970) Factors affecting the formation of pyrazine compounds in sugar-amine reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **18**, 895-898.
- [11] Maga JA. (1982) Pyrazines in foods: an update. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **16**, 1-48.
- [12] Shibamoto T, Akiyama T, Sakaguchi M, Enomoto Y, Massuda A. (1979) A study of pyrazine formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **27**, 1027-1031.
- [13] Hilali M, Charrouf Z, El Aziz Soulhi A, Hachimi L, Guillaume D. (2005) Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2081-2087.
- [14] Frankel EN. (1980) Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*, **19**, 1-22.
- [15] Rizzi GP. (2008) The Strecker degradation of amino acids: newer avenues for flavor formation. *Food Reviews International*, **24**, 416-435.
- [16] Choe E, Min BD (2006) Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **5**, 169-186.
- [17] Adamiec J, Rössner J, Velisek J, Cejpek K, Savel J. (2001) Minor Strecker degradation products of phenylalanine and phenylglycine. *European Food Research and Technology*, **212**, 135-140.
- [18] Maga J, Sizer CE. (1973) Pyrazines in foods. *CRC Critical Reviews in Food Technology*, **4**, 39-115.
- [19] Siegmund B, Murkovic M. (2004) Changes in chemical composition of pumpkin seeds during the roasting process for production of pumpkin seed oil (Part 2: volatile compounds). *Food Chemistry*, **84**, 367-374.
- [20] Baker GL, Cornell JA, Gorbet DW, O'Keefe SF, Sims CA, Talcott ST. (2003) Determination of pyrazine and flavor variations in peanut genotypes during roasting. *Journal of Food Science*, **68**, 394-400.
- [21] Matthäus B, Guillaume D, Gharby S, Haddad A, Harhar H, Charrouf Z. (2010) Effect of processing on the quality of edible argan oil, *Food Chemistry*, **120**, 426-432.
- [22] Frankel EN. (1982) Volatile lipid oxidation products. *Progress in Lipid Research*, **22**, 1-33.
- [23] Krishnamurthy RG, Smouse TH, Mookherjee BD, Reddy BR, Chang SS. (1967) Identification of 2-pentyl furan in fats and oils and its relationship to the reversion flavor of soybean oil. *Journal of Food Science*, **32**, 372-374.
- [24] Maga JA. (1979) Furans in foods. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **4**, 39-115.
- [25] Baccouri O, Bendini A, Cerretani L, Guerfel M, Baccouri B, Lercker G, Zarrouk M, Daoud Ben Miled D. (2008) Comparative study on volatile compounds from Tunisian and Sicilian monovarietal virgin olive oils. *Food Chemistry*, **111**, 322-328.

III- SYNTHESE DE L'ARTICLE 3

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressé à suivre la formation des composés volatils dans l'huile d'argane au cours du procédé de torréfaction des amandons selon une température appropriée. Le but était principalement d'identifier et quantifier les composés volatils pour chaque temps de torréfaction des amandons. Pour répondre à cet objectif, six échantillons de l'huile d'argane provenant des amandons torréfiés pendant 0, 10, 15, 20, 25 et 35 min, ont été étudiés.

Les composés volatils ont été extraits par la méthode de microextraction en phase solide (SPME), cette technique ne nécessite pas l'emploi de solvants ni d'appareil compliqué, elle est basée essentiellement sur le phénomène d'adsorption reposant sur un équilibre entre la matrice et le revêtement de la fibre. L'identification et la quantification des composés aromatiques ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-MS).

Les résultats de ce chapitre montrent bien que le procédé de torréfaction entraîne d'une manière significative la formation de certains composés volatils, et que cette étape apparaît comme l'étape clé pour obtenir l'arôme du produit final. Plusieurs composés sont formés au cours de la torréfaction, notamment les composés de la peroxydation lipidique, la dégradation Strecker et de réaction de Maillard, responsables de la formation des pyrazines, et l'autooxydation des acides gras. Cette étude pourrait permettre de régler l'arôme d'huile d'argane et peut-être répondre à de nouveaux types de consommateurs.

Notre étude met en évidence que le moment optimal généralement admis de la torréfaction de 20-25 minutes pour les amandons d'argane, correspond au temps nécessaire pour former ces composés spécifiques présentant les attributs de la saveur recherché.

Chapitre IV

Etude de l'effet de la consommation de l'huile
d'argane sur la teneur sérique en vitamine E
chez les femmes ménopausées

I- INTRODUCTION

Le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres et leur destruction par des systèmes de défenses anti-oxydantes. Les radicaux libres peuvent engendrer des graves dommages sur la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles: protéines, lipides et acides nucléiques.

Les radicaux libres sont capables de réagir avec différentes molécules, surtout lors de réactions en chaîne dont l'exemple le plus connu est celui de la peroxydation des lipides. La réactivité des radicaux de l'oxygène ne doit pas non plus être exagérée car elle est très variable selon la nature du radical.

Les dommages liés à un stress oxydant se traduisent par diverses altérations biochimiques intracellulaires telles que l'oxydation de l'ADN (Wiseman & Halliwell 1996; Marnett 2000; Cooke *et al.* 2003), des protéines (Refsgaard *et al.* 2000; Farber *et al.* 1990; Davies 2003), la perturbation de l'homéostasie du calcium intracellulaire (Farber *et al.* 1990) ou encore la peroxydation des lipides.

D'un autre côté, plusieurs processus de défense contre les radicaux libres existent de manière à contrer leurs effets néfastes sur les fonctions cellulaires. La première ligne de défense est leur captation par des systèmes non enzymatiques tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et le glutathion réduit, et plusieurs enzymes dont les plus importantes sont les enzymes superoxyde dismutases (SOD), la glutathion peroxydase, la catalase et les peroxiredoxines.

Des concentrations normales en antioxydants annulent le processus oxydatif et protègent les tissus. Par contre, lorsque cette première ligne de défense antioxydante n'est pas suffisante, des mécanismes secondaires sont appelés pour réparer les dommages subis et préparer les tissus contre les futures attaques oxydantes. Ces mécanismes incluent les gènes et les protéines induits par le stress tels que les protéines de choc thermique (heat shock proteins) et les enzymes de réparations oxydantes comme les glycosylases d'ADN qui sont activées une fois les dommages subis (Wei *et al.* 1998).

Lors du vieillissement, le stress oxydant augmente par accumulation des radicaux libres (Beckman & Ames 1998; Janqueira *et al.* 2004). Le stress oxydatif semble être maximal chez

les femmes ménopausées (Shrivastava et al. 2005; Signorelli et al. 2006; Pansini et al. 2008). Cette augmentation a été attribuée au processus de vieillissement. En effet, la ménopause est associée à une augmentation de la peroxydation lipidique et CAT, une diminution de la SOD et la glutathion peroxydase (Shrivastava et al. 2005; Signorelli et al. 2006; Pansini et al. 2008 ; Furukawa et al. 2004 ; Kaufert et al. 1986; Bednarek et al. 2001 ; Trevisan et al. 2001 ; Leal Herna'ndez et al. 2000).

La ménopause, commence entre 40 et 55 ans. L'OMS a défini la ménopause, en 1981, comme la cessation permanente des menstruations résultant de la perte de l'activité folliculaire ovarienne. La ménopause naturelle est considérée acquise après 12 mois d'aménorrhée pour laquelle on ne retrouve aucune explication physiologique ni pathologique. Aucun marqueur biologique n'était considéré à l'époque comme pertinent pour repérer la ménopause au moment de son occurrence, ce qui rendait son diagnostic rétrospectif. Les femmes ayant un antécédent d'ovariectomie bilatérale avec ou sans hystérectomie pouvaient être également considérées comme ménopausées (Report of a WHO Scientific Group 1981).

Une distinction entre ménopause naturelle et artificielle a été recommandée. La définition proposée pour la ménopause naturelle était une cessation des menstruations depuis plus de 12 mois sans qu'aucune autre cause n'ait pu être retrouvée (Kaufert et al. 1986). Celle pour la ménopause induite était la cessation de l'activité ovarienne suite à une intervention chirurgicale d'ovariectomie bilatérale avec ou sans hystérectomie, ou à une castration chimique ou radioinduite. Ces définitions ont été reprises par *l'International Menopause Society*, en 1999 (Utian 1999).

Les oestrogènes jouent un rôle régulateur pour des nombreux organes. Un déficit en oestrogènes lié à l'âge, déclenche de nombreuses réactions physiopathologiques. L'étude de Borras et al. (2003) a montré que les femmes ménopausées perdent le pouvoir antioxydant protecteur de l'oestrogène (Borras et al. 2003). Ainsi, la perte des hormones ovariennes est associée à l'augmentation de la formation de peroxyde dans les tissus systémiques. Des niveaux d'oestrogène différents sont responsables de la production des radicaux libres chez les femmes ménopausées (Vina et al. 2005).

On estime que 75-85% des femmes subissent certains ou tous les symptômes de la ménopause (MacLennan 2009; Appling et al. 2002). Parmi les symptômes liées au stress oxydatif se trouvent les bouffées de chaleur et de processus dégénératifs comme l'athérosclérose ou des

changements atrophiques de la peau ce qui suggère une accélération du vieillissement déclenché par un manque d'œstrogène.

Il a été généralement admis que l'hormonothérapie substitutive est le traitement le plus efficace des problèmes liés à la ménopause. Cependant, en raison des sérieux effets secondaires possibles du THS (notamment l'augmentation du risque de thromboses et de cancer du sein), les sociétés scientifiques et cliniques ainsi que des conseils officiels ont recommandé des restrictions de l'utilisation du THS (Palacios *et al.* 2003).

Afin d'améliorer la défense antioxydante des femmes ménopausées et pré-ménopausées, une nutrition adéquate, basée sur des bases simples et accessibles de l'équilibre alimentaire, est conseillée et peut contribuer à ralentir le risque de survenue de plusieurs événements pathologiques survenant surtout après la ménopause.

L'huile d'argane est caractérisée par sa composition particulière en tocophérols par rapport à d'autres huiles végétales. Ces composés, anti-radicaux libres, jouent un rôle essentiel dans la prévention de plusieurs maladies. En effet, des études ont montré que l'huile d'argane renforce le système de défense antioxydant en augmentant l'activité de la catalase chez le rat Wistar recevant un régime riche en fructose. Des études réalisées *in vivo* (Belcadi *et al.* 1994), ont montré d'une part, que l'ingestion de l'huile d'argane conduit à une modification des acides gras polyinsaturés membranaires, provoque la stimulation d'une activité enzymatique liée à la détoxification et à la défense antioxydante des cellules. Il s'ensuit une diminution de la susceptibilité membranaire à la peroxydation qui serait à l'origine du vieillissement selon certains auteurs (Sohal & Allen 1990; Ames & Shigenaga 1992; Harman 1992).

La vitamine E est l'antioxydant majeur parmi ceux qui sont présents dans les LDL; il est donc considéré comme la première ligne de défense contre l'oxydation (Reaven *et al.* 1993).

Certaines études montrent l'effet bénéfique de la vitamine E sur les maladies cardiovasculaires, le cancer et dans la prévention du déclin cognitif (Visioli *et al.* 1995; Wiseman *et al.* 1996).

Des études *ex-vivo* ont montré que la consommation de l'huile d'argane pourrait améliorer le statut antioxydant chez des hommes sains (Drissi *et al.* 2004 ; Cherki *et al.* 2005) . La première étude a montré que la consommation régulière d'huile d'argane diminue de manière

significative des peroxydes lipidiques plasmatiques (58,3%) et augmente de manière significative le rapport molaire du cholestérol α -tocopherol/total (21,6%) ainsi que la concentration de l' α -tocophérol (13,4%) par rapport à un groupe de non consommateurs (Drissi et al. 2004).

Le but de cette étude est d'évaluer l'effet de la consommation de 25 mL de l'huile d'argane alimentaire durant 8 semaines sur la vitamine E sérique, chez les femmes ménopausées, en comparant au groupe de consommatrices de l'huile d'olive.

Cette étude s'inscrit dans le cadre du projet **«Etude de l'efficacité de la consommation de l'huile d'argane sur le profil lipidique, et les statuts antioxydant et hormonal et détermination de l'effet hydratant et antirides de la peau chez les femmes ménopausées»** (ARFEM) se joint dans le Projet « Arganier : Valeur nutritive, médicale et cosmétique », financé par l'Académie Hassan II et par la Fondation Lepercq.

L'objectif d'ARFEM est de démontrer un réel bénéfice pour la santé et le bien être de la consommation régulière de l'huile d'argane chez les femmes ménopausées par:

- L'étude de l'efficacité de la consommation de l'huile d'argane sur le profil lipidique, et le statut antioxydant et le statut hormonal
- La détermination de l'effet hydratant de la peau chez les femmes ménopausées

Le protocole de l'étude adopté pour la réalisation de ce projet de recherche a été soumis pour approbation au comité d'éthique de l'Université Mohammed V Souissi.

Toutes les règles applicables au sujet de l'utilisation éthique de volontaires humains ont été suivies au cours de cette recherche. Le Comité d'Ethique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, a approuvé le protocole de recherche et les femmes participantes à l'étude ont signé un consentement préalable après explication de l'étude et de son protocole. Avant le début de l'étude, les femmes ont été sensibilisées à l'importance du respect du protocole de l'étude et de l'intervention nutritionnelle.

Argan oil and postmenopausal Moroccan women:

Impact on the vitamin E profile

Hanae El Monfalouti^{a,b}, Zoubida Charrouf^a, Asmaa El Hamdouchi^c, Hanane Labraimi^c, Badreddine Kartah^a, Khalid El Kari^c, Yahya Bensouda^d, Abdelfettah Derouich^f, Sylvie Dodin^e, Clément Denhez^b, Dom Guillaume^b, Hassan Agnaou^c

^a Laboratoire de chimie des plantes, Université Mohammed V-Agdal, Faculty of Science, BP1014 Rabat Morocco

^b URCA-CNRS UMR6229, School of Medicine-Pharmacy, 51 Rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France

^c Unité Mixte de Recherche en Nutrition-Alimentation, Kenitra, Morocco

^d Faculté de médecine et Pharmacie, Université Mohammed V, Soussi, Rabat

^e Département d'obstétrique et de gynécologie, Université Laval, Québec, Qc, G1V 0A6, Canada.

^f Laboratoire de Recherche sur les Lipoprotéines et l'Athérosclérose. Faculté des Sciences Ben M'sik, Université HassanII Mohammedia, Casablanca Morocco.

zcharrouf@menara.ma

Received: August 23rd, 2012; Accepted: October 3rd, 2012

Abstract

Vitamin E supplements could be beneficial for postmenopausal women. To evaluate the effect of edible argan oil consumption on the antioxidant status of postmenopausal women, the vitamin E serum level of 151 menopausal women consuming either olive or argan oil was determined. Serum level of vitamin E was increased in the argan oil consumer group. Therefore an argan oil-enriched diet can be recommended help to prevent some of the postmenopausal disorders.

Keywords: Argan oil, postmenopausal women, antioxidant, vitamin E.

Many problems can impair the health of the elderly. These can result from poor living conditions and from inevitable natural processes. Menopause-associated health problems belong to the second type. Hormone replacement therapy (HRT) is the treatment of choice for the prevention or cure of these problems for women using allopathic medicine. Because long-term HRT can induce adverse effects, such as increased risk of breast cancer and coronary heart disease [1], large numbers of women turn to alternatives such as specific herbal supplements [2], dietary supplementation [3,4], antioxidants [5], and traditional diets [6]. Mediterranean and Amazigh diets are two ancestral diets frequently presented as being highly beneficial for human health, in the long-term [6,7].

Mediterranean and Amazigh diets use olive and argan oil, respectively, as their lipid source [8]. Both oils are rich in unsaturated fatty acids (Table 1) and general considerations regarding their respective advantages as edible oils have recently been reported [9,10]. Argan oil, whose fame is more recent than that of olive oil, has become the topic of intensive biological research and its pharmacological properties are currently actively being investigated on animal models [11-13] and in humans [14-17].

Argan oil is traditionally presented as advantageously influencing menopausal symptoms. The association of vitamin E with other products of natural origin is known to have a positive effect on menopause symptoms [18]. However, it has recently been hypothesized that vitamin E supplements in the form of α -tocopherol could have negative effects on bone formation via γ -tocopherol serum suppression [19]. Therefore, argan oil, with its high content of γ -tocopherol, phytosterols, and polyphenols (Table 1) [20] could represent an interesting and easily available diet supplement.

Whereas the effects of antioxidant vitamin supplements on coronary atherosclerosis in postmenopausal women have already been studied [21], little is known concerning the effect of natural nutrient-rich argan oil. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of edible argan oil consumption on vitamin E serum level in postmenopausal women and the primary endpoints of the study were the changes from baseline in vitamin E (α -tocopherol) after 8 weeks of oil consumption compared with values from an olive oil consumer group.

Table 1: Average composition of virgin argan oil (VAO) and virgin olive oil (VOO) [21, 22].

	VAO	VOO
	Fatty acids (%)	
Saturated fatty acids	18.5	13.2
Unsaturated fatty acids	78.6	84.9
	Sterols (mg/100 g)	
	295	319
	Tocopherols (mg/kg)	
Alpha	35	190
Gamma	480	26
Total	636	257
	Phenolic compounds (μg/kg)	
	3 263	795 983

A total of 151 postmenopausal women of average age 55.5 ± 6.2 years completed the study. Women were randomly distributed in two groups: 77 women received olive oil and 74 argan oil. Women included in the study were not taking estrogen, steroids, or osteoporosis medication. They were free from kidney and liver disease, cancer, and rheumatoid arthritis. Baseline characteristics of the population are presented Table 2.

Table 2: Initial characteristics of the studied population

	Argan oil group	Olive oil group
Population	77	74
Age (year)	55.5 ± 6.1	55.4 ± 6.1
Size (meter)	1.58 ± 0.05	1.58 ± 0.06
Weight (kg)	69.6 ± 10.9	70.1 ± 10.4
BMI*	27.7 ± 4.3	28.4 ± 4.1

Heart rate per mn	71±8	71±9.1
SBP* (mm Hg)	125±13	123±14
DBP* (mmHg)	81±8	83±9
HP* (%)	32.5	24
Cholesterol (g/L)	2.1±0.3	2.1±0.3
HDL (g/L)	0.58±0.15	0.58±0.13
LDL (g/L)	1.34±0.31	1.29±0.32
Triglycerides (g/L)	1.1±0.5	1.06±0.46
BGL* (g/L)	0.96±0.01	0.95±0.09

* BMI: Body mass index, SBP: Systolic blood pressure, DBP: Diastolic blood pressure, HP: Hypertension prevalence, BGL: Blood glucose level.

Results of the determination of vitamin E in blood samples from both groups show a significant increase ($P = 0.02$) in vitamin E blood concentration for the women belonging to the argan group (Table 3). Initial average vitamin E concentration was $10.0 \pm 5.4 \mu\text{mol/L}$ and $12.9 \pm 6.9 \mu\text{mol/L}$ for the argan and olive oil consumers, respectively. After 4 weeks of daily argan oil consumption (25 mL/day), vitamin E blood concentration went up to $11.3 \pm 5.8 \mu\text{mol/L}$ to finally reach the value of $12.7 \pm 5.6 \mu\text{mol/L}$ after 8 weeks. In the olive oil consumer group, vitamin E blood level ($P = 0.835$) did not significantly increase, going from $12.9 \pm 6.9 \mu\text{mol/L}$ to $13.2 \pm 7.3 \mu\text{mol/L}$ over the same period.

Table 3: Vitamin E blood concentration ($\mu\text{mol/L}$) during the intervention.

	Argan oil*	Olive oil*
Initial	10.04 ± 5.44^a	12.87 ± 6.95
Week 4	$11.26 \pm 5.79^{a,b}$	13.56 ± 6.46
Week 8	12.66 ± 5.59^b	13.21 ± 7.26
P	0.02	0.85 (NS)

* Mean $\pm$ SD, P, significantly different from baseline, Values indexed with a different letter within the same column are significantly different.

The significant increase in vitamin E in the serum of women belonging to the argan oil group is necessarily due to argan oil high tocopherol-content (Table 1). Indeed, argan oil contains 600 to 900 mg/kg tocopherols vs only 260 mg/kg for olive oil [24]. Vitamin E is the major

lipid-soluble radical-trapping antioxidant in blood [25] and LDL [26]. It is frequently considered to be the first line of defense against oxidation [15]. Additionally, vitamin E increases the release of prostacyclin, which promotes blood vessel dilatation and reduces platelet aggregation [27] and, interestingly for menopausal women, it also lowers the frequency of hot flushes [28].

Therefore, an increase in vitamin E serum level should be highly beneficial for menopausal women. In addition, not only is argan oil richer than olive oil in tocopherol but tocopherol distribution within argan and olive oil is different. In argan oil, the main tocopherol is γ -tocopherol (480 mg/kg) while the α -tocopherol content is 35 mg/kg [24]. Conversely, in olive oil the main tocopherol is α -tocopherol (190 mg/kg) while the γ -tocopherol content is only 26 mg/kg. Therefore, virgin argan oil can be considered as the prototype of γ -tocopherol-rich oil and olive oil as a prototype of α -tocopherol-rich oils. γ -Tocopherol supplementation has already been shown to induce an increase in both α - and γ -tocopherol in humans [29]. Since only γ -tocopherol presents an interesting anabolic effect on bone, γ -tocopherol supplementation should be specifically recommended for menopausal women. Therefore, it is very likely that the increase in blood tocopherol level resulting from a regular consumption of argan oil has a beneficial impact on postmenopausal women.

A diet with a high consumption of vegetables, nuts, and foods rich in carbohydrate has recently been suggested to improve the quality of the diet of possibly vitamin E-deficient menopausal women [30].

Our results clearly show that an argan oil supplement, at a daily dose of 25mL, is an easy way to increase vitamin E serum level and consequently to reduce some postmenopausal symptoms.

Experimental

General: This clinical trial was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine and Pharmacy of Rabat. Women enrolled in the study signed a consent form after explanation of the study and its protocol. Before the start of the study, women were aware of the importance of compliance with the study protocol and nutritional intervention.

Study design and protocol: An exploratory 8-week randomized clinical trial was designed to assess the effects of daily consumption of 25g of argan oil on vitamin E serum content. The primary endpoints of the study were the changes from baseline in vitamin E after 8 weeks of oil consumption compared with values from an olive oil consumer group taking the same amount of oil and the same time of study. A two-week stabilization period preceded the study; this consisted of a diet based on the consumption of 25g of non-hydrogenated margarine as the only lipid source.

Distribution of the two groups was made by drawing lots. One group received 25mL of argan oil to be consumed daily during the treatment period of 8 weeks. Argan and olive use during the whole study was from a single batch provided by the woman's cooperative of Ait Baha for argan oil, les huileries du Souss for olive oil, and Foundation Lepercq for margarine.

On the first consultation, a complete medical history was taken and clinical examination was performed. Weight and height were measured at baseline and at 8 weeks of treatment.

Blood samples obtained in the morning were drawn after 12 h of fasting. Blood samples were placed in vials, identified and centrifuged. Samples were stored at -80°C until analysis. Determination of vitamin E was made using methods described in the literature with slight modification [31]. Briefly, 0.8 mL of serum was mixed with 0.8 mL of ethanol containing internal standard (BHT), vortexed and extracted twice with 2 mL of methylene chloride-*n*-hexane (1:5) containing butylated hydroxytoluene as internal standard. Organic phases (2 mL) were pooled, evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 37°C and reconstituted by addition of 0.2 mL of methanol prior to being injected (20 µL) into a Varian HPLC

instrument. The chromatographic system consisted of a C18 column (25x4.5 cm, 5µm). Elution gradient was acetonitrile–methanol (17:3) for 5 min then acetonitrile–dichloromethane–methanol (7:2:1) for 20 min. Flow rate was 1.8 mL min⁻¹. Detection was carried out using a UV-VIS detector Spectra-series UV 150 set at 297 nm.

Statistical analyses: Statistical analysis was performed using the software Statistical Package for “the Social Science” (SPSS, version 11.0). The Mann-Whitney test was used to compare the two groups in the selection phase and intervention. The Wilcoxon test was used to compare the difference of each parameter within each group between the selection and response. *P* is considered significant when <0.05. Results are expressed as mean ± standard deviation.

Acknowledgments - We are indebted to Academy Hassan II of Science and Technology, Foundation Lepercq and Association Ibn Al Baytar for their support. We are grateful to les huileries du Souss for the gift of non-hydrogenated margarine and olive oil. Finally we are thankful to the volunteer postmenopausal women who enthusiastically participated in this trial.

References

- [1] Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the women’s health initiative randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*, **288**, 321-333.
- [2] Lee MS, Shin BC, Yang EJ, Lim HJ, Ernst E. (2011) Maca (*Lepidium meyenii*) for treatment of menopausal symptoms: A systematic review. *Maturitas*, **70**, 227-233.
- [3] Cuneo F, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM, Morais SS, Amaya-Farfan J. (2010) Effect of dietary supplementation with collagen hydrolysates on bone metabolism of postmenopausal women with low mineral density. *Maturitas*, **65**, 253-257.
- [4] Dennehy C, Tsourounis C. (2010) A review of select vitamins and minerals used by postmenopausal women. *Maturitas*, **66**, 370-380.
- [5] Yoshihara D, Fujiwara N, Suzuki K. (2010) Antioxidants: benefits and risks for long-term health. *Maturitas*, **67**, 103-107.

- [6] Pérez-Lopez FR, Chedraui P, Haya J, Cuadros JL. (2009) Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas*, **64**, 67-69.
- [7] Charrouf Z, Guillaume D. (2010) Should the Amazigh diet (regular and moderate argan-oil consumption) have a beneficial impact on human health? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **50**, 473-477.
- [8]. El Monfalouti H, Guillaume D, Denhez C, Charrouf Z. (2010) Therapeutic potential of argan oil-A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **62**, 1669-1675.
- [9] Guillaume D. (2011) The Mediterranean diet: A cultural journey. *Lancet*, **378**, 766-767.
- [10] Gharby S, Harhar H, El Monfalouti H, Kartah B, Maata N, Guillaume D, Charrouf Z. (2012) Chemical and oxidative properties of olive and argan oils sold on the Moroccan market. A comparative study. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, **5**, 31-38.
- [11] Berrougui N, Alvarez de Sotomayor M, Pérez-Guerrero C, Ettaïb A, Hmamouchi M, Marhuenda E, Herrera MD. (2004) Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, **92**, 921-929.
- [12] Benajda N, Morel S, De Leiris J, Boucher F, Charrouf Z, Moktar N, Aguenau H. (2002) The effect of argan oil on heart function during ischemia and reperfusion. *Thérapie*, **57**, 246-252.
- [13] Mekhfi H, Gadi D, Bnouham M, Ziyat A, Legssyer A, Aziz M. (2008) Effect of argan oil on platelet aggregation and bleeding time: a beneficial nutritional property. *Journal of Complementary & Integrative Medicine*, **5**, 1-13.
- [14] Derouiche A, Cherki M, Dissi A, Bamou Y, El Messal M, Idrissi-Oudghiri A. (2005) Nutritional intervention study with argan oil in man: Effects on lipids and apolipoproteins. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **49**, 196-201.
- [15] Drissi A, Girona J, Cherki M, Godas G, Derouiche A, El Messal, Saïle R, Kettani A, Solà R, Masana L, Adlouni A. (2004) Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clinical Nutrition*, **23**, 1159-1166.
- [16] Cherki M, Derouiche A, Drissi A, El Messal M, Bamou Y, Idrissi-Oudghiri A, Khalil A, Adlouni A. (2005) Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **15**, 352-360.
- [17] Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, Khalil A. (2006) Phenolic-extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits human low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis*, **184**, 389-396.
- [18] Aidelsburger P, Schauer S, Grabein K, Wasem J. (2012) Alternative methods for the treatment of postmenopausal troubles. *GMS Health Technology Assessment*, **8**: Doc03, doi: 10.3205/hta000101.
- [19] Hamidi MS, Corey PN, Cheung AM, (2012) Effects of vitamin E on bone turnover markers among US postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*, **27**, 1368-1380.
- [20] Charrouf Z, Guillaume D. (2008) Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 632-636.
- [21] Waters DD, Alderman EL, Hsia J, Howard BV, Cobb FR, Rogers WJ, Ouyang P, Thompson P, Tardif JC, Higginson L, Bittner V, Steffes M, Gordon DJ, Proschan M, Younes N, Verter JI. (2002) Effects of hormone replacement therapy and antioxidant vitamin supplements on coronary atherosclerosis in

- postmenopausal women a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association*, **288**, 2432-2440.
- [22] Khallouki F, Younos C, Soulimani R, Oster T, Charrouf Z, Spiegelhalder B, Bartsch H, Owen RW. **(2003)** Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European Journal of Cancer Prevention*, **12**, 67-75.
- [23] Charrouf Z, Guillaume D. **(1999)** Ethnoeconomical, ethnomedical and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *Journal of Ethnopharmacology*, **67**, 7-14.
- [24] Rahmani M. **(1999)** Composition chimique de l'huile d'argane «vierge». *Cahiers Agriculture*, **14**, 461-465.
- [25] Brigelius-Flohé R, Traber MG. **(1999)** Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, **13**, 1145-1155.
- [26] Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G. **(1991)** Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **53**, 314S-321S.
- [27] Dennehy C, Tsourounis C. **(2010)** A review of select vitamins and minerals used by postmenopausal women. *Maturitas*, **66**, 370-380.
- [28] Barton DL, Loprinzi CL, Quella SK, Sloan JA, Veeder MH, Egner JR, Fidler P, Stella PJ, Swan DK, Vaught NL, Novotny P **(1998)** Prospective evaluation of vitamin E for hot flushes in breast cancer survivors. *Journal of Clinical Oncology*. **16**, 495-500.
- [29] Cherki, M, Derouiche A, Drissi A, El Messal M, Bamou Y, Idrissi-Ouadghiri A, Khalil A, Adlouni A. **(2005)** Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention in healthy men. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. **15**, 352-360.
- [30] García-Arenzana N, Navarrete-Muñoz EM, Vázquez-Carrete JA, Moreno MP, Vidal C, Salas D, Ederra M, Pedraz C, Collado-García F, Sánchez- Contador C, González-Román I, García-López M, Miranda J, Peris M, Moreo P, Santamaría C, Pérez-Gómez B, Vioque J, Pollán M. **(2011)** Compliance with current dietary recommendations and geographical variability of diet in women participating in 7 screening programs for breast cancer in Spain. *Nutrición Hospitalaria*, **26**, 863-873. In Spanish.
- [31] Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Blanco-Navarro I, Blázquez-García S, Pérez-Sacristán B. **(2006)** Simultaneous determination of vitamins A, E and 25-OH-vitamin D: Application in clinical assessments. *Clinical Biochemistry*, **39**, 180-182.

III- SYNTHESE DE L'ARTICLE 4

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'effet de la consommation de l'huile d'argane, en comparaison avec l'huile d'olive, sur la teneur sérique en vitamine E chez les femmes ménopausées pendant 8 semaines.

Les résultats de cette intervention pour les deux groupes montrent bien une augmentation significative ($p = 0,02$) de la concentration sanguine en vitamine E chez les femmes appartenant au groupe d'argane. Sachant que la concentration initiale moyenne de la vitamine E était $10,04 \pm 5,44 \mu\text{mol} / \text{L}$ et à $12,87 \pm 6,95 \mu\text{mol} / \text{L}$ pour les consommatrices de l'huile d'argane et l'huile d'olive respectivement. Après 4 semaines de la consommation d'huile d'argane, la concentration sérique en vitamine E a augmenté à $11,26 \pm 5,79 \mu\text{mol} / \text{L}$ pour atteindre finalement la valeur de $12,66 \pm 5,59 \mu\text{mol} / \text{L}$ au bout de 8 semaines. Dans le groupe des femmes ménopausées consommatrices de l'huile d'olive, le niveau de vitamine E dans le sang ($P = 0,835$) n'a pas augmenté significativement, passant de $12,87 \pm 6,95 \mu\text{mol} / \text{L}$ à $13,21 \pm 7,26 \mu\text{mol} / \text{L}$ au cours de la même période.

Ces résultats confirment pour la première fois l'effet bénéfique de la consommation l'huile d'argane sur la teneur sérique en vitamine E. A cet effet, il serait intéressant d'évaluer l'effet de la consommation de l'huile d'argane sur les différent marqueurs antioxydants comme les enzymes et les systèmes non enzymatiques, ainsi que d'agrandir l'effectif des femmes ménopausées et d'élargir la durée d'intervention.

Chapitre V

Etude préventive des photodommages de l'ADN par
l'huile d'argane

I- INTRODUCTION

La lumière UV est un rayonnement électromagnétique émis par le soleil, invisible à l'œil humain. Elle a des effets délétères sur la peau humaine, y compris les coups de soleil, la suppression immunitaire, en plus du vieillissement accéléré de la peau et le cancer (Jones et *al.*, 1999; Offord et *al.*, 2002 ; Moon et *al.*, 2008 ; Norval 2001; Wlaschek et *al.*, 2001). L'UVB, en particulier, une composante mineure de lumière solaire atteignant la surface de la terre, est la lumière la plus énergique pour induire le cancer de la peau, et peuvent provoquer des dommages à l'ADN et générer des photoproduits, principalement dans les sites de pyrimidine en tandem comme pyrimidine cyclobutane photoproduits dimères (CPD), pyrimidine (6-4) pyrimidone ((6-4)PP), et Dewar qui induisent une mutation dans les cellules épidermiques, menant à l'élaboration des cellules cancéreuses (Katiyar et *al.*, 2001; Fisher et *al.*, 2002; Ding et Wang 2003).

Les plantes ont été utilisées dans les médicaments et les produits cosmétiques depuis des siècles. Leur capacité à traiter les maladies de la peau, pour orner et d'améliorer l'apparence de la peau est bien connue. Comme les rayons UV peuvent causer des coups de soleil, les rides, réduire l'immunité contre les infections, le vieillissement prématuré et le cancer, il ya besoin permanent de protection contre les rayons UV et la prévention de leurs effets secondaires (Radava R. Korać et Khambholja, 2011).

Les plantes ont un potentiel élevé de molécules antioxydantes. En effet, les antioxydants tels que les vitamines (vitamine C, vitamine E), de flavonoïdes et les acides phénoliques jouent le rôle principal dans la lutte contre des radicaux libres qui sont la principale cause des nombreux changements cutanés négatifs. Bien que les composés de plantes isolées aient un potentiel élevé en matière de protection de la peau, les extraits des plantes ont montré un meilleur potentiel dû à leur composition complexe. L'utilisation traditionnelle des plantes dans les médicaments est la base de recherches actuelles et font de nouvelles tendances dans les cosmétiques.

Dans un criblage pour trouver les agents photoprotecteurs caractéristiques et efficaces, des produits dérivés des plantes ont été étudiées pour leur activité antioxydante, par conséquent l'utilisation d'antioxydants naturels dans les produits commerciaux de soins de la peau est en forte augmentation (Korać et Khambholja, 2011). Aujourd'hui, on observe la composition

chimique des plantes médicinales pour déterminer ce qui pourrait être responsable chimiquement et pharmacologiquement de ces effets. Les composés antioxydants naturels sont largement utilisés dans la médecine traditionnelle et comprennent les tocophérols, les flavonoïdes, acides phénoliques, les composés contenant de l'azote (indoles, des alcaloïdes, des amines et acides aminés) et les monoterpènes. La supplémentation en antioxydants a été montrée pour simuler la chaîne antioxydante de la peau, de ce fait, la formulation à base des plantes et riche en antioxydants offre des pistes intéressantes pour des recherches futures (Bensouilah J et *al.*, 2006), plusieurs molécules actives nouvelles ont été découvertes et il y a beaucoup plus à découvrir (Dweck AC et *al.*, 2002).

L'huile d'argane a été utilisée dans la médecine traditionnelle marocaine depuis des siècles pour guérir les maladies de la peau (Bellakhdar, J., 1997), et pour guérir toutes sortes de boutons d'acné. Elle est recommandée de réduire les problèmes de la peau sèche et de ralentir l'apparition des rides. Elle est également utilisée en rhumatisme. L'huile d'argane est utilisée comme une lotion pour la peau et appliquée sur la zone à être guéri (Zoubida Charrouf et Dominique Guillaume, 1999). En revanche, aucune étude scientifique n'a été effectuée auparavant pour le traitement des maladies de peau par l'huile d'argane, et particulièrement évaluer son effet protecteur contre les dommages induits par UV.

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer, *in vitro*, l'effet photoprotecteur de l'huile d'argane en la comparant avec l'huile d'olive contre les dommages de l'ADN provoqués par les rayons UV, à l'aide des molécules synthétisés thymidylyl-(3', 5')-thymidine (TpT) analogue d'ADN. Avant de détailler cette étude, nous allons présenter des généralités sur les dommages causés par UV.

II- GENERALITES

II-1 Le cancer de la peau

Au cours des dernières décennies, le taux d'incidence du cancer de la peau a augmenté à un taux stupéfiant et plus rapidement qu'aucun autre type de cancer (Moan et *al.*, 2008). L'effet de la lumière solaire sur le développement de cancers de la peau est connu depuis fort longtemps et a été mise en évidence par Paul Gerson Unna en 1894. Ayant la capacité

d'initier et promouvoir la croissance des tumeurs, les ultraviolets (UV) de la lumière solaire sont des carcinogènes complets (Soehnge, H., 1997; Rigel, 2008 ; Claerhout, 2006).

Les ultraviolets B (UVB), en pénétrant dans la couche la plus profonde de l'épiderme, agissent directement sur les cellules souches à l'origine de la peau normale et sur l'ADN en y créant des lésions. Ils induisent aussi la production de radicaux libres par les phaeomélanines. Les études menées par Alain Sarazin, directeur du laboratoire de génétique moléculaire de CNRS à Villejuif (France), montrent que les UVA, même s'ils n'attaquent pas directement l'ADN, induisent également la production de radicaux libres pouvant à leur tour endommager l'ADN.

Heureusement nos cellules sont normalement pourvues de systèmes de réparation de l'ADN. Mais lorsque ces lésions sont trop nombreuses ou qu'elles s'accumulent à un rythme trop élevé, les systèmes de réparation sont débordés. Les lésions non réparées engendrent des mutations. Certaines cellules mutées peuvent se diviser de manière anarchique, dégénérant en cancers. Cet effet néfaste ne se manifeste qu'après une accumulation de mutations dans les cellules, dix à trente ans après les premières atteintes, et illustre l'effet non protecteur de l'organisme.

II-2 Les rayonnement Ultraviolets

Les rayonnements ultraviolets du soleil arrivent en permanence à la surface de la Terre. Ces rayonnements peuvent être divisés en 3 classes (A, B et C) suivant leur longueur d'onde (de 400 à 100 nm). Les UVA correspondent aux longueurs d'onde allant de 315 à 400 nm et représentent 95 % des ultraviolets solaires parvenant à la surface de la Terre. Les UVB correspondent aux longueurs d'onde allant de 280 à 315 nm et représentent 5 % des UV solaires parvenant à la surface de la Terre. Les UVC correspondent aux longueurs d'onde allant de 100 à 280 nm. Ce sont les ultraviolets les plus agressifs, mais ils sont absorbés totalement par la couche d'ozone (figure 16). De plus, l'exposition aux ultraviolets varie considérablement en fonction de l'altitude et de la localisation géographique (McKenzie et *al.*, 2007; Roy, C.R., et *al.*, 1998).

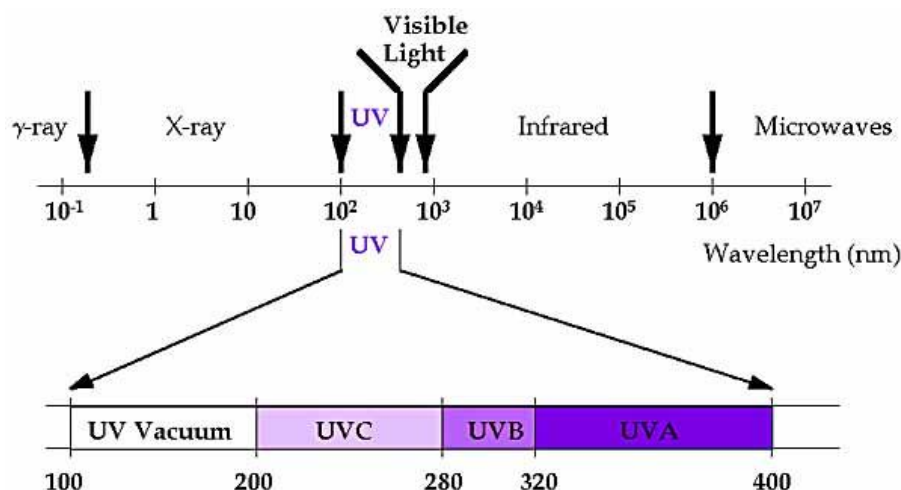


Figure 16: Le spectre électromagnétique solaire

La réaction aiguë de la peau humaine vis à vis de l'irradiation UVB implique l'érythème, œdème et pigmentation suivie par le bronzage retardé, l'épaississement de l'épiderme et du derme, et la synthèse de la vitamine D. Les effets chroniques de l'UVB étant le photovieillissement, l'immunosuppression, et la photocarcinogénèse (Kullavanijaya P. et *al.*, 2005; Gil EM et Kim TH, 2000).

Des produits de soins de la peau pour une protection contre les UV peut être utilisé pour réduire les effets nocifs de ces rayonnement et / ou les supprimer totalement. Par conséquent, la protection contre les UV devient une fonction importante de plusieurs types de formulations cosmétiques.

II-3 L'ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est une molécule, dont la structure en "double hélice" (S. Elrod, W. Standfield, 2003), est formée par une succession de petites unités appelées nucléotides (M. Levitt, 1972). Un nucléotide est constitué de trois éléments : une molécule d'acide phosphorique, un sucre et une base organique nucléique (Figure 17). Dans le cas de l'ADN, le sucre est le désoxyribose d'où son nom : Acide (phosphorique) Desoxyribo (se) Nucléique. Les bases, quant à elles, sont au nombre de quatre : la Thymine (T), la Cytosine (C), et la Guanine (G), l'Adénine (A) (G. Karp, 2004) (Figure 18).

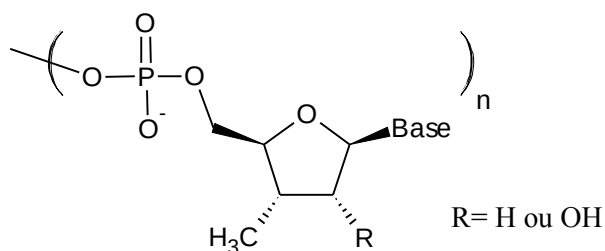


Figure 17 : Structure de nucléotide naturel

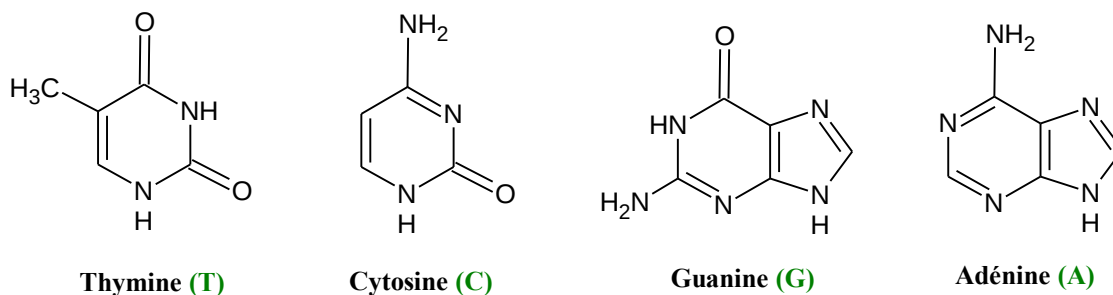


Figure 18: Les bases nucléiques de l'ADN

L'ADN contient l'information nécessaire au développement et au fonctionnement de tous les organismes vivants. Elle assure la transmission de l'information génétique, et la synthèse des protéines, composants essentiels dans le fonctionnement de quasiment tous les processus biologiques. Cependant l'ADN peut être endommagé selon plusieurs mécanismes, conduisant à l'apparition de lésions dans le génome. Parmi ces facteurs on peut citer l'agression induite par les rayons UV. Les lésions de l'ADN peuvent avoir des conséquences néfastes puisqu'elles modifient l'information génétique.

II-4 Les lésions de l'ADN induites par les UV

L'irradiation UV peut être absorbée par de nombreuses biomolécules cellulaires telles que les protéines, l'ARN et l'ADN, provoquant ainsi une réponse cellulaire très complexe.

L'énergie des photons UVB, directement absorbée par l'ADN, peut en effet altérer certaines bases de l'ADN. En particulier, il arrive que deux bases pyrimidiques adjacentes établissent des liaisons chimiques entre elles, formant alors des dimères. Au moment de la division de la cellule, lorsque les enzymes chargées de recopier l'ADN arrivent à cet endroit et rencontrent ce composé inconnu, elles ne peuvent que se « tromper ». L'ADN dupliqué n'est donc pas

une copie parfaite de l'original : il y a eu mutation. Selon leur nature et le gène dans lequel elles surviennent, certaines de ces mutations peuvent provoquer des cancers.

L'induction de lésions à l'ADN constitue sans aucun doute la conséquence biologique la plus critique lors d'une exposition aux ultraviolets. L'absorption de l'ADN ayant un maximum à 260 nm et s'étalant jusqu'à 290-300 nm, (Tornaletti, S. et G.P. Pfeifer, 1996; Pattison, D.I. et M.J. Davies, 2006). De ce fait, les UV-B sont de 3 à 4 ordres de grandeur plus cytotoxique et mutagène que les UV-A par unité de dose (J/m²). Par conséquent, les UV-B constituent le principal facteur étiologique à l'origine du cancer de la peau (Melnikova, V.O. et H.N. Ananthaswamy, 2005).

À de courtes longueurs d'ondes (UV-C et UV-B), les photons hautement énergétiques peuvent être directement absorbés par l'ADN et ainsi conduire à l'excitation des bases pyrimidiques thymine et cytosine. Il se forme notamment des photoproduits dont les plus fréquents impliquent des liaisons covalentes entre deux pyrimidines adjacentes (Cadet, J., Sage, E. et Douki, T., 2005 ; Courdavault et *al.*, 2005).

Les deux principaux types de photoproduits alors formés sont les dimères cyclobutyliques de pyrimidines (CPDs) et les adduits pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4PPs).

Les CPDs sont générés lorsque les carbones 5 et 6 de chaque pyrimidine se lient de façon covalente pour former une structure cyclique, ils peuvent se former entre deux thymines (T) adjacentes, entre deux cytosines (C) ou entre une thymine et une cytosine. Cependant, les CPDs entre deux thymines sont les plus fréquents (environ 40%) après une irradiation UVB de peau ou de kératinocytes en culture (Mouret, S. et *al.*, 2006). Pendant de nombreuses années, les UVA ont uniquement été associés à la formation de bases oxydées dans l'ADN. Cependant, une irradiation UVA de fibroblastes produit six fois plus de CPDs que de 8-oxoG (Courdavault et *al.*, 2004). En effet, les UVA conduisent à 80% à la formation de CPDs entre deux thymines.

Ainsi, on observe que les réactions de dimérisations aux sites TT et TC sont environ dix fois supérieures à celles observées aux sites CC et CT, les CPDs se formant préférentiellement en TT et les 6-4PPs en TC (Douki, T. et J. Cadet, 2001 ; Cadet, J., E. Sage, et T. Douki, 2005).

Les adduits pyrimidine (6-4)-pyrimidone, plus communément appelés photoproduits (6-4) (6-4 PP) résultent de la formation d'un lien entre le carbone 6 de la pyrimidine en 5' avec le carbone 4 de la pyrimidine en 3' (Figure 19). Les 6-4 PP apparaissent le plus souvent entre T et C. Une irradiation UVB de fibroblastes entraînent la formation de cinq fois plus de CPDs que de 6-4 PP (Mouret, S. et *al.*, 2008).

Si l'irradiation UV se prolonge, les photoproduits (6-4) peuvent ultérieurement subir une transformation en leur isomère de valence, l'isomère Dewar (Cadet, J., Sage, E. et Douki, T., 2005). (Figure 19). Or, si les 6-4PPs sont rapidement réparés par la cellule, leurs isomères Dewar le sont en revanche peu, d'où leur caractère hautement mutagènes. Des résultats récents suggèrent en outre que ce sont les UVA, plutôt que les UVB, qui sont responsables de cette isomérisation (Kvam, E. and R.M. Tyrrell, 1997).

Les dimères de pyrimidine (CPDs et 6-4PPs) sont les lésions dominantes induites par les ultraviolets et sont reconnus pour leur implication dans le développement du cancer de la peau.

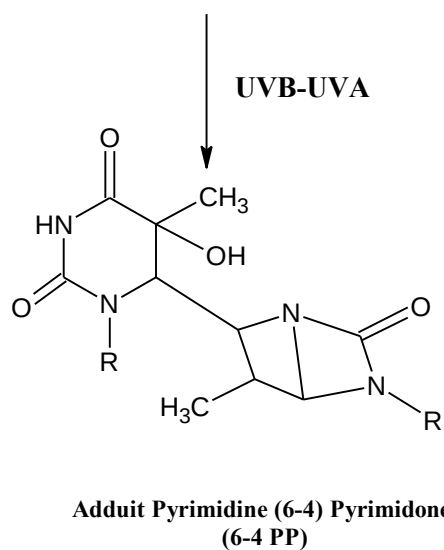
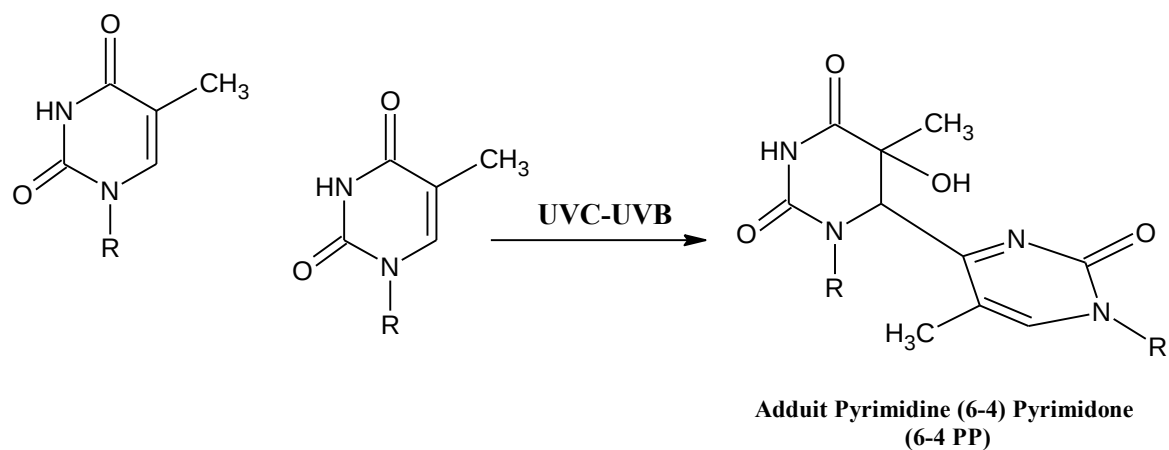
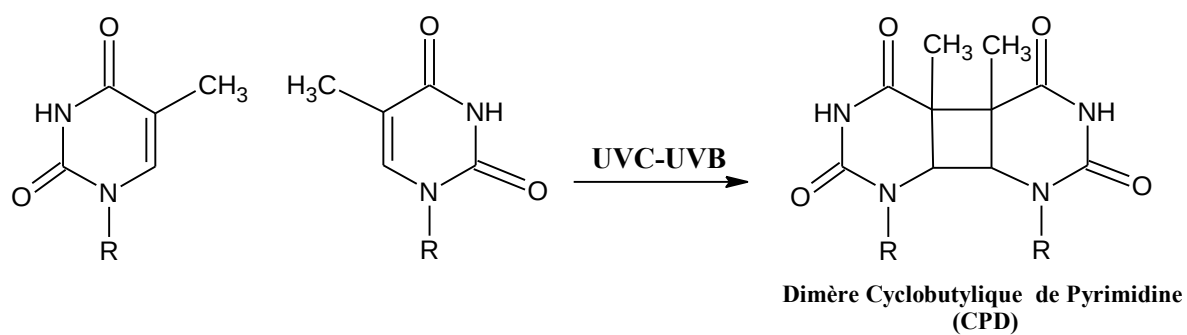


Figure 19 : Les principaux photoproduits induits par les ultraviolets au niveau des sites TT

III- MATERIELS ET METHODES

III-1 Produits chimiques

Les solvants utilisés pour l'extraction sont de qualité « pour synthèse » (SDS). Lors de la synthèse, certains solvants ont été rendu anhydres en présence de sodium (méthanol) et l'hydruure de calcium (acétonitrile).

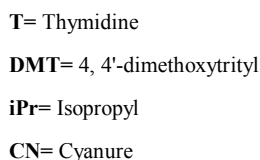
Pour l'HPLC, on a utilisé l'acétate d'ammonium (Fluka analytique), l'acétonitrile HPLC (SDS France), n-hexane HPLC (SDS France), et l'eau ultra pure MilliQ (Millipore)

III-2 Synthèse du thymidylyl- (3',5')- thymidine (TpT) 4:

III-2-1 Mode opératoire

Le thymine-3'-phosphoramidite 1 (500 mg ; 1 éq.) est dissout dans l'acétonitrile (ACN) anhydre (4 mL), Il est condensé ensuite avec le 3'-O-dimethoxytrityl-2 thymidine 2 (548 mg) en présence de tetrazol (154 mg dissoute dans 2,7 mL ACN), pendant 30 min sous agitation à température ambiante et sous azote, pour conduire à la formation d'un intermédiaire phosphite triester, qui est ensuite oxydé in situ avec 200 µL de t-BuOOH pendant 40 min. Le mélange réactionnel est filtré et lavé 2 fois avec l'eau distillé (20 mL) et la phase organique récupérer est desséché par MgSO₄ et évaporer sous vide pour obtenir un résidu rose pâle et huileux. Ce produit est dilué dans 6 mL de dichlorométhane (DCM) et hydrolyser par 250 µL de l'acide trifluoacétique (TFA) pendant 10 min à 0°C. Après évaporation, le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice flash dans du DCM avec un gradient de méthanol (MeOH) de 2 à 12 %. Les fractions sont réunies et concentré à sec pour obtenir le produit 3 (152 mg) (Schémas 2).

La déprotection du produit 3 est effectué par la solution d'ammoniaque 33% (NH₄OH), sous agitation et à température ambiante pendant 30 min, après évaporation, le résidu est dilué par l'eau distillé et évaporé, cette opération est produite 2 fois jusqu'à l'élimination des sel, le thymidylyl- (3',5')- thymidine (TpT) 4 est lyophilisé et conservé dans le réfrigérateur jusqu'à l'utilisation (Schéma 2).



III-2-2 RMN

Les déplacements chimiques sont suivis de la multiplicité, où s, d, t, dd, dt, ddd, q et m désignent respectivement les singulets, doublets, triplets, doublets de doublets, doublets de triplets, doublets de doublets de doublets, quadruplets et multiplets.

Les multiplicités sont suivies de la valeur des constantes de couplages notées J et exprimées en Herz. La valeur de l'intégration est suivie de l'attribution.

RMN¹H 4: (D₂O)(ppm): 7.74 (s, 1H, HB-6), 7.67 (s, 1H, HA-6), 6.37 (t, J=6.78 et 6.84Hz), 6.30 (t, 1H, J=6.84 and 6.84Hz, HA-1'), 4.82 (m, 1H, HA-3'), 4.60 (m, 1H, HB-3'), 4.22 (m, 1H, HA-4'), 4.21 (m, 1H, HB-4'), 4.18 (m, 1H, HB-5'), 4.12 (m, 1H, HB-5'), 2.56 (m, 1H, HA- 2'), 2.41 (m, 1H, HA-2'), 2.44 (m, 2H, HB-2', HB-2'), 1.94 (s, 3H, CH₃A-5), 1.93 (s, 3H, CH₃B- 5).

III-3 Préparation des échantillons

III-3-1 Matériel végétal

L'huile d'argane utilisée dans ce travail a été préparée en 2010 par les femmes de coopérative d'Ait Baha (Chtouka-Aït Baha, le Maroc). Dans ce présent chapitre, on utilise l'huile d'argane alimentaire et cosmétique en comparaison par l'huile d'olive. Pour le contrôle, on a choisi l'huile de paraffine (P).

III-3-2 Préparation des échantillons

Le TpT 4 est dissoute dans l'eau ultra pure (C=0,5 g/L), cette solution sera le témoin et constituera ainsi la base de tous les échantillons.

Les huiles sont utilisées purs ou dilués par la paraffine selon différentes concentration 5 :5 v/v et 1 :9 v/v (huile : paraffine).

800 µL de la solution aqueuse du TpT est mise dans le petit Becher de 5 ml, l'huile pure ou dilué (320 µl) est déposé sur la solution aqueuse sous forme d'un film, le b cher est ensuite irradié pendant 1h sous UV, pour maintenir la température constante on a mis de la glace au dessous des échantillons. Après irradiation, les fractions aliquotes de chaque échantillon ont été recueillies et délipidés trois fois par n-hexane afin d liminer toute trace d'huile, puis une proportion de 20 µL de chaque aliquot a été injecté et analysé par HPLC en phase inverse. L' traction, l'irradiation et l'analyse ont été réalisée en triplicate.

Le TpT a été irradié et injecté dans l'HPLC pour servir de témoin.

III-3-3 Les conditions d'irradiation

Les échantillons ont été exposés pendant 1 h   la source de lumière à 254 nm, la lampe UVC est placée 6 cm au-dessus des échantillons. L'intensité de la lumière est 6,64 J/cm².

III-4 Conditions chromatographiques

Les expériences chromatographiques ont été réalisées sur la chaîne HPLC Dionex, la colonne utilisée est Sunfire C18 (5 μ m, 4,6 x 250 mm) liée au pré colonne Sunfire C18, le flux est de 1 ml / min, et le gradient de 100% solution de tampon (d'acétate d'ammonium aqueux 0,05 M) pendant 40 min, gradient de 0-12%, puis 10 min de CH₃CN 12 -20%. Un détecteur UV a été utilisé. Les calculs ont été effectués en utilisant la longueur d'onde à 230 nm. Temps de rétention (min): CPD cis syn 11,3, (6-4) PP 14,5, CPD trans syn 15,9, 32,2 TpT.

IV- RESULTATS ET DISCUSSION

Au niveau des sites dipyrimidine (1-4) dans l'ADN, le cyclobutane dimères pyrimidine (CPD) et le (6-4) pyrimidine photoproduits pyrimidone ((6-4) PP) sont principalement formés par absorption directe de photons. Les CPDs sont les photoproduits dipyrimidine les plus abondantes. Elles résultent d'une réaction [2-2] cycloaddition entre les liaisons doubles C5-C6 de deux pyrimidines adjacentes (Figure 20). Ces photoproduits peuvent par conséquent avoir une stéréochimie cis syn ou trans syn. Les photoproduits (6-4) pyrimidine pyrimidone sont les deuxièmes photoproduits plus abondants formés dans l'ADN. Ils dérivent de la réaction Paterno'-Büchi entre la double liaison C5-C6 de la pyrimidine sur le côté 5 'et la double liaison exocyclique à l'atome d'C4 de la pyrimidine sur la côté 3', c.-à-d, le carbonyle d'un résidu de thymine ou de la forme tautomère imine d'un résidu cytosine (Figure 21).

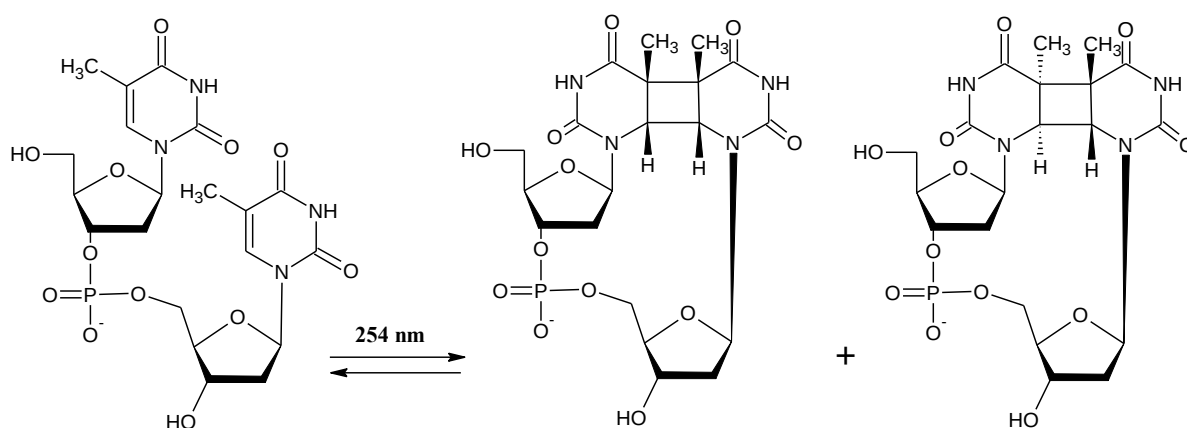


Figure 20 : Les CPDs cis syn et trans syn induits par irradiation du TpT

Après l'absorption des UV-A ou-B, (6-4) PP peut être converti en son isomère correspondant Dewar (DWR) valence.

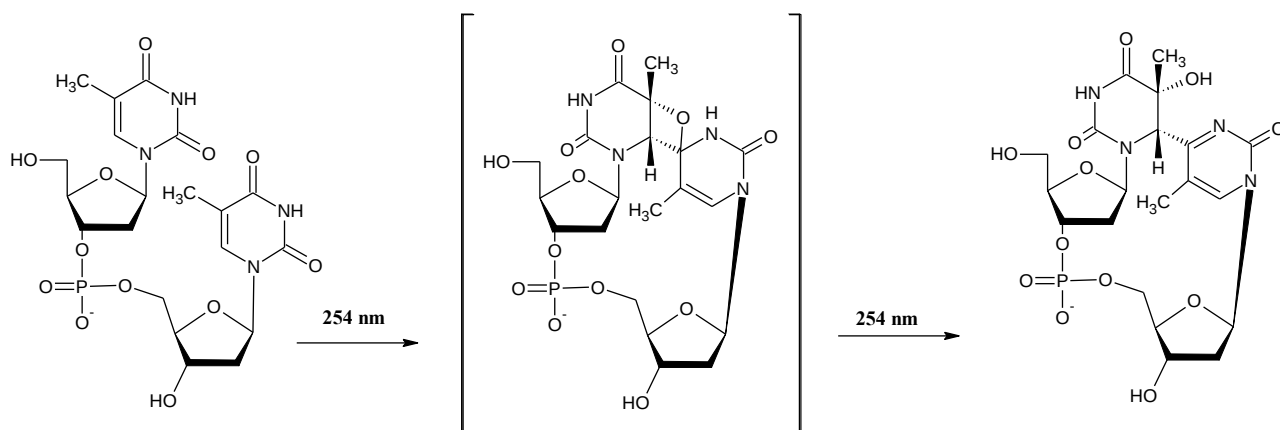


Figure 21: L'adduit 6-4 PP induit par irradiation du TpT

Le comportement photochimique de TpT irradié a été étudié en solution aqueuse à 254 nm, la solution de contrôle a révélé la formation de trois photoproduits, par rapport TpT non irradié, on note bien le CPD cis syn, et le (6-4) PP et CPD trans syn, le rendement est respectivement de 15,4, 6,8 et 2,4 % (figure 22).

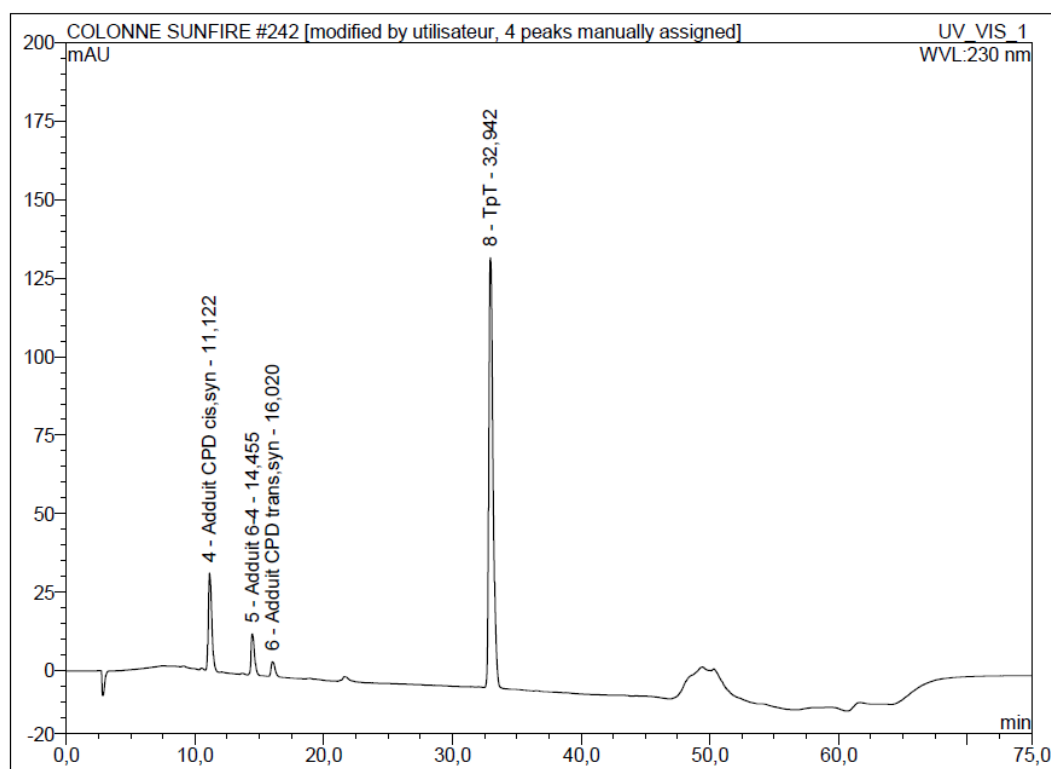


Figure 22: Comportement photochimique du TpT après irradiation à 254nm pendant 1h

Le film d'huile de paraffine ne protège pas contre la formation de photoproduits (Figure 23), il a approximativement la même performance obtenu avec la solution aliquote de TpT seul, le CPD cis syn, et le (6-4) PP et CPD trans syn, le rendement est respectivement de 15,3 ; 6,6 et 2,5 % l'huile de paraffine afin représentent un contrôle approprié pour la comparaison avec les échantillons de l'huile d'argane et d'olive (Tableau 8).

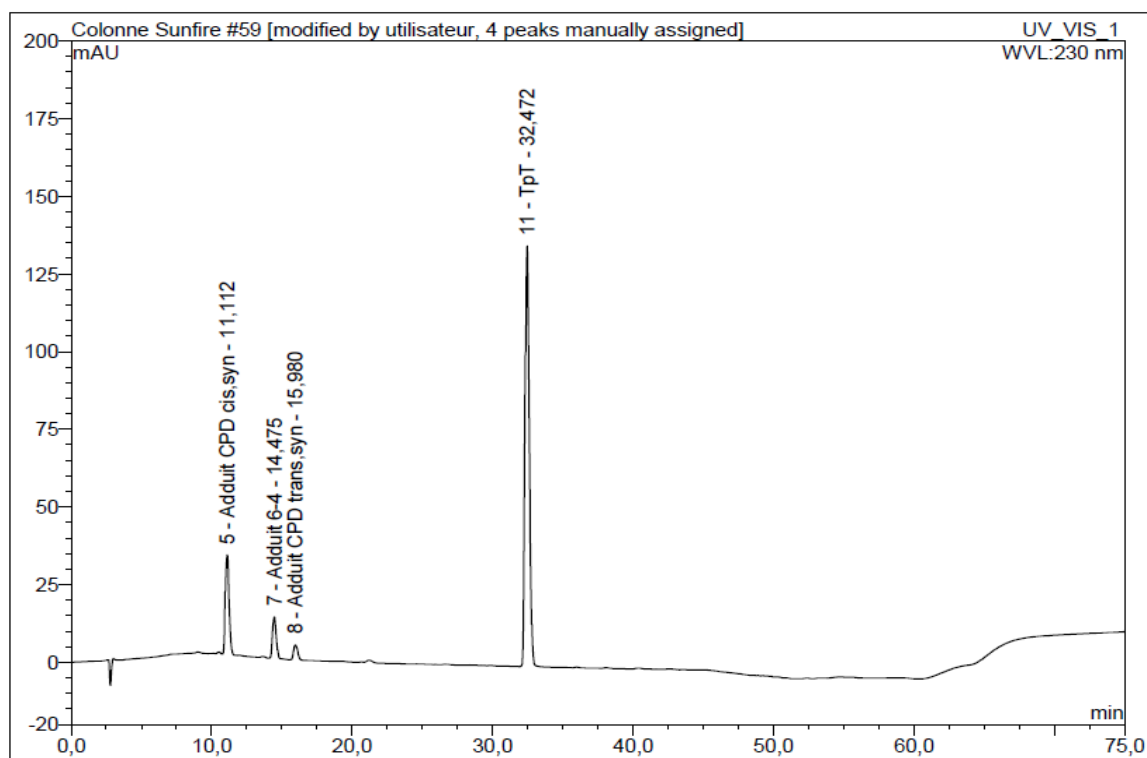


Figure 23: Comportement photochimique du TpT couvert par un film de paraffine après irradiation at 254nm for 1h

Les résultats des différents échantillons après irradiation sont présentés dans le tableau 8.

Table 8: Le pourcentage des photoproduits (%) après irradiation UV des échantillons pendant 1h

				Huiles Pures			Huiles diluées à la paraffine (5 :5)			Huiles diluées à la paraffine (1 :9)		
				AC	AA	O	AC-P	AA-P	O-P	AC-P	AA-P	O-P
CPD cis-syn	11,38	15,4±0,3	15,3±0,2	0,1 ±0,0	0,4 ±0,2	0,3 ± 0,4	0,3 ±0,0	1,7 ±0,1	0,6 ± 0,5	6,4 ±1,0	9,7 ±0,5	9,2 ± 0,5
(6-4) PP	14,54	6,8±0,1	6,6±0,1	0,0 ±0,0	0,1 ±0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ±0,0	0,5 ±0,0	0,4 ± 0,3	2,0 ±0,5	3,1 ±0,1	2,9 ± 0,2
CPD trans-syn	15,95	2,4±0,2	2,5±0,1	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,5 ± 0,4	0,0 ±0,0	0,3 ±0,0	0,2 ± 0,2	1,0 ±0,2	1,6 ±0,1	1,5 ± 0,1
TpT	32,24	75,4±0,1	75,6±0,2	99,9±0,1	99,5 ±0,3	99,2 ±0,1	99,7 ±0,0	97,5 ±0,1	98,7 ± 0,6	90,6 ±0,6	85,6 ±0,1	86,3 ± 0,8

TpT: thymidyl-(3',5')-thymidine, **i** : irradié, **Tr**: temps de rétention, **AC**: huile d'argane cosmétique, **AA**: huile d'argane alimentaire **P**: huile de paraffine,
O : huile d'olive

Les résultats du tableau (8) montrent bien que les trois huiles pures AC, AA et O ont un effet protecteur contre la formation des photoproduits, et même à une dilution de 50% par la paraffine, le pourcentage du TpT est de l'ordre de 99,7% pour l'AC-P.

La formation des photoproduits CDP cis syn, 6-4 PP et CPD trans syn est de 0,6 ; 0,4 et 0,2 % respectivement pour l'O-P, et 1,7 ; 0,5 ; 0,3 % pour l'AA-P respectivement.

Cependant à une dilution de 1:9 avec la paraffine, on remarque clairement la formation des photoproduits. Le pourcentage du CDP cis syn, pour l'AA-P et l'O-P est de 9,7 et 9,2% respectivement; et le pourcentage du 6-4 PP et CPD trans syn sont de 3,1-2,9 et 1,6-1,5% pour l'AA-P et l'O-P respectivement. Tandis que pour l'AC-P (1 :9 v /v), le CPD cis syn formé est de l'ordre de 6,4%, le 6-4 PP est de 2% et le CPD cis trans est de 1%.

D'après les résultats, l'huile d'argane cosmétique (AC) montre davantage un effet protecteur mieux que les autres huiles à une dilution de 90% par la paraffine (Figure 24).

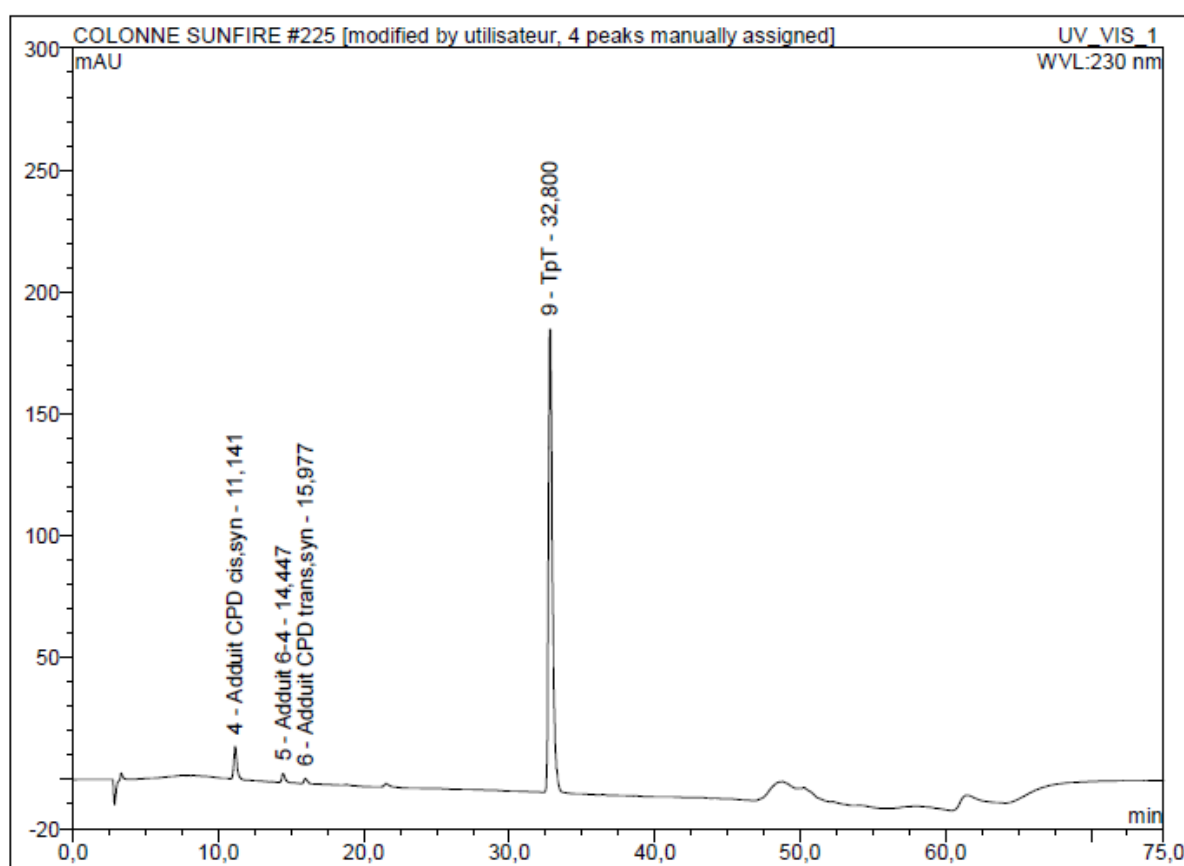


Figure 24: Comportement photochimique du TpT couvert par un film l'huile d'argane cosmétique dilué par la paraffine (1:9) après irradiation at 254nm for 1h

L'huile d'olive présente une puissante activité antioxydante in vitro et un effet préventif contre les dommages induits par UV chez la souris (M. Ichihashi et *al.*, 2000). Owen et *al.* 2000 ont rapporté que l'extrait méthanolique de l'huile extra vierge d'olive contient des antioxydants, y compris des composés phénoliques abondants, les secoiridoids aldéhydiques, les flavonoïdes et les lignanes, et a attribué les bienfaits protecteurs de l'huile d'olive à ces antioxydants. Le niveau élevé du squalène dans l'huile d'olive protège les lipides de la peau.

Certaines huiles végétales contiennent des filtres solaires naturels. Par exemple, l'huile de sésame résiste à 30% des rayons UV, tandis que les huiles de noix de coco, arachide, de coton et de bloquer environ 20%. Bien que l'huile minérale ne résiste pas à des rayons UV, elle aide à protéger la peau en dissolvant le sébum sécrété par les glandes sébacées, ce qui facilite la purification de la peau (Mufti J., 2003; Burgess CM. 2009). En effet l'huile de Bourrache (*Borago officinalis*) stimule l'activité cellulaire de la peau et favorise la régénération cutanée. Cette activité est due aux niveaux élevés d'acide gamma-linolénique, ce qui est utile dans le traitement de toutes les maladies de la peau, en particulier les allergies, la dermatite, l'inflammation et l'irritation. Cette huile pénètre facilement dans la peau et convient à tous les types de peau, particulièrement sèches, déshydratées, matures ou prématurément le vieillissement cutané (Wilson R. 2002). L'huile d'avocat (*Persea americana*) est riche en vitamine E, β -carotène (Mufti J. 2003), la vitamine D, de protéines, de la lécithine et les acides gras (Loughran J. 2002) et offre des avantages pour apaiser et protéger la peau (Mufti J. 2003).

Traditionnellement, l'huile d'argane est largement utilisée au Maroc pour le traitement de la peau sèche, l'acné, l'eczéma, les rides, les douleurs articulaires et l'inflammation de la peau (Charrouf Z, Guillaume D. 1999). Les propriétés cosmétiques attribuées à l'huile d'argane sont principalement basées sur les revendications traditionnelles, et peu d'études scientifiques l'ont approuvé.

Une étude sur l'activité anti-sébum de l'huile d'argane (contenue dans des crèmes souvent indiquée en cosmétologie comme hydratant, anti-vieillessement et crèmes réparatrice) a été réalisée sur des bénévoles de 50 ans pendant 4 semaines. Les résultats ont montré une activité anti-sébum significative : l'huile d'argane a été efficace pour atténuer la peau grasse et améliorer l'apparence de la peau du visage (Dobrev H., 2007).

Cependant aucune étude in vivo ou in vitro n'a été élaborée pour montrer l'effet protecteur de l'huile d'argane sur le cancer de peau ou les photodommages. Dans la présente étude, on a pu pour la 1^{ère} fois étudier l'effet préventif, in vitro, de l'huile d'argane en comparaison avec l'huile d'olive contre les dommages induite par UV.

Certaines propriétés pharmacologiques de l'huile d'argane sont susceptibles de résulter de sa haute teneur en acides gras insaturés. L'acide oléique, un acide gras monoinsaturé, possède de nombreux effets thérapeutiques (Lopez-Huertas E., 2010) qui contribuent aux propriétés de l'huile d'argane. Puisque un déficit en acide linoléique peut induire à une mauvaise cicatrisation des plaies (Galli C, 2009), la teneur importante de l'acide linoléique et oléique contenu de l'huile d'argane peut contribuer à son indication traditionnelle comme un remède pour inflammation de la peau. Cependant, plusieurs d'autres huiles sont riches en acide oléique et / ou acide linoléique, mais ne possèdent pas les mêmes effets thérapeutiques. Plusieurs propriétés pharmacologique de l'huile d'argane sont attribuées à sa fraction insaponifiable, malgré sa faible teneur (1%). L'insaponifiable de l'huile contient quelques composés mineurs (tocophérols, polyphénols, stérols, caroténoïdes, xanthophyls et squalène) (Khallouki et *al.*, 2003).

L'huile d'argane est caractérisée par sa haute teneur en tocophérols 620 mg / kg, par rapport à 320 mg / kg en l'huile d'olive. Les tocophérols sont des molécules à fort pouvoir antioxydant. Le γ -tocophérol est considéré comme un puissant antioxydant, γ -tocophérol étant le principal tocophérol de l'huile d'argane (480 mg/kg). Il agit non seulement comme un antioxydant efficace, lipophile et piègeur de radicaux libres, mais aussi stabilise les membranes cellulaires (Caligiani et *al.*, 2010). Sa capacité à réduire les dommages des radicaux libres d'ADN induite a été bien documentée (Guillaume D et Charrouf Z, 2011; Factor et *al.*, 2000). Les deux α - et β -tocophérols, ont également été démontré pour protéger contre les dommages cellulaires après une exposition aux rayons UVA (Bohm et *al.*, 1998). En effet l' α -tocophérol peut protéger à la fois les animaux et les membranes cellulaires des plantes contre les dommages induits par de la lumière (Fryer MJ. 1993). Ces antioxydants ont montré un effet réducteur du photovieillissement aigu et chronique. L'application particulière des formes naturelles de vitamine E α -tocophérol et tocotriénols seules réduisent efficacement la rugosité de la peau, la longueur des rides du visage, et la profondeur des rides (Mayer P. 1993). Ainsi la vitamine E augmente l'hydratation de la couche cornée et augmente sa capacité de

rétenction d'eau. L' α -Tocophérol réduit la destruction du collagène par l'enzyme collagénase, cette destruction augmente dans le vieillissement cutané. En plus que la vitamine E est un piègeur de radicaux libres, elle est également un émollient (Dayan N. 2008).

Les phytostérols ont été reconnus comme antioxydants (Frohlich et *al.*, 1997 ; Papas 1999) et substances préventives contre le cancer (Frohlich et *al.*, 1997). Les tocophérols et les stérols peuvent ainsi agir en synergie et peuvent contribuer aux aspects thérapeutiques de l'huile d'argane.

L'huile d'argane est également caractérisée par sa composition phénolique : l'acide vanilique, l'acide syringique, l'acide férulique et Tyrosol (67, 37, 3147, et 12 mg / kg), respectivement. En effet, les composés phénoliques possèdent un effet photoprotecteur pour la peau, ils réduisent le dommage à l'ADN qui s'est formé après l'irradiation UV. Ils ont été montrés pour avoir des effets anti-inflammatoires et antioxydantes de la peau humaine et animale (Hirsch RJ. 2008). Les études animales démontrent que les polyphénols du thé, améliorent les réactions cutanées indésirables suite à l'exposition aux UV, y compris les dommages à la peau, érythème, et la peroxydation lipidique (Zhou J. et al., 2006).

Enfin, les caroténoïdes sont des antioxydants piègeurs de radicaux libres et ont montré un effet protecteur contre les UV-induite cytotoxicité et dommages à l'ADN (Lyons et *al.*, 2002). Des composants mineurs de l'huile d'argane ont des propriétés antioxydantes très importantes et les antioxydants peuvent être employés comme agents de protection contre les effets endommageant l'ADN de l'exposition aux UV. Les caroténoïdes s'accumulent dans la peau et leur niveau de corrélation est significatif par rapport à la protection solaire, ils peuvent réduire la réponse inflammatoire induite par les UV. Dans des fibroblastes humains, le lycopène, la β -carotène, la lutéine sont capables de réduire sensiblement la peroxydation lipidique causée par UVB. Une étude clinique a rapporté des améliorations significatives d'épaisseur de la peau, de la densité et de la rugosité après 12 semaines de supplémentation orale avec le lycopène, la lutéine, l' α -tocophérol le β -carotène et le sélénium. Un autre essai chez l'homme après administration orale de ces produits a signalé une diminution induite par les UV érythème et la peroxydation lipidique (Dayan N. 2008).

V- CONCLUSION

Selon les résultats dans la présente étude in vitro, on peut conclure que l'huile d'argane, en particulier de qualité cosmétique, possède un potentiel chimio-préventif de molécules d'ADN contre les dommages UV même à dilution (10:90) v : v par de l'huile de paraffine. Diverses études ont montré que les tocophérols, les phytostérols, les polyphénols et les caroténoïdes exercent des effets bénéfiques. Connaissant la composition chimique intéressante de l'huile d'argane riche en acides gras insaturés et les composés mineurs, nous pouvons considérer que ces molécules peuvent contribuer, seules ou en synergie, à l'effet photoprotecteur de l'huile d'argane. Ces résultats sont intéressants et encourageants, en outre ils ne peuvent être confirmés que par des tests biologiques in vivo.

Conclusion Générale

La valorisation économique de l'arganier par le biais de ses produits est un moyen de relancer durablement une foresterie rurale intégrée. En effet, des recherches précédentes ont montré que l'arganier est un arbre d'avenir pour certaines zones arides. Ainsi, le renforcement de la recherche scientifique est la clef de réussite pour toute politique de développement et de création de richesses et un appui incontournable au développement économique. Par conséquent, il devient impératif de conserver ce patrimoine universel par une utilisation durable de ses ressources. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette présente thèse.

L'originalité de ce travail est présentée par deux volets ; l'étude de l'effet photoprotecteur de l'huile d'argane sur les dommages de l'ADN provoqués par UV et l'étude clinique entreprise sur l'effet de la consommation de l'huile d'argane sur la concentration sérique en vitamine E chez les femmes ménopausées (projet « ARFEM »).

Concernant l'étude clinique, ARFEM, un total de 151 femmes ménopausées d'âge moyen $55,5 \pm 6,2$ années, ont été randomisées après 2 semaine de stabilisation avec la margarine non hydrogénée, en deux groupes : 77 femmes ont reçu de l'huile d'olive et 74 ont reçu l'huile d'argane. Chaque groupe a consommé 25 mL/jour de l'huile pendant huit semaines. Les prélèvements ont été effectués avant l'intervention (J_0), après 4 semaines de consommation de l'huile (J_1) et à la fin de l'intervention (J_2). Le dosage de la vitamine E a été réalisé par HPLC.

Les résultats du dosage sérique de la vitamine E montrent une augmentation significative ($p = 0,02$) pour les femmes appartenant au groupe d'argane. La concentration initiale moyenne de $10,04 \pm 5,44$ $\mu\text{mol} / \text{L}$, a atteint la valeur de $12,66 \pm 5,59$ $\mu\text{mol} / \text{L}$ au bout de 8 semaines. Une légère augmentation allant de $12,87 \pm 6,95$ $\mu\text{mol} / \text{L}$ pour atteindre la valeur de $13,21 \pm 7,26$ $\mu\text{mol} / \text{L}$, a été pour le groupe huile d'olive mais sans qu'elle soit significative ($p = 0,835$). Ces résultats intéressants, pourraient être expliqués par la forte teneur de l'huile d'argane en vitamine E.

Dans le deuxième volet, nous nous sommes intéressés à l'effet photoprotecteur de l'huile d'argane sur les dommages de l'ADN provoqués par l'UV. Dans un premier temps, nous avons synthétisé le TpT, thymidylyl-(3', 5')-thymidine, analogue d'ADN. L'irradiation du TpT pendant 1h sous lumière UV provoque la formation des photoproduits : les dimères cyclobutyliques de pyrimidines CPD cis, CPD syn et les adduits pyrimidine (6-4) pyrimidone (6-4PPs). Ces dernières sont analysées par HPLC. La formation de ces photoproduits confère

au TpT un meilleur modèle pour évaluer l'effet protecteur de l'huile d'argane, en comparaison avec l'huile d'olive, sur les photodommages de l'ADN induite par UV.

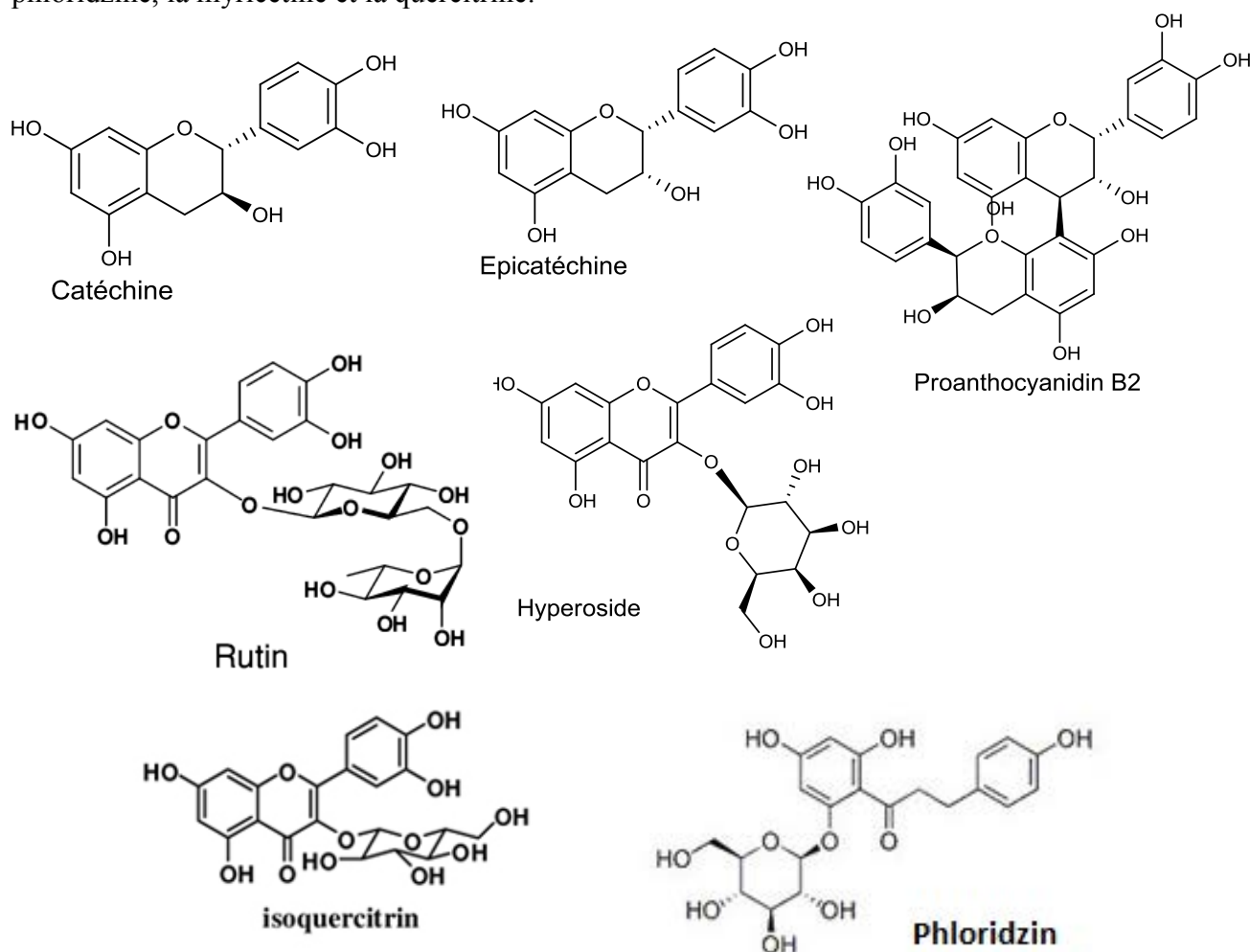
Nos résultats ont montré que les huiles d'argane et d'olive non diluées montrent un effet protecteur intéressant contre la formation des photoproduits. En plus, même diluée 9 fois par la paraffine, l'huile d'argane reste toujours active. Ces résultats de l'huile d'argane sont encourageants dans la mesure où cette huile possède un potentiel chimio-préventive contre les dommages d'ADN induites par UV. Cette activité pourra s'expliquer par la composition chimique de l'huile d'argane. Des tests biologiques ex-vivo de cette huile et de ses fractions permettront certainement de confirmer les résultats obtenus et déterminer les molécules responsables de cette activité.

Pour la partie phytochimique de notre travail, nous avons entrepris une étude sur la composition volatile de l'huile d'argane selon les différents temps de torréfaction des amandons d'arganier à 0 ; 10 ; 15 ; 20 25 et 35 min. L'extraction des composés volatils a été réalisée par microextraction en phase solide (SPME), et leurs identifications et quantifications ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS).

Les résultats de notre étude montrent clairement que le processus de torréfaction des amandons d'argane est une étape primordiale pour obtenir l'arôme du produit final. La torréfaction induit la formation de plusieurs composés, y compris ceux de la dégradation de Strecker, peroxydation lipidique, et la réaction de Maillard. Dans le cadre de notre étude expérimentale, le temps nécessaire pour former des composés spécifiques présentant les attributs de la saveur recherché est compris entre vingt et vingt cinq minutes. Ce résultat pourrait être exploité par les unités de production de l'huile d'argane.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'élucidation et la quantification des polyphénols, dans les différentes parties du fruit de l'arganier. Ces métabolites secondaires sont d'une grande importance à cause de leurs propriétés antioxydantes. Au total, Onze composés phénoliques ont été identifiés et quantifiés dans la pulpe, la coque, les amandons et les tourteaux torréfiés et non torréfiés du fruit de l'arganier. Ceci a pu être réalisé grâce au couplage chromatographie liquide et Spectrométrie de masse à ionisation électrospray négatif (LC-ESI-MS). Parmi les polyphénols on cite ; Les procyanidines B1 et B2, la (+)-catéchine, (-)-

l'épigallocatechine gallate, (-)-l'épicatéchine, l'isoquercitrine, l'hyperoside, la rutine, la phloridzine, la myricétine et la quercitrine.



Les amandons non torréfiés et la coque sont caractérisés par une composition phénolique diversifiée. La pulpe est quantitativement riche en polyphénols totaux (75,78 mg d'équivalent acide gallique / g). Elle a montré une activité de piégeage des radicaux libres, mesurée par DPPH[•] importante par rapport aux autres parties du fruit ($0,17 \pm 0,005 \mu\text{M}$ Trolox équivalents / mg) et activité antioxydante (ABTS ^{•+}) ($0,375 \pm 0,07 \mu\text{M}$ équivalent / mg Trolox).

Fait intéressant, les résultats obtenus confirment que les polyphénols de fruits d'argane méritent d'être exploités autant que suppléments nutritionnelles et pharmaceutiques en raison de leurs propriétés antioxydantes, ce qui pourra contribuer sûrement à la sauvegarde de l'arganier.

Références Bibliographique

-A-

- Adlouni A et al.(2008) The nutritional benefits of argan oil in obesity risk prevention. *Atherosclerosis Supplements* . 9: 137-138.
- Ames B.N. ; Shigenaga M.K. (1992) Oxydants are a major contributor to aging In : Aging and cellular Defense Mechanism, *Ann. N.Y. Acad. Sc*; 663 : 85-96.
- Ames, J. M. (2001) Melanoidins as pro- or antioxidants. *Cerevisia*, 2001, **26**, 210-216.
- Appling S, Paez K, Allen J. (2002) Ethnicity and vasomotor symptoms in postmenopausal women. *Journal Of Women's Health*;16(8):1130–8.
- Ashokkumar, P. and G. Sudhandiran (2008). "Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis." *Biomed Pharmacother* 62: 590-597.

-B-

- Borras, C.J., Sastre, J., Garcia-Sala, D., Lloret, A., Pallardo, F.V., Vina, J., (2003). mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radic. Biol. Med.* 34, 546–552.
- Beckman KB, Ames BN (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*;78:547–81.
- Bednarek-Tupikowska G, Bohdanowicz-Pawlak A, Bidzinska B, Milewicz A, Antonowicz-Juchniewicz J, Andrzejak R. (2001), Serum lipid peroxide levels and erythrocyte glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity in premenopausal and postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol*; 15:298–303.
- Belcadi R. Etude des variations du système antioxydant cellulaire en fonction de l'âge et de l'apport alimentaire d'acides gras polyinsaturés, chez le rat. Influence particulière de l'ingestion de l'huile d'argan. Thèse 3ème cycle. Univ. Ibnou Zohr. Agadir.1994
- Bellakhdar, J., (1997). La pharmacopée marocaine traditionnelle. *Ibis Press, Paris*, pp. 486–488
- Benajiba, S. Morel, F. Boucher, J. De Leiris, N. Mokhtar, H. Aguenau (2002), Effet de l'huile d'argan sur la fonction cardiaque au cours d'une séquence d'ischémie/reperfusion chez le rat Wistar recevant un régime enrichi en fructose. *Biol Santé*. **2**, 67–76.
- Bennani, A. Drissi, F. Giton, L. Kheuang, J. Fiet, A. Adlouni (2007). Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detect Prev*. 31, 64–69.
- Bensouilah J, Buck P, Tisserand R, Avis A.(2006). Aromadermatology: Aromatherapy in the Treatment and Care of Common Skin Conditions. *Abingdon: Radcliffe Publishing Ltd*
- Berrada, A. Settaf, K. Baddouri, A. Cherrah, M. Hassar (2000) Mise en évidence expérimentale des effets antihypertenseurs et hypocholestérolémiants de l'huile d'argan, *Argania sideroxylon. Thérapie*. 55, 375–378.

- Berrougui H, Ettaib A, Herrera Gonzalez MD, Alvarez de Sotomayor M, Bennani-Kabchi N, Hmamouchi M (2003). Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in Meriones shawi rats. *J Ethnopharmacol*;89:15–8.
- Berrougui, M. Alvarez de Sotomayor, C. Perz-Guerrero, A. Attaib, M. Hmamouchi, E. Marhuenda, M. D. Herrera (2004), Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Br J Nutr.* 92, 921–929.
- Berrougui, M. Cloutier, M. Isabelle, A. Khalil (2006). Phenolic extract from argan oil (*Argania spinosa* L.) inhibits low-density lipoprotein (LDL) oxidation and enhances cholesterol efflux from human THP-1 macrophages. *Atherosclerosis.* 184, 389–396.
- Bhatia S, Sharma K, Namdeo AG, Chaugule BB, Kavale M, Nanda S. (2010) Broad-spectrum sun-protective action of Porphyra-334 derived from Porphyra vietnamensis. *Phcog Res.* ;2:45–9. [PMCID: PMC3140129] [PubMed: 21808539].
- Blouin JM *et al.* (2006), Effet des acides gras sur l’inflammation et le cancer. *Oléag Corps Gras Lipides.* 13: 331–336 [in French].2.
- Bohm F, Edge R, Lange L, Truscott TG.(1998) Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by antioxidant combinations involving dietary carotenoids. *J Photochem Photobiol B*;44:211—5.
- Bradley D.G., Min D.B., (1992) Singlet oxygen oxidation in foods. *CRC Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.*, 31 (3), 211-236
- Buckholz, L. L., Daun, H., Stier, E. (1980), Influence of roasting time on sensory attributes of fresh roasted peanuts. *Journal of Food Science*, **45**, 547-554.
- Burgess CM. (2009): Cosmetic products. In: Kelly AP, Taylor SC, editors. *Dermatology for Skin of Color*. New York: McGraw-Hill Medical. Chapter 70.
- C-
- Cadet, J., E. Sage, and T. Douki (2005), Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res.* 571(1-2): p. 3-17.
- Caligiani A, Bonzanini F, Palla G, Cirilini M, Bruni R (2010) Characterization of a potential nutraceutical ingredient: Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil unsaponifiable fraction. *Plant Foods Hum Nutr* 65:277–283.
- Cancer Facts & Figures (2008) *American Cancer Society*.
- Charrouf Z, Guillaume D. (1999). Ethnoeconomical, ethnomedical and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *J Ethnopharmacol* ;67:7-14.
- Charrouf, Z., Hilali, M., Jauregui, O., Soufiaoui, M., Guillaume, D. (2007). Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy. *Food Chem.*, **100**, 1398- 1401.
- Charrouf Z. El Halima H, Mallia S, Licitra G, Guillaume D. (2006) Influence of roasting and seed collection on argan oil odorant composition. *Natural Product Communications*, 1, 399-404.

- Charrouf, D. Guillaume (2002), Secondary metabolites from *Argania spinosa* (L.) Skeels. *Phytochem Rev.* **1**, 345–354.
- Charrouf, D. Guillaume, A. Driouich (2002), The argan tree, an asset for Morocco (in French) *Biofutur.* 2002, **220**, 54–57.
- Charrouf. M. (1984) Contribution à l'étude chimique de l'huile d'*Argania spinosa* (L.) (Sapotaceae). Thèse Sciences Univ. de Perpignan.
- Cherki, H. Berroui, A. Drissi, A. Adlouni, A. Khalil (2006). Argan oil: Which benefits on cardiovascular diseases? *Pharmacol Res.* 54, 1–5.
- Cherki M, Derouiche A, Drissi A, El Messal M, Bamou Y, Idrissi-Ouadghiri A et al. (2005) Consumption of argan oil may have an antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status : Intervention study in healthy men. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* , **15**, 352-3360.
- Cherki, A. Derouiche, A. Drissi, M. El Messal, Y. Bamou, A. Idrissi-Ouadghiri, A. Khalil, A. Adlouni (2005): Consumption of argan oil may have antiatherogenic effect by improving paraoxonase activities and antioxidant status: Intervention study in healthy men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 15, 352–360.
- Chernane, H., Hafidi, A., El Hadrami, I., Ajana, H. (1999) Composition phénolique de la pulpe des fruits d'arganier (*Argania spinosa* L. skeels) et relation avec leurs caractéristiques morphologiques. *Agrochimica*, **43**, 137-150.
- Chiou, R. Y. Y., Tsai, T. T. (1989) Characteristics of peanut proteins during roasting as affected by initial moisture content. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **37**, 1377-1381.
- Chyau C.-C., Mau J.-L., (1999) Release of volatile compounds from microwave heating of garlic juice with 2,4-decadienals *Food Chem.*, 64 (4), 531-535
- Gandemer G., (1999) Lipids and meat quality : lipolysis, oxidation, Maillard reaction and flavor *Sci. Alim.*, 19. 439-458.
- Claerhout, S., et al. (2006), Pathways involved in sunburn cell formation: deregulation in skin cancer. *Photochem Photobiol Sci.*, 5(2): p. 199-207.
- Clement, Y., (2009). Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. *Prev Med.* 49, 83-87.
- Collier A. et lemaire B. (1974), Etude des caratenoïdes de l'huile d'argan. *Cah. Nutr. Diét.* IX (4), 300-301.
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec (2003), J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, vol 17(10), p.1195-1214.
- Courdavault, S., Baudouin, C., Charveron, M., Canguilhem, B., Favier, A., Cadet, J. and Douki, T. (2005). "Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations" *DNA Repair (Amst)*, **4**, 836-44.

Courdavault, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J. and Douki, T. (2004). "Larger yield of cyclobutane dimers than 8-oxo-7,8-dihydroguanine in the DNA of UVA-irradiated human skin cells" *Mutat Res*, **556**, 135-42.

-D-

D'Archivio, M., C. Filesi, R. Di Benedetto, et al. (2007). "Polyphenols, dietary sources and bioavailability." *Ann Ist Super Sanita* 43: 348-361.

Davies M.J. (2003) Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem Biophys Res Commun.*, vol 305 3, p.761-770.

Dayan N. (2008). Skin aging handbook: An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development. *New York: William Andrew Inc.*

Del Rio D, Costa L, Lean M, Crozier A., (2010). Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis.* 20,1-6.

Derouiche A, Cherki M, Drissi A, Bamou Y, El Messal AM, Idrissi-Oudghiri A et al. (2005) Nutritional intervention study with argan oil in man: effects on lipids and apolipoproteins. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **49**, 196-201.

Derouiche A et al. (2005) Nutritional intervention study with argan oil in man: Effects on lipids and apolipoproteins. *Ann Nutr Metab.* 49: 196-201.

Ding, B.X., Wang, C.B. (2003). Inhibitory effect of polypeptides from *Chlamys farreri* on UVB-induced apoptosis and DNA damage in normal human dermal fibroblasts in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica* 24, 1006–1010.

Dobrev H (2007). Clinical and instrumental study of the efficacy of a new sebum control cream. *J Cosmet Dermatol*;6:113-118.

Douki, T. and J. Cadet (2001), Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions. *Biochemistry*, 40(8): p. 2495-501.

Drissi A, Girona J, Cherki M, God G, Derouiche A, El Messal M, Saile L, Kettani A, Sol R, Masana L, Adlouni A (2004). Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clinical Nutrition* 23, 1159–1166

Dubois, S. Breton, M. Linder, J. Fanni, M. Parmentier (2007): Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur J Lipid Sci Technol.*, **109**, 710-732.

Dweck AC (2002). Herbal medicine for the skin – their chemistry and effects on skin and mucous membranes. *Pers Care Mag* ;3:19–21.

-E-

Elrod S., Standfield W., « Génétique », 4ème édition, Paris, P 79, (2003).

Emberger L (1960), Les végétaux vasculaires. *Masson Paris*, Tome II, 1540 p.

Emonard H *et al.* (1999), Inhibition of gelatinase A by oleic acid. *Ann NY Acad Sci*; 878: 647–649.

-F-

Fabre (1999), L'intérêt de l'huile d'argan enrichie en insaponifiable ainsi que les peptides extraits des tourteaux en cosmétologie. In : Bani Aameur F (Editeur) Colloque International sur les Ressources Végétales : l'arganier et les plantes des zones arides et semi-arides. Faculté des Sciences, Université de Ibnou Zohr, Agadir,; 103-106.

Factor V.M., Laskowska D., Jensen M.R., Woitach J.T., Thorgeirsson S.S. (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (5) 2196–2201.

Farber J.L., Kyle M.E., Coleman J.B.(1990) Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest.*, vol 62(6), p.670-679.

Farines, M. Charrouf, J. Soulier et A. Cave. (1984) Etude de l'huile des graine d'*Argania spinosa* (L.) Sapotaceae. II- Stérols, alcools triterpéniques et méthylstérols de l'huile d'argan, *Rev.Franc.Corps Gras*, 31 : 443-448.

Fisher, G.J., Kang, S., Varani, J., Bata-Csorgo, Z., Wan, Y., Datta, S., Voorhees, J.J., (2002). Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Archives of Dermatology* 138, 1462–1470.

Frohlich R.H., M. Kunze, I. Kiefer (1997), *Acta Med. Austriaca* 24-108.

Fryer MJ. (1993). Evidence for the photoprotective effects of vitamin E. *Photochem Photobiol.*;58:304–12. [PubMed: 8415922].

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. (2004), Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*;14: 1752–61.

-G-

Galli C, Calder PC. (2009). Effects of fat and fatty acid intake on inflammatory and immune responses: a critical review. *Ann Nutr Metab*;55:123-139.

Gil EM, Kim TH (2000). UV-induced immune suppression and sunscreen. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* ;16:101–10.

Gómez - Caravaca A. M, Gómez - Romero M, Arráez - Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A., (2006). Advances in the analysis of phenolic compound in products derived from bees. *Journal of Pharmacology and Biomedicine Analysis* 41: 1220 - 34.

Guarrera M. (1988). Age and skin response to ultraviolet radiation. *J Cutan Ageing Cosmetic Dermatol.* /89;1:135–44.

Guillaume D, Charrouf Z (2011) Argan oil and other argan products; use in cosmetology. *Eur J Lipid Sci Technol.* doi:10.1002/ejlt.201000417

-H-

Harhar H, Gharby S, Kartah B, El Monfalouti H, Guillaume D, Charrouf Z. (2011) Influence of argan kernel roasting-time on virgin argan oil composition and oxidative stability. *Plants Food for Human Nutrition*, 66, 163-168.

Harman. (1992) Free radical theory of aging : history. In : Free radicals and Aging. Emerit I., Chance B. Switzerland eds, *Birkhauser Verlag Basel*. Pp1-10.

Hirsch RJ, Sadick N, Cohen JL, editors (2008). Aesthetic Rejuvenation: A Regional Approach. *New York: McGraw-Hill Professional*; Chapter 3: New generation cosmeceutical agents.

-I-

Ichihashi M., Ahmed N.U., Budiyo A. (2000), *J. Dermatol. Sci.* 23 45–50.

Ibbotson SH, Farr PM (1999). The time-course of psoralen ultraviolet A (PUVA) erythema. *J Invest Dermatol.* ;113:346–50.

-J-

Janqueira VB, Barros SB, Chan SS, et al.(2004). Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med*; 25:5–16.

Jones, S.A., McArdle, F., Jack, C.I., Jackson, M.J., (1999). Effect of antioxidant supplementation on the adaptive response of human skin fibroblasts to UV-induced oxidative stress. *Redox Report* 4, 291–299.

-K-

Kaidbey KH, Kligman AM. (1979).The acute effects of longwave ultraviolet light upon human skin. *J Invest Dermatol.* ;72:253–6.

Kanner J., Gemanj J.B., Kinsella J.E., (1987) Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *CRC Critical Reviews in Food Sci, and nutr.*, 25 (4), 317-364

Kar, P., Laight, D., Shaw, K. M., Cummings, M. H. (2006). Flavonoid-rich grapeseed extracts: a new approach in high cardiovascular risk patients? *Int J Clin Pract.*, 60, 1484–1492.

Karp G. (2004). « Biologie cellulaire et moléculaire », 2ème édition, Paris, P 79.

Katiyar, S.K., Bergamo, B.M., Vyalil, P.K., Elmets, A.E., (2001). Green tea polyphenols: DNA photoimmunology. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* 65, 109–114.

Kaufert P, Lock M, McKinlay S, Beyenne Y, Coope J, Davis D, et al. (1986) Menopause research: the Korpilampi workshop. *Soc Sci Med*;22(11):1285–9.

Kazantzis, GD Nanos, GG Stravoulakis (2003). Effect of harvest time and storage conditions on almond kernel oil and sugar composition. *J. Sci Food Agric.*, 83, 354-359.

Khallouki F et al. (2003) Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *Eur J Cancer Prev*; 12: 67-75.

Khallouki, B. Spiegelhalter, et al. (2005) Secondary metabolites of argan tree (Morocco) may have disease prevention properties. *J. Boitechnol.*, 4: 381-388.

Kim IH, Kim CJ, You JM, Lee KW, Kim CT, Chung SH, Tae BS (2002) Effect of roasting temperature and time on the chemical composition of rice germ oil. *J Am Oil Chem Soc* 79:413–418

Kroh, L. W., (1994). Caramelisation in food and beverages. *Food Chemistry* 4, 373–379.

Kullavanijaya P, Henry W, Lim HW (2005). Photoprotection. *J Am Acad Dermatol.*;52:959–61.

Kühnau, J. (1976). "The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition." *World Rev Nutr Diet* 24: 117-191.

Kvam, E. and R.M. Tyrrell (1997). Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis*,18(12): p. 2379-84

-L-

Leal Herná'ndez, M., Abella'n Alema'n, J., Carbonell Meseguer, L.F., Dı'az Ferna'ndez, J., Garcı'a Sa'nchez, F.A., Martí'nez Selva, J.M., (2000a). Influence of the presence of hot flashes during menopause on the metabolism of nitric oxide. Effects of hormonal replacement treatment. *Med. Clin. (Barc.)* 114, 41–45.

Lee YC, Oh SW, Chang J, Kim IH (2004) Chemical composition and oxidative stability of safflower oil prepared from safflower seed roasted with different temperatures. *Food Chem* 84:1–6

Levitt M. (1972), « Folding of nucleic acids », Polymerization in biological systems, Ciba Foundation Symposium 7, Elsevier, Amsterdam, P 146-171.

Lopez-Huertas E (2010). Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol Res*;61:200-207.

Lopez, A., Pique, M. T., Boatella, J., Romero, A., Ferran, A., Garcia, J. (1997a), Influence of drying conditions on the hazelnut quality. III. Browning. *Drying Technology* , **15** (3,4), 989-1002.

Loughran J (2002). Natural Skin Care: Alternative and traditional techniques. *New Delhi: B. Jain Publishers.*

Lyons NM, O'Brien NM (2002). Modulatory effects of an algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture. *J Dermatol Sci*;30:73—84

-M-

MacLennan AH. (2009) Evidence-based review of therapies at the menopause. *International Journal of Evidence-Based Healthcare*; 7(2):112–23.

Marnett LJ.(2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.*, vol 21(3), p.361-370.

Mastrocola D., Munari M., Cioroi M., LErici C.R., (2000) Interaction between Maillard reaction products and lipid oxidation in starch- based model systems *J. Sci. Food Agric.*, 80, 684-690.

- Matthäus B, Guillaume D, Gharby S, Haddad A, Harhar H, Charrouf Z (2010) Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chem* 120:426–432
- Mayer P, Pittermann W, Wallat S. (1993). The effects of vitamin E on the skin. *Cosmet Toiletries*. 108:99–109.
- Mayer, K. P. (1985), Infrared roasting of nuts, particularly hazelnuts. *Confectionary production*, **51**, 313-314.
- McKenzie, R.L., et al. (2007), Changes in biologically-active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *Photochem Photobiol Sci*,. 6(3): p. 218-31.
- Mekhfi H et al. Effect of argan oil on platelet aggregation and bleeding time (2008) A beneficial nutritional property. *J Complem Integrative Med* . 5: 18.
- Melnikova, V.O. and H.N. (2005). Ananthaswamy, Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat Res*. 571(1-2): p. 91-106.
- Mensier P. H. (1957), Dictionnaire des huiles végétales. *Paul Lechevalier*, Paris. 764 p.
- Min D.B., Lee H.-O., (1999). Chemistry of lipid oxidation. 30 years of progress In Flavor Chemistry. Thirsty years of progress, TERANISHI R., WICK E.L. et HORSTEIN I.(Ed.), Kluwer Academic/Plenum Publishers, *New-York, Chapter 16*, 175-187.
- Moan, J., Porojnicu A.C., and Dahlback A. (2008). Ultraviolet radiation and malignant melanoma. *Adv Exp Med Biol*. 624: p. 104-16.
- Moon, H.J., Lee, S.R., Shim, S.N., Jeong, S.H., Stonik, V.A., Rasskazov, V.A., Zvyagintseva, T., Lee, Y.H., (2008). Fucoïdan inhibits UVB-induced MMP-1 expression in human skin fibroblasts. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31, 284–289.
- Moukal (2004), L'arganier, *Argania spinosa* L. (Skeels), usage thérapeutique, cosmétique et alimentaire. *Phytothérapie*. **2**, 135–141.
- Mouret, S., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J. and Douki, T. (2008). "Differential repair of UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimers in cultured human skin cells and whole human skin" *DNA Repair (Amst)*, **7**, 704-12.
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J. and Douki, T. (2006). "Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation" *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 13765-70.
- Moyal D, Fournanier A. (2004). Acute and chronic effects of UV on skin: What are they and how to study them? In: Rigel DS, Weiss RA, Lim HW, Dover JS, editors. Photoaging. New York: Marcel Dekker Inc;. pp. 15–32.
- Muanda N. F., Koné D., Dicko A., Soulimani R., Younos C., (2009). Phytochemical composition and antioxidant capacity of three Malian Medicinal plant parts. *ECAM doi:10.1093/ecam/ nep109*: 1 - 8.
- Mufti J. (2003). UV Protection. Household and Personal Products Industry. Jun, [Last accessed on 2011 Mar]. Available from: <http://www.happi.com/articles/2003/06/uv-protection> .

-N-

NIH Consensus statement (1990): Sunlight, ultraviolet radiation and the skin excerpts. NIH Consensus Statement. *Md Med J.* ;39:851–2. [PubMed: 2233150]

Norme marocaine homologuée de corps gras d'origines animale et végétale (2002), huiles d'argane N M 08.5.090. Ministère de l'Industrie, du Commerce, de l'Energie et des Mines.

Norval M. (2001), Effects of solar radiation on the human immune system, *J. Photochem. Photobiol.*, B 63 28–40.

Núñez, M. J., Costoya, N., (2008). Natural antioxidants in health and diseases: a perspective. *E-Journal Env Agric Food Chem.* 7, 3335-3342.

-O-

Offord, E.A., Gautier, J.C., Avanti, O., Scaletta, C., Runge, F., Kramer, K., Applegate, L.A., (2002). Photoprotective potential of lycopene, β -carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA-irradiated human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine* 32, 1293–1303.

Ostlund RE, Racette SB, Stenson WF (2002). Effects of trace components of dietary fat on cholesterol metabolism: phytosterol, oxysterol and squalene. *Nut Rev*; 60:349–59.

Owen R.W., Giacosa A., W.E. Hull (2000), *Eur. J. Cancer*, 36 1235– 1247.

-P-

Palacios, S., Calaf, J., Cano, A., Parrilla, J.J., Quereda, F., (2003). Relevant results of the WHI study for the management of the menopause in Spain. *Maturitas* 44, 83–86.

Pansini F, Cervellati C, Guariento A, et al. (2008). Oxidative stress, body fat composition, and endocrine status in pre- and postmenopausal women. *Menopause*;15(1):112–8.

Papas A.M. (1999), *Food Chem. Toxicol.* 37,999 – 1007.

Parrish JA, Jaenicke KF, Anderson RR (1982). Erythema and melanogenesis action spectrum of normal human skin. *Photochem Photobiol.* ;36:187–91.[PubMed: 7122713].

Pattison, D.I. and M.J. Davies (2006), Actions of ultraviolet light on cellular structures. *Exs*, (96): p. 131-57.

Pauly G *et al.* (2006), Cosmetic and/or dermatopharmaceutical preparations containing leaf extract of the plant *Argania spinosa*. Patent US 7,105,184 B2.

Russo GL. (2009), Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol*; 77: 937–946.

Plat J, Mensink RP (2005). Plant stanol and sterol esters in the control of blood cholesterol levels: mechanism and safety aspects. *Am J Cardiol*; 96:15 D–22D.

Plat J, Mensink RP (2001). Effects of plant sterols and stanols on lipid metabolism and cardiovascular risk. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*;11:31–40.

-R-

- Radava R. Korać and Kapil M. Khambholja (2011). Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. *Pharmacogn Rev.* Jul-Dec; 5(10): 164–173.
- Reaven PD, Khouw A, Beltz WF, Parthasarathy S, Witztum JL (1993). Effect of dietary antioxidant combinations in humans. Protection of LDL by vitamin E but not by betacarotene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;13:590e600
- Refsgaard H.H., Tsai L., Stadtman E.R. (2000). Modifications of proteins by polyunsaturated fatty acid peroxidation products. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol 97(2), p.611-616.
- Research on Menopause (1981). Report of a WHO Scientific Group. Geneva. *Switzerland: World Health Organization*. Report No.: 670.
- Rigel, D.S. (2008), Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. *J Am Acad Dermatol.* 58(5 Suppl 2): p. S129- 32.
- Rojas, S. Quideau, P. Pardon, Z. Charrouf (2005). Colorimetric evaluation of phenolic content and GC-MS characterization of phenolic composition of alimentary and cosmetic argan oil and press cake. *J Agric Food Chem.* **53**, 9122–9127.
- Roy, C.R., et al. (1998). The measurement of solar ultraviolet radiation. *Mutat Res.* 422(1): p. 7-14.

-S-

- Saklar, S. (1999). Optimization of hazelnut roasting process by using response surface methodology *PhD thesis*, Metu, Ankara. p. 213.
- Sandret F.G, (1957). Etude préliminaire des glucides et du latex de la pulpe du fruit d'Argan variation au cours de la maturation. *Bull. Soc. Chim. Biol*, 619-63.
- Sandert. Wana U.N. et F. Shahidi (1996). Stabilization Of Seal Blubber And Menhaden Oils with Green Tea Catechins. *J. Am. Oil. Chem.*, 73, no 9.
- Service de normalisation industrielle (Snima) (2003): Huiles d'arganes. Spécifications. Norme marocaine NM 08.5.090. Snima, Rabat (Morocco).
- Sies, H., (2010), Polyphenols and health: update and perspectives. *Arch Biochem Biophys.* 501, 2-5.
- Signorelli SS, Neri S, Sciacchitano S, et al. Behaviour (2006) of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas*; 53(1):77–82.
- Shrivastava V, Singh S, Singh N, Sapre S. (2005) Status of antioxidant enzymes and trace metals in postmenopausal women. *J Obstet Gynecol India*; 55(1):64–6.
- Soehnge, H. (1997). Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front Biosci*, 2: p. d538-51.

Sohal et Allen (1990). Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging : a unifying hypothesis. *Exp. Geront*; 25: 499-522.

-T-

Timmermann V.E (1990), Tocopherols, Antioxydative Wirkung Bei Fetten Und Olea. *Fac-Sci-Technol*, 92: 201-206.

Tornaletti, S. and G.P. Pfeifer (1996). UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *Bioessays*. 18(3): p. 221-8.

Trevisan M, Browne R, Ram M, et al. (2001), Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol*;154:348–56.

-U-

Utian WH. (1999). The International Menopause Society menopause-related terminology definitions. *Climacteric*;2(4):284–6.

-V-

Vina, J., Borras, C., Gambini, J., Sastre, J., Pallardo, F.V., (2005). Why females live longer than males? Importance of upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Lett*. 579, 2541–2545.

Visioli F, Bellomo G, Montedoro G, Galli C (1995). Low density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis*;117:25e32.

-W-

Wei, Y.H., et al. (1998), Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann N Y Acad Sci*, 854: p. 155-70.

Whitfield F.B., (1992) Volatiles from interactions of Maillard reactions and lipids .*Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.*, 31 (1/2), 1-58

Wlaschek M., Tanchcheva-Poor I., Naderi L., Ma W., Schneider L.A., Razi-Wolf Z., Schuller J., Scharffetter-Kochanek K. (2001), Solar UV irradiation and dermal photoaging, *J. Photochem. Photobiol.*, B 63, 41– 51.

Wilson R (2002). Aromatherapy: Essential Oils for Vibrant Health and Beauty, Part one: The basic principle of aromatherapy. New York: Penguin Putman Inc.

Wiseman SA, Mathot JN, de Fouw NJ, Tijburg LB. (1996 a) Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis*;120:15e23.

Wiseman H., Halliwell B.(1996 b) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* , vol 313(1), p.17-29.

-Y-

Yen GC, Shyu SL (1989). Oxidative stability of sesame oil prepared from sesame seeds with different roasting temperatures. *Food Chem* 31:215–224

Yoshida H (1994). Composition and quality characteristic of sesame oil (*Sesame indicum*) oil roasted at different temperature in an electric oven. *J Sci Food Agric* 65:331–336

Your Prescription for Ageless skin (2006). Vienna: You look so young LLC.

-Z-

Zheng, R., Shi, Y., Jia, Z., Zhao, C., Zhang, Q., Tan, X., (2010). Fast repair of DNA radicals. *Chem Soc Rev.* 39, 2827-2834.

Zhou J, Jang YP, Kim SR, Sparrow JR (2006). Complement activation by photooxidation products of A2E, a lipofuscin constituent of the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci.* 103:16182–7. [PMCID: PMC1637557] [PubMed: 17060630]

Zoubida Charrouf, Dominique Guillaume (1999). Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *Journal of Ethnopharmacology* 67. 7–14

Zoubida Charrouf (1999), Valorisation des produits de l'arganier pour une gestion durable des zones arides du sud-ouest marocain. *Actes du 4^{ème} Colloque Produits naturels d'origine végétale* (Ottawa 26-29 Mai 1998), p. 195-209.

Annexes

Certains travaux réalisés dans le cadre de ce travail de thèse ont permis de compléter des travaux parallèlement réalisés au Laboratoire. Ils ont donc faits l'objet de publications dont j'ai contribué à leurs réalisations et dont je suis co-auteur. Les publications sont reproduites ci-après.

Chemical and oxidative properties of olive and argan oils sold on the Moroccan market. A comparative study

Saïd Gharby · Hicham Harhar · Hanae El Monfalouti ·
Bader Kartah · Nadia Maata · Dom Guillaume ·
Zoubida Charrouf

Received: 8 June 2011 / Accepted: 2 August 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The chemical composition of four olive and four argan oils marketed in Morocco as extra-virgin oils was compared. Oxidative stability was also determined initially under accelerated conditions. Composition and oxidative stability of olive oils was found to be fluctuant and variety-dependent, whereas argan oil presents a profile that should more likely satisfy consumers eager to know the precise composition and nutritional property of their food.

Keywords Olive oil · Argan oil · Oxidative stability · Preservation · Edible oil

Introduction

Virgin olive oil (VOO) has long been well established around the mediterranean basin. Today, its consumption is continuously growing world-wide and annual total world production is estimated to be around 3 million metric tons. Extra-virgin olive oil is frequently presented as the ultimate quality oil. Virgin argan oil (VAO) is a new edible oil that

presently undergoes a meteoric rise and whose production has gone from virtually 0 to around 5,000 metric tons within 12 years. VOO and VAO share several similarities. Both oils (1) possess a strong traditional background, (2) are tree fruit oils, (3) are unrefined oils, (4) are mediterranean oils—exclusively from Morocco for argan oil, from the whole mediterranean basin for olive oil, (5) have multiple culinary applications, (6) contain high combined level of oleic/linoleic acids [1], (7) contain high level of polyphenols and tocopherols [2, 3], (8) have valuable nutritional/pharmacological properties [3–6], (9) are either of edible or cosmetic grade, (10) can be labelled as “extra-virgin”, a distinction reserved for the best oils with regard to their chemical composition, organoleptic characteristics and stability, and (11) are the most representative ingredient of an actively marketed diet—the mediterranean [5] and amazigh [6] diet for olive and argan oil; respectively. So many similarities frequently create a certain amount of confusion among consumers. Indeed, VAO, that has only reached the world-market recently, is less known than VOO and is sometimes simply regarded as a kind of olive oil sub-type in geographic areas where olive oil is not well established. Where olive oil is well established, argan oil is frequently viewed with condescension. Virgin argan and olive oils are actually very different. One often-neglected difference between the two oils is that the argan tree, from the fruit of which argan oil is prepared, presents much less genotypic variation than the olive tree [7]. Indeed, several cultivars (varieties) of this latter co-exist, leading to olive oils of different composition [8]. Irrigation, fertilization, climate, and soil also deeply influence VOO composition. With olive trees now cultivated in the whole mediterranean basin but also as far of it as Australia, South Africa, California, Chile, or Argentina [9, 10], the singular term olive oil appears inappropriate and it is a necessity to speak

S. Gharby · N. Maata
Laboratoire Contrôle Qualité, Lesieur-Cristal, Roches Noires,
Casablanca, Morocco

S. Gharby · H. Harhar · H. El Monfalouti · B. Kartah ·
N. Maata · Z. Charrouf
Laboratoire de Chimie des Plantes, Synthèse organique et
bioorganique, Département de Chimie, Faculté des Sciences,
Université Mohammed V-Agdal, Rabat, Morocco

H. El Monfalouti · D. Guillaume (✉)
UFR Médecine-Pharmacie, Université de Champagne-Ardenne,
51 rue Cognacq Jay, Reims, France
e-mail: dominique.guillaume@univ-reims.fr

Published online: 14 August 2011

 Springer

about olive oils whose composition in minor components is unknown to consumers. This is particularly regretful considering the health benefits attributed to VOO minor components [11, 12]. Conversely, argan tree almost exclusively wildly grows in a part of Morocco where annual climatic change is limited, and neither irrigation, fertilization, climate, nor soil composition impacts its oil composition. Indeed, argan oils between Morocco and Algeria possess a similar chemical composition even though Algerian argan oil would be richer in α -tocopherol [13]. Therefore, argan oil appears as a product of homogeneous composition that could easily satisfy consumer's desire for information and whose inhomogeneity simply results from factors as harvesting, fruit ripeness, post-harvest storage, or extraction system, factors inevitably affecting all edible oils.

Shelf life is another essential factor to master before getting consumer loyalty. To the best of our knowledge, shelf life of argan and olive oils has only been shallowly comparatively evaluated once [14]. The aim of this work is to evaluate the quality that consumers can possibly expect when they purchase extra-VOOs or extra-VAOs by comparing the physico-chemical properties and oxidative stability of randomly chosen argan and monovarietal olive oils found on the market. Storage was performed at 60 °C to amplify and accelerate oxidative processes.

Materials and methods

Material

Monovarietal extra VOOs were from arbequina, picual, and picholine (grown in Morocco or France) cultivars. Commercial monovarietal extra VOOs were acquired from local wholesalers. Picholine extra VOOs were from Zitoun Al Atlas (Casablanca, Morocco). Arbequina and picual extra-VOOs were imported from Barneo (Cordoba, Spain). One extra VAO was acquired from a supermarket (Casablanca, Morocco) and three were obtained from the cooperatives of Ait Baha, Tidzi, and Tiout (Morocco). Product traceability was only available from the cooperatives. It indicated that extra VAOs had been prepared during the last 3 months. Even though the date of preparation of the fourth argan oil and of olive oils was unknown, all selected oils had an expiry date exceeding the maximum duration of this investigation.

Chemical analyses

Oils were analysed at the time of purchase and after 9 weeks of storage at 60 °C. The chemical and physical parameters (acidity, peroxide index, absorption coefficients

in UV at 232 and 270 nm, iodine index, humidity, and fatty acid content) were analysed, in triplicate, following the analytical methods described in Regulations EC 2568/91 [15]. Resistance to oxidation was determined at various temperatures in triplicate on 3 g of oil using a Metrohm Rancimat 743 apparatus (Metrohm, Switzerland), with an airflow of 20 L/h [16].

Fatty acid composition was determined on their corresponding methyl esters by gas chromatography on a CP-Wax 52CB column (30 m $\times$ 0.25 mm i.d.) using He (flow rate 1 mL/min) as a carrier gas. Oven, injector, and detector temperature were set at 170, 200, and 230 °C; respectively. Injected quantity was 1 μ L for each analysis [16].

Sterol composition was determined after trimethylsilylation of the crude sterol fraction using a Varian 3800 instrument equipped with a VF-1 ms column (30 m $\times$ 0.25 mm i.d.) and using helium (flow rate 1.6 mL/min) as carrier gas. Column temperature was isothermal at 270 °C, injector and detector temperature was 300 °C. Injected quantity was 1 μ L for each analysis [16].

On the basis of the AOCS Official method Ce 8-89 [17], tocopherol content was determined by HPLC using Shimadzu instruments equipped with a C18-Varian column (25 cm $\times$ 4 mm). Detection was performed using a fluorescence detector (excitation wavelength 290 nm, detection wavelength 330 nm). Eluent used was a 99:1 isooctane/isopropanol (V/V) mixture, flow rate 1.2 mL/min.

Sensory analysis

Sensory evaluation of olive oils through panel testing was carried out as described under DGF method C-II 1 (07) [18] with a panel of four trained tasters with fully randomised sample presentation in triplicate. The scoring system and standard sensory profile was made up of 10 attributes.

Statistical analysis

Values reported in tables and figures are the mean values $\pm$ SE of 3–5 replications. The significance level was set at $P = 0.05$. Separation of mean values was performed by Tukey's test at the 0.05 significance level.

Results and discussion

Because extra VOOs from arbequina, picual, and picholine cultivars represent 85% of the sale of monovarietal VOOs in Morocco, we chose these three cultivars for our study. All samples were said to be of extra-virgin quality by retailers at their time of purchase. Arbequina and picual cultivars were from Spain (Catalonia and Andalusia,

respectively). Monovarietal picholine extra VOO sold on the Moroccan market is either from France or from Morocco; we independently evaluated picholine olive oils from each origin. Standards based on composition and organoleptic characteristics strictly govern the olive and argan oil classification used by commercial partners [19, 20]. We selected the oxidative stability under accelerated conditions as a criterium to reproduce the oil after-purchase behaviour. For each oil type, we compared the results of the analyses obtained after a 9-week storage at 60 °C with the values obtained immediately after purchase. Change rate was compared between each series. Because we ignored the storage time (the time separating oil preparation and its purchase) of olive oils, we also performed their sensory evaluation in order to get a precise picture of their initial state.

Every physicochemical parameter measured immediately after purchase (Table 1) met the necessary requirements for an extra-virgin oil classification [19] even though arbequina sample acidity reached the upper limit of 0.8/100 g allowed for the extra-VOO labelling. Moroccan picholine olive oil presented the second highest initial acidity (0.62/100 g). French picholine and picual olive oils presented a low initial acidity (0.44/100 and 0.11/100 g, respectively). Those values were in the same range than those determined for virgin argan oils (Table 2). Initial peroxide value of olive and argan oils were found well

below the accepted limit (Tables 1, 2) suggesting that no overoxidation was currently occurring at the time of purchase. All other parameters (saponification and iodine values, absorption coefficients in UV at 232 and 270 nm – K_{232} and K_{270} , respectively) evaluated for VOOs and VAOs were in similar ranges (Tables 1, 2).

Sterol levels determined for VOOs and VAOs were, in a given oil series, homogeneous and a very little variation as a function of the olive varietal origin was observed (Tables 3, 4). Generally claimed differences between arbequina and picual monovarietal olive oil sterol content [21] could not be confirmed on our samples. Tocopherols are also economically and nutritionally important molecules to analyse because of their preservation and free-radical scavenging properties. δ -Tocopherol level in olive oils underwent large variations; from above 20 mg/kg in monovarietal Moroccan picholine and arbequina oils but only 6.6 mg/kg in French picholine oil (Table 3). The content of α -tocopherol content, the major tocopherol in olive oil, was 152 mg/kg in monovarietal picual oil but reached 199 mg/kg in monovarietal French picholine olive oil (Table 3). Conversely, no significant variations were observed in VAO tocopherol content (Table 4). Fatty acid composition of evaluated VOOs was also found to be satisfactory in terms of International Olive Council-imposed rules (Table 3). As expected, a larger range of values was observed for VOOs compared to VAOs. Particularly for palmitic acid content

Table 1 Authorized values (norm) and initial physicochemical parameters of evaluated VOOs

	VOO norm	Arbequina	Picholine		Picual
			French	Moroccan	
Acidity (g/100 g)	<0.8	0.8 ± 0.02	0.44 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Peroxide value (meq/kg)	<20	3.2 ± 0.5	2.8 ± 0.9	2.1 ± 0.5	1.9 ± 0.5
Saponification value (mgKOH/g)	184–196	195.6 ± 0.1	193.7 ± 0.1	194.5 ± 0.1	195.4 ± 0.1
Iodine value	75–94	85.9 ± 0.5	90.1 ± 1	87.7 ± 1	82.3 ± 1
K_{232}	<2.50	2.10 ± 0.01	1.89 ± 0.01	1.71 ± 0.01	1.72 ± 0.01
K_{270}	<0.22	0.13 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.11 ± 0.01
ΔK	<0.01	0.0009	–0.002	–0.002	–0.005
Moisture and volatiles (%)	0.2	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01

Table 2 Authorized values (norm) and initial physicochemical parameters of evaluated VAOs

	VAO norm	Argan 1	Argan 2	Argan 3	Argan 4
Acidity (g/100 g)	<0.8	0.29 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01
Peroxide value (meq/kg)	<15	1.1 ± 0.2	0.7 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Saponification value (mgKOH/g)	189–199.1	190.5 ± 0.1	189.7 ± 0.3	189.9 ± 0.2	189.5 ± 0.2
Iodine value	91–110	102.5 ± 1	97.7 ± 0.5	98.3 ± 0.5	97.5 ± 0.5
K_{232}		1.31 ± 0.02	1.34 ± 0.02	1.19 ± 0.06	1.02 ± 0.07
K_{270}	<0.35	0.17 ± 0.01	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.04	0.18 ± 0.05
ΔK	<0.01	0.003	–0.001	0.001	–0.003
Moisture and volatiles (%)	<0.1	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01

Table 3 Authorized values and initial fatty acid, sterol, and tocopherol composition of evaluated VOOs

	VOO norm	Arbequina	Picholine		Picual
			French	Moroccan	
Fatty Acids (%)					
Palmitic acid	7.5–20	14.3 ± 1.5	9.1 ± 1.5	9.2 ± 1.5	12.7 ± 1.5
Stearic acid	0.5–5	2.0 ± 0.5	3.2 ± 0.5	2.9 ± 0.5	2.9 ± 0.5
Oleic acid	55–83	67.1 ± 2.5	72.6 ± 2.5	74.6 ± 2.5	76.3 ± 2.5
Linoleic acid	3.5–21	13.2 ± 1.5	12.5 ± 1.5	10.7 ± 1.5	5.4 ± 1.5
Linolenic acid	<1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Sterols (% of total sterols)					
Cholesterol	<0.5	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.2 ± 0.01
Brassicasterol	<0.1	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01
Campesterol	<4	2.7 ± 0.2	2.9 ± 0.2	3.1 ± 0.3	3.1 ± 0.5
Stigmasterol	<campesterol	1.7 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.1
Other sterols	>93	93.8 ± 8	94.1 ± 10	94.8 ± 8	94.2 ± 7
Total sterols	>100	241.2 ± 10	239.7 ± 15	207 ± 10	207.3 ± 15
Tocopherols (mg/kg)					
α-Tocopherol		166.3 ± 15	199 ± 20	167 ± 15	152 ± 15
β-Tocopherol		11.7 ± 3	10.2 ± 2.5	10.5 ± 2.5	7.5 ± 2
γ-Tocopherol		1.9 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.5 ± 0.5
δ-Tocopherol		21.9 ± 6	6.6 ± 4	20.1 ± 6	16.8 ± 5
Total	150–250	202 ± 21	218 ± 31	182 ± 30	189 ± 33

Table 4 Authorized values and initial fatty acid, sterol, and tocopherol composition of evaluated VAOs

	VAO norm	Argan 1	Argan 2	Argan 3	Argan 4
Fatty Acids (%)					
Palmitic acid	11.5–15	13.2 ± 1.5	13 ± 1.5	12.1 ± 1.5	12.8 ± 1.5
Stearic acid	4.3–7.2	6.1 ± 1	5.5 ± 1	6.2 ± 1	6.4 ± 1
Oleic acid	43–49.1	45.3 ± 1.5	48.4 ± 1.5	46.9 ± 1.5	47.4 ± 1.5
Linoleic acid	29.3–36	34.1 ± 1.5	32.3 ± 1.5	33.3 ± 1.5	32.4 ± 1.5
Linolenic acid	<0.3	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.08 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Sterols (% total sterols)					
Cholesterol	<0.4	0.1 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01
Campesterol	<0.4	0.2 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.15 ± 0.01
Schottenol	44–49	46.5 ± 2	46.4 ± 2	46.7 ± 2	45.9 ± 2
Stigma-8-22-dien-3β-ol	3.2–5.7	4.7 ± 0.5	5.5 ± 0.5	4.3 ± 0.5	4.9 ± 0.5
Spinasterol	34–44	40.1 ± 2	39.5 ± 2	37.1 ± 2	35.8 ± 2
Total sterols (mg/100 g)	<220	174.6 ± 10	130.5 ± 10	169.0 ± 10	172.6 ± 10
Tocopherols (mg/kg)					
α-Tocopherol	18–75	53 ± 6	59 ± 6	49.5 ± 6	46.9 ± 6
β-Tocopherol	1–5	2.3 ± 0.6	5.0 ± 1	1.5 ± 0.6	1.2 ± 0.6
γ-Tocopherol	640–810	756 ± 26	531 ± 25	651.4 ± 2	639.4 ± 26
δ-Tocopherol	54–110	54.2 ± 6	55 ± 6	57.3 ± 6	55.6 ± 6
Total	600–900	871 ± 26	675 ± 25	738 ± 26	732.5 ± 26

went from 9.1% (French picholine oil) to 14.3% (arbequina oil), oleic acid: from 67.1% (arbequina oil) to 76.3% (picual oil), and linoleic acid: from 5.4% (picual oil) to 13.2% (arbequina oil). Accordingly the unsaturated fatty acids/saturated fatty acids ratio went from 4.9 for arbequina VOO

to 7 for Moroccan picholine VOO. Monovarietal arbequina oil sample presented the highest linoleic acid content of all VOOs, almost 2.5-fold that of picual VOO (13.2 vs. 5.4%) (Table 3). This could represent a nutritional advantage but could also contribute to reduced storage stability. Indeed,

Table 5 Initial rancimat induction period in hour of evaluated VOOs at different temperatures

Temperature (°C)	Arbequina	Picholine		Picual
		French	Moroccan	
100	25.1 ± 1	44.1 ± 2	43.6 ± 1	49.6 ± 1.5
110	11.9 ± 1.5	18.4 ± 1.5	21.3 ± 1	26.1 ± 1
120	5.9 ± 1	9.2 ± 1.5	9.7 ± 1.5	12.0 ± 1.5
130	3.1 ± 1	4.4 ± 1	4.8 ± 1	5.7 ± 1
140	1.4 ± 0.5	1.8 ± 0.5	1.9 ± 1	2.3 ± 0.5
150	0.6 ± 0.5	0.9 ± 0.5	1.1 ± 0.5	1.2 ± 0.5

Table 6 Initial rancimat induction periods in hour of studied VAOs at different temperatures

Temperature (°C)	Argan 1	Argan 2	Argan 3	Argan 4
100	59.1 ± 2.5	48.1 ± 2.5	51.6 ± 2.5	49.6 ± 2.5
110	28.9 ± 1.5	24.1 ± 1.5	27.5 ± 1.5	31.5 ± 1.5
120	15.8 ± 1.5	12.2 ± 1.5	14.7 ± 1.5	12.0 ± 1.5
130	7.6 ± 0.5	6.4 ± 1	6.8 ± 1	6.7 ± 1
140	3.8 ± 0.5	3.8 ± 0.5	2.9 ± 1	3.3 ± 0.5
150	2 ± 0.5	1.9 ± 0.5	1.7 ± 0.5	1.9 ± 0.5

rancimat induction period of arbequina oil sample was the shortest (25.1 h at 100 °C) whereas other VOOs presented, for the same temperature, almost twofold rancimat induction time (between 44 and 49.6 h) (Table 5). Such reduced rancimat induction period for the arbequina sample was repeatedly observed at all the evaluated temperatures (Table 5). Interestingly, VAO content in linoleic acid is much higher than that of VOOs, arbequina oil included (Tables 3, 4). Nevertheless, VAO behaved more satisfactorily under Rancimat conditions and its notorious high tocopherol level is generally advanced to explain its oxidative stability. Accordingly, in the rancimat test performed at 100 °C, the shortest rancimat induction period of

the four studied VAOs was found to be 48.1 h (Table 6). At 140 °C and beyond, rancimat induction times for VOOs and VAOs were not significantly different anymore.

Even though physico-chemical data provide useful information, we decided to use the sensory methodology to further assess the quality of olive oils. Several parameters were evaluated and an overall score was produced. In our study, arbequina oil did not satisfy the criteria for extra VOO (median of the defect Me = 0.35) whereas all three other samples gave satisfactory results (median of the defect Me = 0 and median of the fruity attributes Me superior to 0). Together with its high acidity, these preliminary analyses indicated that at the moment of its purchase, the arbequina sample was of relatively poor quality and did not present the necessary requirements to be labelled extra-VOO anymore.

Then, we evaluated the oxidative stability of our oils over a 9-week storage at 60 °C. Oil physico-chemical parameters were regularly monitored during this period. Because the four VAO samples displayed very homogeneous data, and since preservation of VAO from cooperatives has already been evaluated [16], we continued our study only on the sample bought from the supermarket since its quality was more uncertain. Oil acidity, peroxide value, K_{232} , and K_{270} were monitored on a weekly basis whereas rancimat induction time was monitored every 3 weeks. Fatty acid and tocopherol composition was also analyzed to evaluate the impact of the latter on preservation and of oxidation on the former.

Acidity of French picholine and picual olive oils that was initially low remained remarkably low over all the study (Table 7). However, the evolution rate was different since French picholine oil acidity underwent a 70% increase whereas that of picual oil underwent a 145% increase, even though it remains thrice lower than that of French picoline oil (0.27 vs. 0.75). Acidity of Moroccan picholine that was initially slightly higher than that of French picholine remained relatively stable to reach 0.94 after 9 weeks (51% increase). Arbequina whose acidity

Table 7 Acidity (g/100 g) of VOOs and VAO over 9 weeks

Week	Arbequina	Picholine		Picual	Argan
		French	Moroccan		
1	1.17 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.31 ± 0.01
2	1.56 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.32 ± 0.01
3	1.69 ± 0.01	0.53 ± 0.01	0.72 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.34 ± 0.01
4	1.72 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.73 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.35 ± 0.01
5	1.75 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.35 ± 0.01
6	1.77 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.77 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.37 ± 0.01
7	1.83 ± 0.01	0.63 ± 0.01	0.79 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.40 ± 0.01
8	1.86 ± 0.01	0.71 ± 0.01	0.83 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.42 ± 0.01
9	1.92 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.94 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.43 ± 0.01

Table 8 Peroxide values (meq/kg) of VOOs and VAO over 9 weeks

Week	Arbequina	Picholine		Picual	Argan
		French	Moroccan		
1	10.1 ± 0.5	5.5 ± 2.2	4.9 ± 0.8	3.8 ± 1.2	1.9 ± 0.5
2	15.7 ± 1.5	7.9 ± 1.5	8.7 ± 1.7	7.9 ± 0.9	2.1 ± 1
3	19.9 ± 0.5	13.4 ± 3.5	11.8 ± 1.2	10.6 ± 1.6	3.8 ± 1.5
4	20.4 ± 2.3	15 ± 2.7	12.5 ± 1.5	11.2 ± 0.5	4.5 ± 0.5
5	24.2 ± 1.8	16.3 ± 0.8	14.6 ± 0.6	18.2 ± 2.2	7.5 ± 1.5
6	31.1 ± 3.1	20.1 ± 3.5	18.9 ± 2	20.1 ± 1.2	8.1 ± 0.5
7	40.1 ± 2.5	27.2 ± 2.5	22.2 ± 1.2	23.5 ± 1.5	9.9 ± 1.5
8	45.8 ± 4.5	32.6 ± 2.5	25.1 ± 1.1	28.4 ± 1.5	10.5 ± 0.5
9	62.1 ± 3.5	36.5 ± 1.5	33.1 ± 2.5	31.5 ± 2.5	14.2 ± 1.7

Table 9 K_{232} and K_{270} of VOOs and VAO over 9 weeks

Week	Arbequina	Picholine		Picual	Argan
		French	Moroccan		
1					
K_{232}	2.33 ± 0.01	1.89 ± 0.01	1.82 ± 0.01	2.01 ± 0.01	1.43 ± 0.01
K_{270}	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.21 ± 0.01
2					
K_{232}	2.35 ± 0.01	2.17 ± 0.01	2.21 ± 0.01	2.10 ± 0.01	1.40 ± 0.01
K_{270}	0.25 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.22 ± 0.01
3					
K_{232}	2.42 ± 0.01	2.11 ± 0.01	2.24 ± 0.01	2.15 ± 0.01	1.48 ± 0.01
K_{270}	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.01
4					
K_{232}	2.67 ± 0.01	2.45 ± 0.01	2.32 ± 0.01	2.43 ± 0.01	1.52 ± 0.01
K_{270}	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01
5					
K_{232}	2.72 ± 0.01	2.53 ± 0.01	2.48 ± 0.01	2.49 ± 0.01	1.55 ± 0.01
K_{270}	0.33 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01
6					
K_{232}	2.75 ± 0.01	2.57 ± 0.01	2.57 ± 0.01	2.6 ± 0.01	1.57 ± 0.01
K_{270}	0.38 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.27 ± 0.01
7					
K_{232}	3.11 ± 0.01	2.72 ± 0.01	2.80 ± 0.01	2.7 ± 0.01	1.62 ± 0.01
K_{270}	0.41 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.01
8					
K_{232}	3.52 ± 0.01	2.99 ± 0.01	3.15 ± 0.01	2.89 ± 0.01	1.70 ± 0.01
K_{270}	0.45 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.27 ± 0.01
9					
K_{232}	3.71 ± 0.01	3.41 ± 0.01	3.39 ± 0.01	3.26 ± 0.01	1.81 ± 0.01
K_{270}	0.65 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.55 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.28 ± 0.01

was already high exhibited after 9 weeks, the highest acidity of 1.92 (140% increase). VAO underwent a comparatively moderate 48% increase over 9 weeks, from 0.29 to 0.43.

Peroxide value of arbequina increased by 1,840% over 9 weeks, the largest increase of the studied samples,

suggesting the strong occurrence of oxidative processes (Table 8). Peroxide value of VAO and French picholine oil increased only by 1,240% and that of Moroccan picholine and picual oils increased intermediately by 1,470%. Those results indicate that oxidative processes vary in different oil samples.

Table 10 Rancimat induction time in hour at 110 °C of VOOs and VAO over 9 weeks

Week	Arbequina	Picholine		Picual	Argan
		French	Moroccan		
3	10.1 ± 1.5	18.4 ± 1.5	21 ± 2.5	20.6 ± 2	25.1 ± 1.5
6	4.9 ± 2.5	13.4 ± 1	7.2 ± 1.5	9.6 ± 1.5	22.5 ± 2.5
9	1.4 ± 1	5.2 ± 1.5	5.2 ± 1.5	5.7 ± 2	20.5 ± 2.5

Table 11 Fatty acid percentage in VOOs and VAO over 9 weeks

Week	Acid	Arbequina	Picholine		Picual	Argan
			French	Moroccan		
3	C16:0	14.4 ± 1.5	9.2 ± 1	9.2 ± 1	12.3 ± 1.5	13.1 ± 1.5
	C18:0	2 ± 0.5	3.2 ± 0.3	2.9 ± 0.4	2.9 ± 0.4	6.1 ± 1
	C18:1	67.2 ± 12	72.8 ± 14	74.8 ± 12	76.4 ± 14	46 ± 2
	C18:2	13.1 ± 5	12.5 ± 5	10.7 ± 5	5.2 ± 1	33.7 ± 3
	C18:3	0.7 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.15 ± 0.05
6	C16:0	15 ± 5	9.3 ± 1.5	9.6 ± 1.5	13.1 ± 3.5	13.5 ± 2.5
	C18:0	2 ± 0.5	3.2 ± 0.6	2.9 ± 0.5	2.9 ± 0.5	5.6 ± 1
	C18:1	67.3 ± 10.5	72.9 ± 11	74.6 ± 10.5	76.2 ± 10.5	47.9 ± 3.5
	C18:2	12.7 ± 5	12.2 ± 5	10.4 ± 5	5.2 ± 1	31.6 ± 3.5
	C18:3	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.02	0.9 ± 0.03	0.6 ± 0.1	0.1 ± 0.03
9	C16:0	15.9 ± 5	9.3 ± 3	9.8 ± 3	13 ± 5	13.7 ± 2.5
	C18:0	2.1 ± 0.5	3.2 ± 0.5	2.9 ± 0.5	2.9 ± 0.5	5.6 ± 0.5
	C18:1	68.7 ± 10	73.3 ± 12	74.9 ± 15	76.7 ± 10	47.6 ± 9
	C18:2	10.2 ± 1	11.7 ± 2	10.2 ± 1	5 ± 0.5	31.8 ± 2.5
	C18:3	0.3 ± 0.05	0.8 ± 0.05	0.7 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.1 ± 0.05

Table 12 Tocopherol levels (mg/kg) in VOOs and VAO over 9 weeks

Week	Tocopherol	Arbequina	Picholine		Picual	Argan
			French	Moroccan		
3	α-T	125.3 ± 15	147.1 ± 17	129.8 ± 18	162.4 ± 25	46.9 ± 9
	β-T	7.5 ± 1.5	11 ± 1.5	9.1 ± 1	7.5 ± 1.5	1.2 ± 0.5
	γ-T	1.9 ± 0.5	3.3 ± 1	2.05 ± 0.5	2.5 ± 0.5	603.3 ± 19
	δ-T	9.3 ± 2	6.2 ± 1	1.9 ± 0.5	16.8 ± 5	42.8 ± 7
	Total	144.0 ± 21	167.6 ± 22	143.3 ± 19	189.3 ± 35	811.6 ± 26
6	α-T	95.1 ± 15	145.3 ± 20	91.6 ± 10	130.9 ± 14	38.5 ± 9
	β-T	5.8 ± 0.15	8.2 ± 1	9.1 ± 1	6.1 ± 1	1.1 ± 0.5
	γ-T	2.3 ± 0.5	2.3 ± 0.5	2 ± 0.5	2.1 ± 0.5	563.4 ± 35
	δ-T	15.9 ± 6	1.0 ± 0.1	1.3 ± 0.2	14.7 ± 1.5	38.6 ± 5
	Total	119.4 ± 45	157.1 ± 35	104.8 ± 15	154.3 ± 25	642.2 ± 25
9	α-T	60 ± 10	119.6 ± 25	82.2 ± 11	103.4 ± 15	37.5 ± 6
	β-T	4.1 ± 1.5	7.9 ± 1	8.6 ± 1	4.8 ± 0.6	1.0 ± 0.5
	γ-T	1.3 ± 0.5	2 ± 0.2	2 ± 0.2	1.7 ± 0.1	516.9 ± 15
	δ-T	9.8 ± 1	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	11.5 ± 1	42.2 ± 5
	Total	75.5 ± 12	132.6 ± 20	94.3 ± 15	121.1 ± 25	599.6 ± 33

Changes in specific absorption at 232 nm (K_{232}) are useful to evaluate formation of primary oxidation products. For all VOOs, increased in K_{232} was between 76 and 98%. For VAO, whose initial K_{232} was already low, increase was

only of 38% (Table 9). Specific absorption at 270 nm (K_{270}) is a marker for secondary oxidation product formation. Increase was between 190 and 320% for picholine and picual VOOs, it was 400% for arbequina VOO and

only 64% for VAO (Table 9). Primary and secondary oxidation product formation appeared to be much slower in VAO than in the four studied VOOs.

Rancimat induction period of arbequina VOO that was already initially short remained consistently the shortest over 9 weeks to be of only 1.4 h at the end of the study (Table 10). This represented an 88% decrease during the whole analysis. For the three other VOOs, rancimat induction period remained close to 5 h after 9 weeks. Rancimat induction period after 9 weeks was 20 h, it only decreased 29% confirming that high linoleic acid content is not necessarily synonymous of low preservation time, as determined by the rancimat method.

No significant changes were observed in the fatty acid composition of VOOs and VAO over 9 weeks (Table 11). After 9 weeks at 60 °C, tocopherol levels dramatically changed, being as low as 75 mg/kg for arbequina olive oil even though this sample did not present the initially the lowest tocopherol level (Table 12). This demonstrates that tocopherols have been lost during the oxidative processes that occurred in this sample.

In conclusion, our study shows that whereas extra-VAO is a product of relatively homogeneous composition, the chemical composition of extra-VOO regularly sold on the market undergoes strong variations. It must be clearly stated that the aim of this study was not to identify a type of oil as *superior* to another and the limited number of oil samples studied does certainly not allow such conclusion. However, our study evidences that, in addition to cultivar-associated fluctuation in chemical composition, once marketed, VOOs and VAOs are likely to behave very differently and within VOOs, different varietal origin leads to different oxidative behaviours in the consumer cupboard. Therefore, extra-VOO consumers might expect too much from their purchase oil. Indeed, their oil may never have possessed—or may not possess anymore—the nutritional properties looked for by the consumer. Conversely, extra-VAO consumers will purchase a product whose composition is homogeneous and altered by time in a limited and reliable manner. Consequently, the nutritional value of argan oil is likely to be more preserved on the long term.

Acknowledgments We thank Lesieur-Cristal, cooperatives Targant (Ait Baha), Taitmatine (Tiout), and Tidzi-cooperative for their financial support and assistance in this work; respectively.

Conflict of interest None.

References

- Dubois V, Breton S, Linder M et al (2007) Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur J Lipid Sci Technol* 109:710–732
- Waterman E, Lockwood B (2007) Active components and clinical applications of olive oil. *Altern Med Rev* 12:331–342
- Charrouf Z, Guillaume D (2008) Argan oil: occurrence, composition and impact on human health. *Eur J Lipid Sci Technol* 110:632–636
- El Monfalouti H, Guillaume D, Denhez C et al (2010) Therapeutic potential of argan oil: a review. *J Pharm Pharmacol* 62:1669–1675
- Mataix J, Batino M, Ramirez-Tortosa MC et al (2008) Virgin olive oil: a key healthy component of the Mediterranean diet. *Mediterr J Nutr Metab* 1:69–75
- Charrouf Z, Guillaume D (2010) Should the amazigh diet (regular and moderate argan-oil consumption) have a beneficial impact on human health? *Crit Rev Food Sci Nutr* 50:473–477
- Ait Aahd N, El Ayadi F, Msanda F et al (2010) Genetic variability of argan tree and preselection of the candidate plus trees. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* 38:293–301
- Vossen P (2007) Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. *HortScience* 42:1093–1100
- Smyth JD (2002) Perspectives of the Australian olive industry. *Adv Hort Sci* 3–4:280–288
- Grigg D (2001) Olive oil, the Mediterranean and the world. *Geojournal* 53:163–172
- Perez-Jimenez F, Alvarez de Cienfuegos G, Badimon L et al (2005) International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *Eur J Clin Invest* 35:421–424
- Lopez-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E et al (2010) Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20:284–294
- Yousfi M, Bombarda I, Hamia C et al (2009) Fatty acid, triglyceride and tocopherol composition of Algerian argan (*Argania spinosa*) fruit seed lipids. *Mediterr J Nutr Metab* 2:197–203
- Chimi H (2005) Conservations comparées de l'huile d'argane et de l'huile d'olive. *Cahiers Agric* 14:467–471
- Commission Regulation (EEC) (1991) 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Off J Eur Commun L* 248:1–82
- Gharby S, Harhar H, Guillaume D et al (2011) Oxidative stability of edible argan oil: a 2 year study. *LWT Food Sci Technol* 44:1–8
- American oil chemist's society (1993) Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by HPLC. Uniform Methods Committee. AOCS Official Method Ce 8e89. Champaign, IL: AOCS
- DGF (2008) Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- Codex Alimentarius Commission, Stan 33, 1981, revised 2-, 2003 Codex Alimentarius Commission (2003) (CODEX Stan 33, 1981, revised 2-2003). CODEX Standard for olive oils and olive pomace oils. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome
- Service de Normalisation Industrielle Marocaine (SNIMA) (2003) Huiles d'argane. Spécifications. Norme marocaine NM 08.5.090 Rabat: Snima, 2003
- Aparicio R, Luna G (2002) Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *Eur J Lipid Sci Technol* 104:614–627

Influence of Argan Kernel Roasting-time on Virgin Argan Oil Composition and Oxidative Stability

Hicham Harhar · Saïd Gharby · Bader Kartah ·
Hanae El Monfalouti · Dom Guillaume ·
Zoubida Charrouf

© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract Virgin argan oil, which is harvested from argan fruit kernels, constitutes an alimentary source of substances of nutraceutical value. Chemical composition and oxidative stability of argan oil prepared from argan kernels roasted for different times were evaluated and compared with those of beauty argan oil that is prepared from unroasted kernels. Prolonged roasting time induced colour development and increased phosphorous content whereas fatty acid composition and tocopherol levels did not change. Oxidative stability data indicate that kernel roasting for 15 to 30 min at 110 °C is optimum to preserve virgin argan oil nutritive properties.

Keywords *Argania spinosa* · Oxidative stability · Seed roasting · Virgin argan oil

Abbreviations

AV	acid value
A_w	activity of water
B[a]P	benzo[a]pyrene
FA	fatty acid

H. Harhar · S. Gharby · B. Kartah · H. El Monfalouti · Z. Charrouf
Laboratoire de Chimie des Plantes et Synthèse Organique et
Bioorganique, Faculté des Sciences,
Université Mohammed V-Agdal,
BP1014 Rabat, Morocco

S. Gharby
Laboratoire Contrôle Qualité, Lesieur-cristal,
1 Rue de Caporal Corbi, 20300 Roches noires,
Casablanca, Morocco

H. El Monfalouti · D. Guillaume (✉)
Laboratoire de Chimie Thérapeutique, UFR Médecine-Pharmacie,
51 Rue Cognacq Jay,
51100 Reims, France
e-mail: dominique.guillaume@univ-reims.fr

FID	flame ionization detector
IP	induction period
MEQ	milliequivalent
PPM	parts per million
PPB	parts per billion
PV	peroxide value

Introduction

Virgin argan oil is an ethnic and edible seed oil prepared by cold-pressing argan fruit kernels [1]. Virgin argan oil composition includes most of the phytochemicals presented as major functional food ingredients, so far [1, 2]. Interestingly, argan oil also exists as cosmetic and beauty grades. Cosmetic argan oil is prepared by solvent extraction of argan kernels and is exclusively used by cosmetic laboratories for its skin protective properties [3]. To prepare beauty and edible argan oils argan kernels are mechanically cold screw-pressed. Non-roasted kernels afford beauty argan oil whereas roasted kernels deliver the nutraceutic oil; the basis of the now well-known amazigh diet [4] and its potential health benefits are numerous [5]. Raw material quality, roasting and storage conditions, and expelling methods are key steps to making high quality edible seed oil [6, 7]. Indeed, oil processing influences resulting oil colour, flavour, composition, quality, and stability. Therefore, comparison of beauty argan oil properties with those of edible argan oil easily provides information on the influence of the roasting process. Edible argan oil is only produced in Morocco, so far. However, the demand for this oil is so rapidly increasing in Europe that the possibility of its preparation out of Morocco, where no traditional knowledge exists, cannot be discarded anymore. Therefore, we initiated

Published online: 26 March 2011

 Springer

a study aimed at identifying the most critical factors influencing virgin argan oil quality. In this respect, we recently reported that prolonged kernel storage should be done at 4 °C for preserving kernel quality [8]. We also evidenced the necessary elimination of goat-peeled argan fruit from the oil preparative process [9, 10]. Finally, it has been shown that argan oil prepared from mechanically pressed kernels presents a better profile than hand-pressed oil, in terms of chemical composition [11, 12], taste, and preservation [9, 12]. Argan kernel roasting also deserves attention because it induces pleasant hazelnut aroma and taste that transfer to the oil during extraction [10]. Traditionally, edible argan oil is prepared on a family-scale [13–15]. Each family possesses its roasting method (time, flame to plate distance, amount of kernels per run...) that is secretly preserved and handed down orally from mother to daughter. Consequently, little investigation has been conducted to correlate kernel roasting-time and edible argan oil quality.

The objective of this study was to identify an optimum roasting-time by investigating the nutritional quality of argan oils prepared from argan kernels roasted for different times through 1) fatty acid composition, colour formation, and tocopherol and phospholipid composition, and 2) oxidative stability. Even though roasting can be achieved with electric instruments (microwave or regular ovens), we used a traditional gas burner whose temperature was set at 110 °C in order to reproduce the technology used for virgin edible argan oil preparation in most production centers.

Materials and Methods

Argan Oil Preparation and Reagents

Argan fruit was collected in Agadir region in June 2007. Members of Tangant cooperative (Morocco) sun-dried the fruit for three weeks, performed mechanical dehulling (SMIR Technotour, Agadir, Morocco), and manually collected the kernels (40 kg). Roasting was performed at 110 ± 5 °C for 15, 30, or 45 min. Temperature was controlled using a Testo 945 sensor/thermometer (Testo, Casablanca, Morocco). Oil extraction was carried out using Komet DD 85 G presses (IBG Monforts Oekotec GmbH, Mönchengladbach, Germany). Beauty oil was similarly prepared from unroasted kernels. Standards and chemicals were purchased from Professional Labo (Casablanca, Morocco). Chemicals used were of analytical grade.

Water Analyses, Acid, Peroxide Values and UV Absorption

Moisture content was determined according to AOAC recommendations [16] using a Jouan Quality oven. A Fast

lab a_w metre (GBX, Bourg de Péage, France) was used for water activity determination. Acid value (AV) expressed as percentage of oleic acid; peroxide value (PV) expressed as milliequivalents of active oxygen per kilogram of oil (meq O₂/kg), and K_{232} and K_{270} extinction coefficients, calculated from absorption at 232 and 270 nm, were measured following the analytical methods described in EEC 2568/91 [17] as already described [11].

Benzo[a]pyrene Content

Benzo[a]pyrene (B[a]P) content was determined following the NF EN ISO 15302:2007 norm [18]. Briefly, 2 g of oil were weighed (precision of 0.1 mg), then dissolved in petroleum ether (total volume 10 ml). The mixture was homogenized by shaking. In a glass column (300 mm × 15 mm) fitted with a sintered-glass filter, 22 g of aluminum oxide were introduced and topped with anhydrous sodium sulfate (30 mm) and the column was tapped to pack it. After conditioning the column by passing 30 ml of petroleum ether without allowing it to dry, 2 ml of oily solution were charged onto the column that was eluted with an additional 5 ml of petroleum ether. The initial eluted fraction (20 ml) was discarded. The column was then eluted with additional petroleum ether and the fraction (60 ml) was collected in a 100-ml conical flask. The solution was evaporated at 35 °C under vacuum to approximately 0.50-ml volume then to total dryness under a nitrogen flow. For HPLC analysis, the residue was dissolved in 50 µl of acetonitrile by shaking. An aliquot of 10 µl was injected into the HPLC using an auto-sampler (ProStar 410, Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) with pick-up injection mode to avoid cross-contamination. HPLC system: ProStar HPLC equipped with a Varian C18 column (25 cm × 4.6 mm), a ChromSep guard cartridge (Varian Chrompack, Varian Inc., Middelburg, The Netherlands), was set up maintaining the column temperature at 20 °C and using a mixture of acetonitrile/water (7:1) as mobile phase at a flow rate of 1.2 ml min⁻¹ and a Varian ProStar 363 fluorimetric detector. Fluorescence emission was excited at the wavelength of 306 nm and recorded at 408 nm, data were processed using Varian Star Workstation v 6.30 (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA).

Refractive Index, Colour Development

The refractive indices were measured at 20 °C (± 0.2 °C) according to the AOCS Cc 7–25 [19] procedure using a NAR-1T refractometer (Atago, Bellevue, WA, USA). Colour development was determined at 45 °C with a Lovibond Tintometer Model PFX990 (Dortmund, Germany) using the AOCS standard method Cc13e-92 [19]. Results were expressed on Red and Yellow scale.

Fatty Acid Composition

Oils were esterified according to the AOCS standard method Ce 2–66 [19]. Into 5 ml screw top test tubes, oil (0.60 g) was weighted and dissolved in 4 ml of iso-octane. Volumes (0.20 ml) of 2 N methanolic KOH solution were added, and the tubes were tightened with a screw cap provided with a PTEF joint, then were vigorously shaken. The upper layers were separated, and methyl esters were extracted with hexane. Then aliquots (1 µl) were injected into a gas chromatograph (Varian CP-3800, Varian Inc.) equipped with a FID. The column used was a CP-Wax 52CB column (30 m×0.25 mm i.d.; Varian Inc., Middelburg, The Netherlands). The carrier gas was helium, and the total gas flow rate was 1 ml/min. The initial column temperature was 170 °C, the final temperature 230 °C, and the temperature was increased by steps of 4 °C/min. The injector and detector temperature was 230 °C. Data were processed using Varian Star Workstation v 6.30 (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA).

Phosphorus Analysis and Tocopherol Content

Phosphorus content was determined using the NF T60-227 recommendation [20]. Individual tocopherol content was determined on the basis of the AOCS Official method Ce 8–89 [19]. Tocopherols were analyzed by HPLC using Shimadzu CR8A instruments (Champ sur Marne, France) equipped with a C18-Varian column (25 cm×4 mm; Varian Inc., Middelburg, The Netherlands). Detection was performed using a fluorescence detector (excitation wavelength 290 nm, detection wavelength 330 nm). Eluent used was a 99:1 isooctane/isopropanol (V/V) mixture, flow rate of 1.2 ml/min.

Oxidative Stability of Argan Oils

The oxidative stability was evaluated by the Rancimat method [21]. Stability was expressed as the oxidative

induction period (IP, hours) measured at 110 °C on a Rancimat 743 (Metrohm Co, Basel) apparatus using 3 g of oil sample with an air flow of 20 l/h. Volatile oxidation products were stripped from the oil and dissolved in cold water, whose conductivity increased progressively. The time taken to reach a level of conductivity was measured.

Statistical Analysis

Each reported value is the mean of triplicate samples prepared from each roasting condition. The significance level was set at $P=0.05$. Separation of means was performed by Duncan's test at the 0.05 significance level.

Results and Discussion

Water Analysis

Moisture content is an important food stability parameter. Water activity (A_w) is an even more critical parameter since it depicts the amount of water that can induce microbial spoilage, trigger enzyme activity, or have an impact on food colour, taste and aroma. Results of the water analyses of argan oils prepared from unroasted and roasted argan kernels (Table 1) indicated that roasting time of 15 or 30 min did not induce a significant change in moisture content that remained around 0.1%. However, argan oil prepared from kernels roasted for 45 min presented a significantly low ($P<0.05$) moisture content (0.04%) evidencing that prolonged heating impacted argan oil composition. At 30 °C, water activity of beauty oil was found to be higher than that of edible oil, 0.35 vs. 0.29; respectively. No significant changes were observed in all edible oils as a function of the roasting time. Therefore, water influence on the preservation properties of all oil samples prepared from roasted kernels should be identical.

Table 1 Physical and chemical properties of argan oil prepared from argan kernels either unroasted or roasted at 110 °C for 15, 30, or 45 min

Contents	Roasting time (min)			
	0	15	30	45
Moisture (%)	0.12±0.08 ^a	0.10±0.07 ^a	0.08±0.06 ^a	0.04±0.05 ^a
A_w	0.35±0.03 ^a	0.29±0.01 ^b	0.29±0.01 ^b	0.29±0.04 ^b
Colour (red units)	1.8±0.1 ^a	2.1±0.1 ^a	2.6±0.1 ^b	14.4±0.2 ^c
Colour (yellow units)	8.55±0.9 ^a	6.5±0.8 ^a	9.8±1 ^a	14.3±1.1 ^b
Refractive index	1.4709±0.002 ^a	1.4712±0.002 ^a	1.4713±0.002 ^a	1.4713±0.002 ^a
$\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ (λ 232 nm)	1.1±0.25 ^a	1.23±0.28 ^a	1.45±0.41 ^a	1.36±0.38 ^a
$\epsilon_{1\text{cm}}^{1\%}$ (λ 270 nm)	0.20±0.08 ^a	0.22±0.08 ^a	0.27±0.09 ^a	0.31±0.08 ^a
AV	0.15±0.04 ^a	0.15±0.04 ^a	0.15±0.04 ^a	0.22±0.09 ^b
PV (meq/kg)	0.78±0.08 ^a	1.22±0.09 ^a	1.75±0.12 ^b	3.09±0.18 ^c
B[a]P (ppb)	0.30±0.08 ^a	0.42±0.09 ^a	0.40±0.09 ^a	0.35±0.08 ^a

A_w water activity, AV acid value, PV peroxide value, B[a]P benzo [a]pyrene; ^{a,c} Mean values ± SD of determination for triplicate samples; values in the same line with different letters are significantly different ($P<0.05$)

Interestingly, our A_w analysis indicated for the first time that the traditionally observed lower preservation time of beauty oil compared to edible oil could be the result of a larger amount of water.

Colour Development

With prolonged roasting time, browning substances were developed, resulting in a significant ($P<0.05$) increase of the absorbance at 420 nm. The colour of argan oil changed from golden (absorbance; 0.61) before roasting to copper (absorbance; 0.92) then brown (absorbance; 1.15) after 15 and 30 min of roasting; respectively. After 45 min of roasting argan oil colour was deep-brown (absorbance; 1.39). Changes in red and yellow colour with heating were significantly ($P<0.05$) different (Table 1). Specific extinction at 232 and 270 nm is useful to reflect the oxidative deterioration and purity of argan oil through detection of peroxides (232 nm) and secondary oxidation products (270 nm) [22]. Specific extinctions in argan oil prepared from unroasted kernels were 1.1 and 0.2 at 232 and 270 nm, respectively (Table 1). When argan kernels were roasted to 110 °C, resulting oils did not show any immediate significant variations demonstrating the lack of formation of large quantities of secondary oxidation products. However, our results observed at 232 nm suggest that moderately high amounts of primary oxidation products could be formed during prolonged roasting. Even though those products did not yield to secondary oxidation products, their influence on argan oil preservation could be of importance since they could promote the formation of numerous non-fat oxidative products, rapidly decrease the level in anti-oxidant molecules, and favor the formation of off-flavour [9, 22].

The increase in raw material roasting time or temperature induces the formation of browning substances in edible oils

[23–25]. Those substances result from Maillard-type non-enzymatic reactions, caramelization, and phospholipid degradation. Interestingly, these browning substances possess preservation properties [24, 26] and are partially responsible for the better stability of edible argan oil, compared to beauty oil [9]. Nevertheless, the bitterness of these substances in edible argan oil is such that oil prepared with roasting time longer than 30 min presents a very unpleasant burnt taste [9]. Too long roasting time is possibly also responsible for the formation of primary oxidation products, this evidences the necessity to optimize the roasting period.

Chemical Composition

Oil fatty acid (FA) composition is an essential indicator of its nutritional value. Almost no differences in biologically-relevant FA composition of argan oils prepared with different roasting time were observed (Table 2). Beauty argan oil consisted of 12.9% palmitic, 4.9% stearic, 46.8% oleic, and 33.8% linoleic acids. Argan oil prepared from kernels roasted for 15 min consisted of 12.5% palmitic, 5.1% stearic, 46.7% oleic, and 34.4% linoleic acids. Lack of influence of roasting parameters on FA composition has already been reported for other oils [26, 27] and our results confirm the good stability of argan oil triacylglycerides at 110 °C.

The phosphorus content of argan oils prepared with different roasting times was determined by spectrophotometric measurement of the yellow phosphovanadomolybdic complex that represents the carryover of phospholipids. Significant differences ($P<0.05$) in the phosphorus content of oils prepared with different roasting times were observed. With increased roasting times, phosphorus content significantly increased. Phosphorus content of oils prepared from kernels roasted for 15, 30, and 45 min were

Table 2 Fatty acid (%) and tocopherol (mg/kg oil) composition in argan oils prepared from argan kernels unroasted or roasted at 110 °C for 15, 30, or 45 min

Fatty acid (%)	Roasting time (min)			
	0	15	30	45
C16:0	12.8±0.3 ^a	12.5±0.2 ^a	11.6±0.6 ^a	11.6±0.5 ^a
C18:0	4.9±0.2 ^a	5.1±0.3 ^a	5.2±0.3 ^a	5.2±0.3 ^a
C18:1	46.8±0.5 ^a	46.7±0.7 ^a	47.6±0.7 ^a	47.6±0.6 ^a
C18:2	33.8±0.6 ^a	34.4±0.7 ^a	33.8±0.8 ^a	34.4±0.5 ^a
C18:3	0.2±0.05 ^a	0.2±0.05 ^a	0.1±0.05 ^a	0.1±0.05 ^a
C20:0	0.3±0.05 ^a	0.2±0.05 ^a	0.2±0.05 ^a	0.3±0.05 ^a
C20:1	0.1±0.05 ^a	0.1±0.05 ^a	0.1±0.05 ^a	0.1±0.05 ^a
α-Tocopherol	41.9±8.3 ^a	43.7±11.6 ^a	44.5±6.2 ^a	42.7±9.5 ^a
β-Tocopherol	2.7±1.2 ^a	3±1.3 ^a	3.1±0.8 ^a	3.4±0.8 ^a
γ-Tocopherol	626.5±11.5 ^a	621.3±15.3 ^a	616.9±15.8 ^a	612.6±10.6 ^a
δ-Tocopherol	49.8±7.6 ^a	50.4±3.7 ^a	50.8±6.8 ^a	48.7±8.5 ^a

^a Mean values ± SD of determination for triplicate samples, values in the same line with different letters are significantly different ($P<0.05$)

118, 166, and 172 ppm, respectively, whereas that of oil prepared from unroasted kernels was 24 ppm. Phosphorus content of oil is known to increase with temperature when oilseeds are heated [23, 28, 29]. Our results show that prolonged heating of argan kernels induces similar effects. The content of the individual tocopherols in oils prepared at various roasting times is given in Table 2. Four types of tocopherol (α -, β -, γ -, and δ -) are found in argan oil, γ -tocopherol being by far the major one [11]. Prolonged roasting time did not influence the tocopherol content of argan oils. γ -Tocopherol behavior during heating is quite complex and contradictory reported data have been explained by the possible presence of significant amounts of linked γ -tocopherol whose release could be heat-mediated [30]. At 110 °C, and for up to 45 min, γ -tocopherol level found argan kernels did not undergo any major changes.

Oxidative Stability of Argan Oils

Oxidative stability of argan oils was evaluated using the Rancimat method. Argan oil prepared from unroasted kernels presented an induction time of 18 h, the shortest of all studied samples. Oils prepared from roasted kernels had an induction time between 29 h roasting time of 15 min and 38 h (roasting time of 30 min). Argan oil prepared from kernels roasted for 45 min presented a shorter induction time of 31 h. These data confirmed the preservative properties of the browning components developed during the roasting process. To further evaluate the influence of the roasting process on the oxidative stability, we also determined the peroxide value (PV) of each oil sample immediately after roasting (Table 1). The PV of beauty argan oil was found to be 0.78 meq O₂/kg of oil whereas argan oil prepared from kernels roasted for 45 min had the highest value of 3.09 meq O₂/kg of oil evidencing the development of primary oxidation products during prolonged roasting. Even though we did not further investigate the impact of these products as a function of time, it is very likely that they favor a rapid oil oxidation. B[a]P formation frequently occurs in roasted material [30]. In a previous and preliminary study performed at a roasting temperature of 100 °C, we demonstrated that the roasting of argan kernels did not induce the formation of B[a]P [11]. Nevertheless, we took advantage of this study to re-investigate B[a]P content because of the known toxicity of this compound [31]. Results are listed in Table 2. Again, no significant changes ($P < 0.05$) in B[a]P content as a function of roasting time at 110 °C up to 45 min were observed between unroasted and roasted kernels.

In summary, factors possibly affecting the oxidation of edible seed oils are numerous: free fatty acids, mono- and diacylglycerols, metals, phospholipids, pigments, antioxi-

dants, and thermally oxidized compounds [32]. During our study, the chemical composition and oxidative stability of argan oils prepared from the kernels roasted at 110 °C for different times (15–45 min) were evaluated and compared with that beauty oil. Colour and phosphorus content varied with roasting time while fatty acid and tocopherol compositions remained stable. From our study, a roasting time up to 30 min appears to be optimum to preserve the immediate and long-term nutritive, organoleptic and physico-chemical properties of argan oil. If the roasting time is prolonged to 45 min, argan oil will present a burnt taste, that can eventually be appreciated by some customers, but it will likely present reduced preservation properties, and consequently reduced nutritive interest due to the larger formation of secondary oxidation products and/or off-flavour.

References

1. Charrouf Z, Guillaume D (1999) Ethnoeconomical, ethnomedical and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *J Ethnopharmacol* 67:7–14
2. Caligiani A, Bonzanini F, Palla G, Cirilini M, Bruni R (2010) Characterization of a potential nutraceutical ingredient: Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil unsaponifiable fraction. *Plant Foods Hum Nutr* 65:277–283
3. Guillaume D, Charrouf Z (2011) Argan oil and other argan products; use in cosmetology. *Eur J Lipid Sci Technol*. doi:10.1002/ejlt.201000417
4. Charrouf Z, Guillaume D (2010) Should the amazigh diet (regular and moderate argan-oil consumption) have a beneficial impact on human health? *Crit Rev Food Sci Nutr* 50:473–477
5. El Monfalouti H, Guillaume D, Denhez C, Charrouf Z (2010) Therapeutic potential of argan oil. A review. *J Pharm Pharmacol* 62:1669–1675
6. Damame SV, Chava JK, Kadam SS (1990) Effects of roasting and storage on proteins and oil in peanut kernels. *Plant Foods Hum Nutr* 40:143–148
7. Craft BD, Kosinska A, Amarowicz R, Pegg RB (2010) Antioxidant properties of extracts obtained from raw, dry-roasted, and oil-roasted US peanuts of commercial importance. *Plant Foods Hum Nutr* 65:311–318
8. Harhar H, Gharby S, Guillaume D, Charrouf Z (2010) Effect of argan kernel storage conditions on argan oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol* 112:915–920
9. Mathäus B, Guillaume D, Gharby S, Hadlad A, Harhar H, Charrouf Z (2010) Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chem* 120:426–432
10. Charrouf Z, El Hamchi H, Mallia S, Licita G, Guillaume D (2006) Influence of roasting and seed collection on argan oil odorant composition. *Nat Prod Commun* 1:399–404
11. Hilali M, Charrouf Z, El Aziz Souhli A, Hachimi L, Guillaume D (2005) Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. *J Agric Food Chem* 53:2081–2087
12. Marfil R, Cabrera-Vique C, Gimenez R, Bouzas PR, Martinez O, Sanchez JA (2008) Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil: Influence of the extraction method. *J Agric Food Chem* 56:7279–7284

13. Charrouf Z, Guillaume D (2008) Argan oil, functional food, and the sustainable development of the argan forest. *Nat Prod Commun* 3:283–288
14. Charrouf Z, Guillaume D, Driouch A (2002) The argan tree: An asset for Morocco (in french). *Biofutur* 220:54–57
15. Charrouf Z, Guillaume D (2009) Sustainable development in Northern Africa: The argan forest case. *Sustainability* 1:1012–1022
16. AOAC (1980) Official methods of analysis, 13th edn. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC
17. European Commission Regulation EEC/2568/91 (2003) Regulation 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on relevant methods of analysis and later amendments. Annex II: Determination of acidity value. Annex III: Determination of peroxide index. Annex IX: Spectrophotometric test of UV absorption. *Off J Eur Communities* L248:1–109
18. ISO, Method 15302 (2007) In international methods for animal and vegetable fats and oils -Determination of benzo(a)pyrene-Reverse-phase high performance liquid chromatography method
19. AOCS (1993) In: AOCS (ed) Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society, 5th ed. Champaign, IL (Cc 7–25; Cc 13e–92; Ce 2 66)
20. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (1987) In: Hautfenne A, Paquot C (eds) Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. (7th revised and enlarged edn). Blackwell Scientific, Oxford
21. Gutiérrez-Rosales F (1989) Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes. Comparación entre el método del oxígeno activo (AOM) y el método Rancimat. *Grasas Aceites* 40:1–5
22. Gharby S, Harhar H, Guillaume D, Hadlad A, Mathäus B, Charrouf Z (2011) Oxidative stability of edible argan oil: A two year study. *LWT Food Sci Technol* 44:1–8
23. Kim IH, Kim CJ, You JM, Lee KW, Kim CT, Chung SH, Tae BS (2002) Effect of roasting temperature and time on the chemical composition of rice germ oil. *J Am Oil Chem Soc* 79:413–418
24. Yen GC, Shyu SL (1989) Oxidative stability of sesame oil prepared from sesame seeds with different roasting temperatures. *Food Chem* 31:215–224
25. Yoshida H (1994) Composition and quality characteristic of sesame oil (*Sesame indicum*) oil roasted at different temperature in an electric oven. *J Sci Food Agric* 65:331–336
26. Lee YC, Oh SW, Chang J, Kim IH (2004) Chemical composition and oxidative stability of safflower oil prepared from safflower seed roasted with different temperatures. *Food Chem* 84:1–6
27. Anjum F, Anwar F, Jamil A, Iqbal M (2006) Microwave roasting effects on the physico-chemical composition and oxidative stability of sunflower oil. *J Am Oil Chem Soc* 83:777–784
28. Vekdtsink JW, Muuse BG, Meijer MMT, Cuperus FP, Vand de Sande RLKM, Van Putte KPAM (1999) Heat pretreatment of oilseeds: Effect on oil quality. *Fett - Lipid* 7:244–248
29. Clark PK, Snyder HE (1991) Effect of moisture and temperature on the phosphorus content of crude soybean oil extracted from fine flour. *J Am Oil Chem Soc* 68:814–817
30. Moreau RA, Hicks KB, Powell MJ (1999) Effects of heat pretreatment on the yield and composition of oil extracted from corn fiber. *J Agric Food Chem* 47:2867–2871
31. Powrie WD, Wu CH, Molund VP (1986) Browning reactions systems as sources of mutagens and antimutagens. *Environ Health Perspect* 67:47–54
32. Choe E, Min DB (2004) Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comp Rev Food Sci Food Saf* 5:169–186



Article original

Analyse chimique et sensorielle de l'huile d'argane

Chemical And Sensory Analysis Of Argan Oil

^(1,2)Said GHARBY, ⁽¹⁾Hicham HARHAR, ⁽¹⁾Badr Kartah, ⁽¹⁾Hanae El MONFALOUTI
⁽²⁾Aziza HADDAD et ⁽¹⁾Zoubida CHARROUF

¹. Laboratoire C.P.S.O.B, Faculté des Sciences, Université Mohammed V, (Maroc)

². Laboratoire, Lesieur Cristal, 1, Rue Caporal Corbi20300 Roches Noires - Casablanca (Maroc)

Email : S.gharby@yahoo.fr

RESUME

Pour assurer la qualité de l'huile d'argane, une combinaison de méthodes physico-chimiques et sensorielles est indispensable. L'utilité et l'importance des méthodes retenues par la norme marocaine sont présentées. Pour illustrer cette démonstration nous avons choisi quatre types d'huile d'argane 1) l'huile alimentaire qui est obtenue par pressage mécanique d'amandons torréfiés, 2) l'huile de beauté obtenue par pressage mécanique d'amandons non torréfiés, 3) l'huile artisanale obtenue par pressage manuel d'amandons torréfiés et 4) l'huile artisanale préparée traditionnellement à partir de noix régurgitées par les chèvres. Fraichement préparées, toutes ces huiles peuvent être classées comme des huiles extra vierges selon la norme marocaine (NM 08.05.090). Toutefois, l'huile de presse alimentaire a présenté les meilleurs critères de qualité physico chimique et sensorielle.

Mots Clés: Huile d'argane, Analyse chimique, Sensorielle, Qualité.

ABSTRACT:

To ensure argan oil quality, a combination of physico-chemical and sensory methods is necessary. Utility and importance of these methods in the Moroccan norm for argan oil are presented. Our demonstration is based on four types of argan oil 1) edible argan oil that is prepared from mechanically pressed roasted kernels, 2) beauty oil that is prepared from mechanically pressed non-roasted kernels, 3) artisanally prepared argan oil extracted by manual pressing and 4) artisanally prepared argan oil extracted by manual pressing of goat-digested kernels. Fresh, each kind of oil was classified as « extra virgin » according to the moroccan norm (NM 08.05.090). However, only edible argan oil prepared from mechanically pressed roasted kernels displayed the best physico-chemical and sensorial profile.

Keywords: Argan Oil, Chemical analysis, Sensorial, Quality.



1. Introduction

L'huile d'argane est produite par extraction des amandons contenus dans les fruits de l'arganier [*Argania spinosa* (L.) Skeels], un arbre qui ne pousse de façon endémique qu'au sud du Maroc où il couvre une superficie de 800000 hectares : l'arganeraie. L'extraction des amandons d'arganier peut conduire à trois types d'huile: l'huile alimentaire, l'huile de beauté et l'huile cosmétique. Longtemps préparée de façon artisanale, l'huile alimentaire est maintenant principalement produite par pressage à froid des amandons préalablement torréfiés pour quelques minutes. L'huile de beauté est produite par la même technique mais à partir d'amandons non torréfiés. Enfin, l'huile cosmétique est produite par extraction des amandons non torréfiés à l'aide de solvants. Le procédé d'extraction propre à ces trois types d'huile ainsi que les propriétés pharmacologiques et dermocosmétiques exceptionnelles des huiles qui en résultent ayant déjà été décrits en détail dans la littérature [1-2]. A l'exception de l'huile cosmétique, la production et la consommation de l'huile d'argane a longtemps été réservée au cercle familial.

Depuis le milieu des années 1990 des coopératives de production d'huile d'argane se sont multipliées au Maroc et l'huile d'argane est maintenant commercialisée dans tous les pays développés. Cet essor s'est accompagné de la mise en place de normes certifiant au consommateur la qualité qu'il est en droit d'attendre. A l'image des autres huiles végétales, l'acidification et l'oxydation de l'huile d'argane conduisent à des phénomènes néfastes d'altération qu'il faut combattre depuis la récolte des amandons jusqu'au stockage de l'huile. En conséquence, des critères physico-chimiques parmi lesquels l'acidité, l'indice de peroxyde

et l'extinction spécifique à 270 nm (E270) ont été sélectionnés pour constituer l'ossature de la détermination de la qualité de l'huile d'argane par la norme marocaine (N.M. 08.5.090) [3]. La quantification des composés minoritaires dans l'huile comme les stérols, les polyphénols et les tocophérols est également importante et leur détermination est nécessaire car leur variation peut s'accompagner de modifications nutritionnelles et sanitaires. En effet, certains composés tels les acides gras poly insaturés (acides gras essentiels) ou la vitamine E (tocophérols) sont responsables de l'intérêt nutritionnel de l'huile d'argane. Ils sont cependant très sensibles à l'oxydation. Une huile oxydée présentera donc un intérêt nutritionnel plus faible qu'une huile non oxydée. Des dispositions sur la teneur en métaux sont également à prendre en compte car, même à l'état de traces, ils peuvent catalyser des réactions d'oxydation et donc faciliter la détérioration de l'huile d'argane. Si la caractérisation physico-chimique des huiles est une étape essentielle, elle n'est cependant pas suffisante. En effet, pour satisfaire le consommateur, des critères organoleptiques (goût, odeur, couleur...) sont également à considérer. Cet aspect indispensable à la commercialisation réussie des produits alimentaires est inclus depuis longtemps pour l'évaluation des huiles d'olives. A ce jour, il n'est pourtant pas encore intégré dans la norme marocaine de l'huile d'argane. Le but de cet article est de montrer l'importance de la combinaison de l'analyse physico-chimique et sensorielle d'huile d'argane pour assurer sa qualité. Pour illustrer cette démonstration nous avons choisi quatre types d'huiles d'argane 1) l'huile alimentaire qui est obtenue par pressage mécanique d'amandons torréfiés, 2) l'huile de beauté obtenue par pressage mécanique d'amandons non torréfiés, 3) l'huile artisanale obtenue



par pressage manuel d'amandons torréfiés et 4) l'huile artisanale préparée traditionnellement à partir de noix régurgitées par les chèvres. Ces huiles sont respectivement appelées HAPM, HB, HA et HAC.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel Végétal :

Les huiles d'argane notées (HAPM, HB, HA et HAC) sont obtenues à partir du même lot de fruits d'arganier. Ces derniers ont été récoltés dans la région de Taroudante. Les fruits d'amandes ont été dépulés et concassés pour en retirer les amandons d'arganier qui vont servir à la préparation de l'huile d'argane.

2.2. Méthodes Analytique :

L'acidité libre, exprimé en pourcentage d'acide oléique, l'indice de peroxyde, ont été mesurés selon des méthodes normalisées successivement ISO 660, ISO 3960. Le degré de rancissement a été déterminé par un Rancimat (743 METROHM) selon la norme ISO 6886. Les conditions opératoires ont été les suivantes : une prise d'essai d'huile de 3g, un débit d'air de 20l/h et une température de 110 °C. La détermination de la composition en acide gras totaux des huiles a été réalisée en préparant les esters méthyliques selon la norme internationale ISO 5509. Ces esters ont ensuite été analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) à l'aide d'une chromatographie VARIAN selon la méthode ISO 5508 à détecteur à ionisation de flamme (FID), équipé d'une colonne capillaire (CPWAX) de 30 m de longueur et de 0.25 mm de diamètre intérieur. La température du four est réglée à 200°C, celle de l'injecteur à 220 °C. Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à 1.2 ml/min et le volume de l'injection est de 1 µl.

La fraction stérolique a été déterminée par la chromatographie en phase gazeuse de type VARIAN CP 3800 à détecteur FID équipé d'une colonne capillaire non polaire de marque (VF-5HT), de 30 m de longueur, de 0.25 mm de diamètre intérieur et de 0.1µm de diamètre de film. La température du four est réglée à 270 °C, celle de l'injecteur à 300 °C et celle du détecteur est de 300 °C. Le gaz utilisé est l'hélium avec un débit de 0.5 ml/min, et le volume d'injection est de 1 µL. Les coefficients des extinctions spécifiques dans l'ultraviolet à 232 nm et à 270 nm (K232) et K270) ont été déterminés selon la Méthode NF EN ISO 3656, A l'aide d'un spectrophotomètre de type VARIAN. Les tocophérols sont analysés par HPLC, sur une colonne de silice (25 cm 4 mm), selon la méthode AOCS, officielle méthode CE8-89-1990. L'appareil de marque SHIMADZU est équipé d'un détecteur fluorimétrique (longueur d'onde d'excitation 290 nm – longueur d'onde d'émission 330 nm). L'élution est réalisée avec un mélange (isooctane/isopropanol) (99/1) avec un débit de 1,2 ml/min.

3. Résultats et Discussion

3.1. Le degré d'altération : Acidité :

L'huile d'argane est constituée fondamentalement de triglycérides résultant de l'estérification du glycérol par des acides gras. Au sein des amandons, la teneur et la composition des triglycérides évoluent avec le degré de maturation du fruit. A maturité un équilibre entre les acides gras combinés sous forme de triglycérides et les acides gras libres s'établit. Cet état conduira après extraction à l'acidité naturelle de l'huile. Même si l'acidité est généralement exprimée en acide oléique, elle ne donne aucune information sur la nature réelle des acides gras contenus dans l'huile.



L'huile d'argane renferme naturellement très peu d'acides gras libres. La détermination de l'acidité va donc renseigner sur le degré éventuel d'altération des huiles par hydrolyse des triglycérides en acides gras. Les huiles d'argane sont classées selon leur acidité par la norme marocaine N.M. 08.5.090 [3,4]. Celles possédant une acidité inférieure à 2,5% sont dites huiles d'argane vierges et sont consommables en état ; les autres sont dites lampantes et sont impropres à la consommation humaine.

Parmi les huiles d'argane vierges consommables en état on distingue :

L'huile d'argane vierge extra dont l'acidité est inférieure ou égal à 0.8% ;

L'huile d'argane vierge fine dont l'acidité est comprise entre 0.8 et 1.5% ;

L'huile d'argane vierge courante dont l'acidité est comprise entre 1.5 et 2.5%.

Le tableau-1 permet de comparer l'acidité d'échantillons d'huile d'argane analysés juste après extraction.

Tableau-1 : Acidité, Indice de peroxyde, l'extinction (E232 et E270) et Rancimat en fonction du mode d'extraction.

	HAPM	HB	HA	HAC
Acidité [%]	0.27 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.74 ± 0.02	0.34 ± 0.01
Indice de Peroxyde [MeqO ₂ /kg]	0.5 ± 0.1	0.93 ± 0.03	0.9 ± 0.03	1.48 ± 0.01
E232	1.06 ± 0.02	1.22 ± 0.02	1.24 ± 0.005	1.33 ± 0.02
E270	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.17 ± 0.02
Rancimat [h]	27.5 ± 2	13 ± 0.5	16 ± 2	15 ± 0.5

Toutes les huiles obtenues présentent une acidité inférieure à 0,8% et se classent donc dans la catégorie "Huile d'argane vierge extra".

Il est cependant possible de noter que l'huile produite par le procédé traditionnel présente une acidité initiale beaucoup plus élevée que celle des huiles préparées par pressage. A conditions de stockage identiques, sa durée de conservation sera donc réduite. Les huiles provenant d'amadons issus de fruits de maturité identique, ces résultats illustrent l'influence de la méthode d'extraction sur l'acidité initiale de l'huile et démontrent que la méthode traditionnelle conduit à une hydrolyse supérieure des triglycérides par rapport à la méthode par presse.

3.2. Le degré d'oxydation de l'huile :

Exposées à l'air et à la lumière, toutes les huiles développent, au bout d'un temps plus au moins long, une odeur de rance. Ce rancissement oxydatif est dû à la fixation de l'oxygène de l'air sur les chaînes grasses insaturées par un mécanisme radicalaire et auto-catalytique qui aboutit à la formation d'hydroperoxydes. Ces composés sont instables et évoluent, suivant des mécanismes complexes et encore mal connus, vers des produits à bas poids moléculaire responsables de l'odeur rance. Ce phénomène est accéléré par l'exposition à la lumière, par l'élévation de la température et la présence de catalyseurs métalliques (Fe, Cu, Mn). La vitesse d'oxydation augmente avec le degré d'insaturation des acides gras et elle est également influencée par la position des insaturations au sein de la chaîne grasse.

L'odeur rance dépend non seulement du degré d'oxydation mais aussi de la nature de l'acide gras oxydé (acide oléique, linoléique ou linolénique). Chaque acide conduira à des produits d'oxydation de structure et de quantité différente.



Les huiles, dans des conditions données, résisteront donc plus au moins bien à l'oxydation en fonction de leur teneur en agents pro-oxydants (catalyseurs métalliques) et en anti-oxydants (tocophérols, beta carotène, phospholipides ou polyphénols). Le degré d'oxydation d'une huile peut être déterminé principalement par la mesure de son indice de peroxyde, et par son absorption UV..... [4,5] :

3.3. L'indice de peroxyde :

Le processus de l'oxydation de l'huile s'accélère en présence de la lumière. Il est aussi influencé par l'humidité et la température. Ce processus est initié par l'oxygène de l'air. Des récipients sont pleins à ras bord diminuent donc les risques d'oxydation mais cette pratique est difficilement réalisable commercialement. Pour résoudre le problème de la lumière et de la présence d'oxygène, l'air du récipient de stockage peut être remplacé par de l'azote et des bouteilles brunes conservées dans l'obscurité peuvent être utilisées pendant le stockage pour minimiser l'effet de la lumière. Pour évaluer les premières étapes de l'oxydation on mesure l'indice de peroxyde [5], cet indice est exprimé en milliéquivalents d'oxygène par kg d'huile, il permet l'évaluation la teneur de l'huile en produits d'oxydation primaires (peroxydes). Pour l'huile d'argane vierge, la norme marocaine N.M. 08.5.090 fixe la valeur maximale de cet indice à 15 Méq O₂ /Kg d'huile [3,4]. Les échantillons que nous avons analysé Tableau-1 sont conformes à la norme [3] mais il est possible d'observer des différences en fonction du mode de préparation, l'huile alimentaire par pressage mécanique (HAPM) conduisant à une huile de très faible indice de peroxyde.

2.4. L'absorption spectrophotométrique UV

L'examen spectrométrique d'une huile dans l'ultraviolet fournit des informations complémentaires sur sa qualité. Les hydroperoxydes résultant du premier stade d'oxydation de l'huile peuvent être détectés par leur absorption dans l'UV aux environs de 232 nm. Puis, ces peroxydes évoluent avec le temps et conduisent à la formation de produits divers tels des cétones insaturés et des dicétones qui absorbent dans l'ultraviolet vers 270 nm [5]. Le degré et le stade d'oxydation d'une huile peuvent donc être évalués par des coefficients d'absorption dans l'ultraviolet appelés absorbance spécifique K₂₃₂ et K₂₇₀. En effet, l'extinction spécifique à 232nm et à 270nm d'une huile peut être considérée comme une image de son état d'oxydation. Plus son extinction à 232 nm est forte, plus elle est peroxydée. De même plus l'extinction à 270nm est forte, plus elle est riche en produits d'oxydation secondaires ce qui traduit une faible aptitude à la conservation. La détermination de l'extinction spécifique peut donc venir en complément de la détermination de l'indice de peroxyde ou peut intervenir en amont afin de décider si un dosage précis des peroxydes sera nécessaire. Deux autres bandes d'absorption situées à 266 et à 274 nm, peuvent aussi être utilisées pour distinguer l'absorption due aux produits d'oxydation de celle due aux systèmes conjugués. L'huile d'argane vierge extra doit présenter un coefficient d'extinction à 270 nm inférieur à 0,35. La valeur de l'extinction à 232 nm n'a pas encore été fixée dans la norme marocaine [3,4]. Les résultats obtenus sur nos échantillons (Tableau-1), indiquent que toutes les huiles d'argane étudiées ont des valeurs d'absorbance K₂₇₀ respectant la limite permise par la norme pour la classification en tant que huile d'argane vierge extra.



Selon les échantillons analysés, une faible variation de l'extinction a été observée. Celle-ci peut être attribuée aux pratiques technologiques lors du processus d'extraction et à une exposition excessive des fruits et des huiles extraites à l'air et à la lumière.

Ces trois analyses décrites jusqu'ici (acidité libre, indice de peroxyde et la détermination de l'extinction spécifique à 270 nm) sont rapides et nécessitent un matériel peu onéreux : un spectromètre UV. Il est donc possible de connaître rapidement l'état général de la qualité de l'huile d'argane à analyser. Les normes de qualité en industries agroalimentaires étant rigoureuses, d'autres critères doivent cependant être pris en considération comme la composition en acide gras, la teneur en acide gras trans, la teneur en stérols, en polyphénols et en tocophérols.

3.5. La composition en acides gras:

La fraction lipidique des huiles contient une fraction principale dite saponifiable (triacylglycérides) et une fraction mineure dite insaponifiable (stérols, vitamines liposolubles, caroténoïdes). Les acides gras sont des molécules organiques comprenant une longue chaîne carbonée terminée par un groupement acide carboxylique et chaque huile est caractérisée par une composition spécifique en acides gras qui la différencie des autres huiles. La chaîne carbonée des acides gras peut être dépourvue de toute double liaison carbone-carbone et dans ce cas les acides gras sont dits « saturés ». Elle peut également contenir une ou plusieurs doubles liaisons et on parlera alors respectivement des acides gras monoinsaturés (AGMI) ou polyinsaturés (AGPI).

Il existe 2 grandes familles d'AGPI : la série en n-6 (ou oméga 6) et la série n-3 (ou oméga 3). Dans le cas de l'huile d'argane les triacylglycérides représentent entre 98% et 99% de la masse totale. Quelques rares acides gras libres peuvent être trouvés et témoignent de l'hydrolyse des triacylglycérides[6]. L'huile d'argane est caractérisée par deux acides gras majoritaires : l'acide oléique et l'acide linoléique. Elle contient en faible teneur de l'acide linoléique (moins de 0.4 %)(Figure 1).

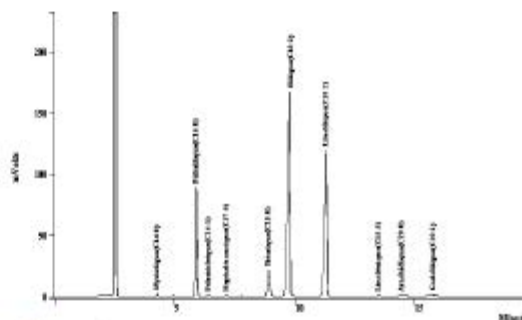


Figure 1 : Chromatogramme des acides gras de l'huile d'argane.

Cette teneur réduite peut servir à détecter une adultération de l'huile d'argane par d'autres huiles riches en acide linoléique comme l'huile de soja ou de colza. Le mélange de l'huile d'argane avec d'autres huiles végétales peut donc se traduire par une modification de la composition en acides gras [7,11]. L'huile d'argane renferme 80% d'acides gras insaturés. Elle est de type oléique linoléique et renferme entre 29 à 35% d'acide linoléique, acide gras dit essentiel car il ne peut pas être synthétisé par l'organisme et doit donc être apporté par l'alimentation [8].



La teneur élevée en acide oléique de l'huile d'argane la rend particulièrement intéressante dans la régulation des taux plasmatiques de cholestérol. Les autres acides gras présents dans l'huile d'argane sont : l'acide palmitique C16:0 (11.5 à 15%) et l'acide stéarique C 18:0 (4.3 à 7.2%). Aucune variation significative des taux d'acides gras n'a été observée pour les différents échantillons étudiés (Tableau-2).

Tableau 2 : Composition acides gras, stérols et tocophérols en fonction du mode d'extraction.

	HAPM	HB	HA	HAC
Acides Gras [%]				
Acide Palmitique	13.4 ± 0.1	13.4 ± 0.1	13.17 ± 0.1	12.6 ± 0.1
Acide Stéarique	5.77 ± 0.1	5.58 ± 0.1	6.45 ± 0.1	5.6 ± 0.1
Acide Oléique	46.5 ± 0.1	46.36 ± 0.1	46.57 ± 0.1	46.7 ± 0.1
Acide linoléique	33.3 ± 0.1	33.25 ± 0.1	32.7 ± 0.1	33.97 ± 0.1
Acide linoléique	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Somme AGS	19.2 ± 0.5	19 ± 0.5	19.6 ± 0.6	18.2 ± 0.5
Somme AGINS	80 ± 1	80.1 ± 1	79.8 ± 1	81.1 ± 1
Stérols [%]				
Schoténol	46.1 ± 0.3	46.6 ± 1.5	44.3 ± 0.7	46.6 ± 0.3
Spinastérol	39.9 ± 0.5	39 ± 0.1	43.2 ± 0.1	39 ± 0.3
Delta-7-Avenastérol	5.5 ± 0.3	4.2 ± 0.4	5.8 ± 0.4	4.2 ± 0.3
Stigma-8-22-diène-3 Beta-ol	4.7 ± 0.4	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.3
Compestérol	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Cholestérol	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1
Tocophérols [mg /Kg]				
Alpha-Tocophérol	59 ± 8	58 ± 7	62 ± 10	70 ± 9
Béta Tocophérol	6 ± 1	4 ± 2	7 ± 2	5 ± 1
Gamma Tocophérol	531 ± 25	589 ± 30	585 ± 25	531 ± 25
Delta-Tocophérol	51 ± 8	56 ± 6	82 ± 12	39 ± 7
Tocophérols Totaux	675 ± 25	683 ± 28	702 ± 25	660 ± 25

Ce résultat montre que la méthode d'extraction ne change pas les pourcentages des acides gras de l'huile d'argane. Le processus d'extraction de l'huile d'argane ne peut donc pas influencer ses qualités diététiques [9].

3.6. Analyse des acides gras trans :

Les acides gras poly-insaturés représentent une fraction importante de l'huile d'argane. Les acides gras insaturés sont généralement de configuration cis, mais certains acides gras peuvent présenter une configuration spatiale trans, notamment dans les produits issus de transformations industrielles. L'isomérisation cis-trans se fait d'autant plus facilement que l'acide gras est insaturé et que le traitement industriel thermique est poussé. Des risques cardiovasculaires sont associés à l'absorption des acides gras trans en grande quantité. La présence importante d'acides gras trans dans des huiles d'argane «vierges», propres à la consommation, serait l'indication certaine de la présence frauduleuse d'huile raffinée. Pour cette raison, la teneur en acides gras trans dans l'huile d'argane a été limitée par la norme marocaine (N.M. 08.5.090) à 0,05 % [4,10]. La composition en acides gras trans des différents échantillons d'huile de notre étude a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse [10]. Le pourcentage de l'acides oléique et linoléique trans (C18:1 et C18:2), dans l'huile d'argane est faible et varie entre 0.01% et 0.03%. Aucune influence du mode d'extraction sur la teneur des acides gras trans n'a été observée et toutes les huiles ont montré une valeur moyenne en acides gras trans inférieure à 0.03% [10].

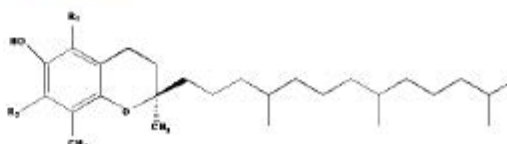
3.7. La composition en stérols :

La fraction stérolique de l'huile d'argane est composée principalement de spinastérol et de schotténol.

[illegible]

Leur proportion au sein des stérols totaux varie respectivement entre 34 et 44%, et de 44 et 49%. Ces biomolécules sont performantes aussi bien dans le domaine de la revitalisation et de la protection antiradicalaire de l'épiderme que dans le relancement de l'activité des cellules [9,10]. Deux stérols minoritaires ont aussi été identifiés sur la base de leur spectre de masse. Il s'agit du stigmast-8,22-diène et du stigmast-7,24-28-diène (ou Δ -7-avénastérol). Leur proportion varie entre 3,2 % et 7% du mélange des stérols totaux. La teneur en campestérol de huile d'argane est très faible (< 0,4%) par rapport aux autres huiles de graine ou à l'huile d'olive. En effet, les huiles de tournesol et de noisette ont une composition en campestérol qui varie entre 4% et 11%. Dans l'huile de soja, la teneur est plus élevée (entre 19% et 23%) [11]. Cette spécificité a été mise à profit pour détecter les mélanges frauduleux avec des huiles alimentaires [11,12]. Par dosage du campestérol, le seuil de détection d'huiles alimentaires ayant un pourcentage de plus de 10 % de campestérol telles les huiles de soja, de colza et de tournesol et frauduleusement ajoutées dans l'huile d'argane est de 1 %. Dans le cas des huiles moins riches en

Les tocophérols sont des antioxydants naturels. Ce sont des molécules à chaînes carbonées liées à une fonction quinone (Figure 3).



	R ₁	R ₂
Alpha-Tocophérol	CH ₃	CH ₃
Bêta-Tocophérol	CH ₃	H
Gamma-Tocophérol	H	CH ₃
Delta -Tocophérol	H	H

Les tocophérols possèdent à la fois un pouvoir vitaminique (vitamine E notamment pour l' α tocophérol) et des propriétés antioxydantes. En plus, ces composés peuvent constituer un critère analytique pour le contrôle de la pureté de l'huile d'argane qui est remarquablement riche en tocophérols [7,9]. La teneur en tocophérols de l'huile d'argane peut aller jusqu'à 900 mg/kg. Elle est deux fois supérieure à celle de l'huile d'olive [4,10]. Les quatre principaux tocophérols (α , β , γ et δ) ont été isolés de l'huile d'argane dont le γ tocophérol est le majoritaire. Cette composition est intéressante à noter car inhabituelle. A titre d'exemple l' α - tocophérol est le tocophérol principal des huiles d'olives, de soja et de



toumesol pour les quelles le γ -tocophérols est le minoritaire [10,13]. Les tocophérols participent à la conservation de l'huile possèdent certaines propriétés thérapeutiques et antioxydantes par leur capacité à piéger les radicaux libres. Des travaux récents ont démontré que le γ -tocophérol a un pouvoir antioxydant supérieur à celui du l' α -tocophérol (vitamine E) dans des tests In vivo [7,10]. L'analyse des tocophérols par la chromatographie en phase liquide, montre une légère variabilité de cette fraction en fonction du mode d'extraction. L'examen du tableau-2 permet de distinguer essentiellement quatre tocophérols. Le plus important est le γ -tocophérols, suivi par l' α -tocophérol et le δ -tocophérols alors que le β -tocophérol n'a été rencontré qu'à l'état des traces dans tous les échantillons étudiés. Toutes les huiles sont caractérisées par l'abondance du γ - tocophérol [13].

3.9. Les poly phénols:

Les polyphénols constituent une famille de molécules organiques largement présentes dans le règne végétal. Ils sont caractérisés, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaire. Les polyphénols prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets bénéfiques sur la santé [14]. En effet, leur rôle d'antioxydants naturels suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement des maladies inflammatoires et cardiovasculaires [15]. Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

La proportion des phénols dans l'huile d'argane est faible mais leur impact sur ses propriétés biologiques est très important. Il s'agit des acides caféique,

du 4-hydroxybenzoïque, du vanillique, du syringique, du ferrulique 4-o-glycosylé, de l'oleuropéine, du 3-hydroxypyridine (3-Pyridinol), du 6-méthyl-3-hydroxypyridine et du catéchol, du résorcinol, du alcool vanillyle, tyrosol, du 4 hydroxy-3-méthoxyphénéthyle, de l'épicatéchine et catéchine. Les concentrations des polyphénols trouvées récemment pour l'huile alimentaire et cosmétique sont de 13.2 et 3.1 mg/kg respectivement, Il semble que la majorité des polyphénols contenus dans les amandons restent dans le tourteau et que la torréfaction ait une grande influence sur leur présence dans l'huile [16].

3.10. Tests de vieillissements accélérés:

Test au Ranci mat est une version automatique du test de swif, qui permet la détermination du temps de résistance d'une huile à l'oxydation par une mesure conductimétrique. Le principe du test consiste à vieillir prématurément les matières grasses par décomposition thermique, sous un bullage intensif d'air [17]. Les acides organiques produits de dégradation de cette oxydation poussée, sont entraînés par un courant d'air et recueillis dans une cellule de mesure remplie d'eau distillée. Le temps d'induction est déterminé par un conductimètre. Ce test est peu représentatif des conditions normales de stockage, il n'a pas une référence pour les huiles; il est préférable de l'utiliser en vue de comparer les stabilités oxydatives des matières grasses entre elles [17]. L'examen par test Rancimat à 110 °C montre que la stabilité oxydative accélérée de l'huile (HB) présente la valeur la plus faible (13 ± 0.5) heures, suivie des huiles obtenues par des méthodes artisanales: les huiles HAC et HA (15 ± 0.5) et (16 ± 2) respectivement. La valeur la plus élevée de stabilité oxydative est enregistrée pour l'huile HAPM (27.5 ± 2) [18,19].



Cela explique l'effet du processus technologique sur la teneur des antioxydants naturels [18,19]. En effet il a été prouvé que les substances phénoliques et d'autres antioxydants naturels protègent l'huile contre le rancissement ce qui est attribuable au mécanisme des radicaux libres. Aussi il a été rapporté que l'huile obtenue par presse mécanique à partir des amandons torréfiés contient un taux sensiblement supérieur des phospholipides qui présentent en synergie avec les tocophérols un effet antioxydant très intéressant bien connu empiriquement depuis de nombreuses années [20,21]. Aussi la formation des composés issus de la réaction de Maillard lors de la torréfaction des amandons. Ces composés sont des antioxydants naturels qui protègent l'huile contre l'oxydation [22], ce qui lui confère une phase dotée d'une grande stabilité pendant le stockage. Les huiles artisanales sont aussi torréfiées mais l'utilisation de l'eau au cours de l'extraction diminue l'effet des antioxydants [18,19].

3.11. Analyse sensorielle:

L'analyse chimique très riche en information est cependant insuffisante pour bien décrire une huile alimentaire. Ainsi, par exemple, du point de vue organoleptique, l'indice de peroxyde ne traduit pas fidèlement le niveau de rancidité d'une huile. Deux huiles ayant le même indice de peroxyde peuvent à l'analyse sensorielle donner des résultats différents ; car la perception sensorielle de l'effet de l'oxydation dépend aussi bien du degré d'oxydation de l'huile que de la nature des produits résultants de celle-ci. Si l'huile d'argane est intéressante d'un point de vue nutritionnel, elle est surtout appréciée pour son goût et ses arômes particuliers.

Une simple analyse chimique ne peut suffire pour déterminer la qualité d'une huile. En effet, les composés volatiles qui se développent au

cours du procédé de fabrication (torréfaction) de l'huile puis pendant son stockage sont capables de modifier l'odeur et la saveur de l'huile. Pour cela une analyse sensorielle détaillée a été développée afin de mettre en évidence les différents attributs "positifs" et les "défauts" de certaines huiles d'argane [23]. Le but d'une dégustation de l'huile d'argane est la recherche et l'évaluation de tous les caractères de finesse, élégance, richesse, équilibre et typicité qui font la différence entre une huile commune et une huile de qualité.

Le score doit être exprimé en centimes pour tenir compte des différences minimales et pourtant significatives dans les nuances organoleptiques des échantillons.

Cette étude a montré que l'huile alimentaire qui est obtenue par pressage mécanique d'amandons torréfiés (HAPM) a présenté les meilleurs critères de qualité sensorielle [19,23].

4. Conclusion :

Avant d'être commercialisé, l'huile d'argane devrait subir trois types d'analyses pour s'assurer de sa qualité à savoir : des analyses chimiques, de pureté et sensorielles. Les analyses chimiques permettent de déclarer si l'huile est "vierge" ou "vierge extra". On doit également déterminer la qualité et l'état d'oxydation de l'huile d'argane par l'indice de peroxyde et l'extinction à E232 et E270. Concernant le critère de pureté, il permet la détection d'un éventuel frelatage, sachant que l'huile d'argane a un profil d'acide gras et une fraction stérolique qui sont différents de ceux des autres huiles végétales. Mais le taux d'acidité d'une huile ne peut être le seul critère pris en compte pour évaluer la qualité



de l'huile, elle doit aussi être irréprochable du point de vue de son goût, son odeur et sa texture et seule une analyse sensorielle par un jury de dégustateurs compétents permet d'apprécier ces critères de manière objective. Si tous nos échantillons étudiés sont de très bonne qualité chimique juste après l'extraction, en terme de stabilité oxydative par rancimat, l'oxydation la plus rapide est observée pour les huiles produites à partir des amandons non torréfiés suivie par les huiles produites par des méthodes traditionnelles (pressage d'amandons provenant de fruits déulpés manuellement ou par les chèvres).

Les huiles obtenues par presse mécanique à partir des amandons torréfiés en respectant les bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication sont les moins sujettes à l'oxydation ; la stabilité de ce type d'huile étant deux fois supérieure à celle des huiles produites à partir des amandons non torréfiés.

Remerciements : Nous remercions Le professeur Mr : **Dominique. Guillaume** pour ses conseils et son intérêt manifesté pendant la rédaction de ce manuscrit.

REFERENCES

- [1] Charrouf, Z.; Guillaume, D. Huile d'argane une production devenue adulte. Les technologies de laboratoire, **2007**, N° 6, 4-7.
- [2] El Monfalouti H.; Guillaume, D.; Denhez C.; Charrouf, Z. Therapeutic potential of Argan oil: J. Pharm. Pharmacol. **2010**, Vol 62, 1669-1675.
- [3] Service de normalisation industrielle (Snima). Huile d'argane. Spécifications. Norme Marocaine NM 08.5.090 Rabat Snima, **2003**.
- [4] Rahmani, M.; Composition Chimique de L'huile d'argane Vierge. Cahier Agricultures. **2005**, Vol. n°5, 461-465.
- [5] Judde, A. Prévention de L'oxydation des Acides Gras Dans Un Produit Cosmétique: Mécanismes, Conséquences, Moyens de mesure, Quels Antioxydants Pour Quelles Applications; OCL, **2004**, Vol. 11N°6 Novembre-Décembre, 415-418.
- [6] H. Harhar, S. Gharby, B. E. Kartah, H. El Monfalouti, Z. Charrouf, D. Guillaume. Long argan fruit drying time is detrimental for argan oil quality. Natural Product Com. **2010** Vol 5, N°11, Pages 1799-1802.
- [7] Khallouki, F. Y.; Younos, C.; Soulimani, R.; Oster, T.; Charrouf, Z.; Spiegelhalter, B.; Bartsch, H.; Owen, R. W. Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. Eur. J. Cancer Prev. **2003**, Vol 12, 67-75.
- [8] N. Vingerling, M. Oseredczuk, L. Du Chaffaut, J. Ireland, M. Ledoux. Fatty acid composition of commercial vegetable oils from the French market analysed using a long highly polar vegetable oils from the French market analysed using a long highly polar column. OCL, Oleagigineux Corps Gras Lipides. **2010**, Vol 17, 185-192.
- [9] Charrouf, Z.; Guillaume, D. Arganoil: Occurrence, composition and impact on human health. Eur. J. Lipid Sci. Technol. **2008**, Vol 110, 632-636.
- [10] Hilali, M.; Charrouf, Z.; El Souhli, A.; Hachimi, L.; Guillaume, D. Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. J. Agric. Food Chem. **2005**, Vol 53, 2081-2087.
- [11] Hilali, M.; Charrouf, Z.; El Souhli, A.; Hachimi, L.; Guillaume, D. Detection of argan oil adulteration using campesterol GC-analysis. J. A. O. C. S. **2007**, Vol 84, 761-764.
- [12] A. Gonzalez, S. Armenta, M. de la Guardia. Adulteration detection of argan oil by inductively plasma optical emission. Food Chem. **2010**, Vol 121, 878-886.
- [13] Cayuela, J. A., Rada, M., Pérez-Camino, M. C., Bemissa, M., Abdelaziz, E., Guinda, A. Characterization of artisanally and semiautomatically extracted argan oils from Morocco. Eur. J. Lipid Sci. Technol., **2008**, Vol 110, 1159-1166.
- [14] Charrouf, Z.; Guillaume, D. Phenols and polyphenols from Argania spinosa. American Journal of Food Technology . **2007**, Vol 2, 679-683.
- [15] Bennani, H., Drissi, A., Giton, F., Kheuang, L., Fiet, J., & Adlouni, A. (2007). Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines.
- [16] L. Rojas, S. Quideau, P. Pardon, Z. Charrouf. Colorimetric evaluation of phenolic content and GC-MS characterization of phenolic composition of alimentary and cosmetic argane oil and press cake. J. Agri. Food Chem. **2005**, Vol 53: 9122-7.
- [17] Mohammed RAHMANI. Methodes d'évaluation de la stabilité oxydative des lipides. Les technologies de laboratoire, **2007**, no 2, 18-21.
- [18] S. Gharby, H. Harhar, D. Guillaume, A. Haddad, B. Matthäus, Z. Charrouf. Oxidative stability of edible argan oil: a two year study. LWT- Food Sci. Technol. **2011**, Vol 44, 1-8.
- [19] B. Matthäus, D. Guillaume, S. Gharby, A. Haddad, H. Harhar, Z. Charrouf. Effect of processing on the quality of edible argan oil. Food Chem. **2010**, Vol 120, 426-432.
- [20] Judde, A.; Villeneuve, P.; Rossignol-Castera, A.; Le Guillou, A. Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. J. Am Oil Chem Soc. **2003**, Vol 80, 1209-1215.
- [21] Koprivnjak, O.; Skevin, D.; Valic, S.; Majetic, V.; Petricevic, S.; Ljubenkov, I. The antioxidant capacity and oxidative stability of virgin olive oil enriched with phospholipids. Food Chem., **2008**, Vol 111, 121-126.
- [22] Machiels, D.; Istasse, L. La réaction de Maillard : importance et applications en chimie des aliments. Ann. Méd. Vét., **2002**, Vol 146, 347-352.
- [23] D. Soracco, S. Milano, M. Lenta, E. Vassallo, P. Sardo, Z. Charrouf. Manuel de dégustation de l'huile d'argane sentinelle Slow Food, Décembre 2009, 17-26.

Long Argan Fruit Drying Time is Detrimental for Argan Oil Quality

Hicham Harhar^a, Saïd Gharby^{a,b}, Badr Eddine Kartah^a, Hanae El Monfalouti^{a,c}, Zoubida Charrouf^{a,*} and Dom Guillaume^{c,*}

^aLaboratoire de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bioorganique, Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, BP 1014- Rabat, Morocco

^bLaboratoire Contrôle Qualité, Lesieur-Cristal, 1 rue caporal Corbi, 20300 Roches Noires, Casablanca, Morocco

^cCNRS-UMR6229-UFR Médecine-Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51100 Reims, France.

dominique.guillaume@univ-reims.fr, zcharrouf@menara.ma

Received: July 28th, 2010; Accepted: XX, 2010

Argan oil is extracted from the kernels of argan fruits that have been sun-dried for either a few days or up to several weeks. The influence of the fruit drying time on the quantity, quality, and preservation of solvent-extracted argan oil was compared with press-extracted argan oil. Quantitatively, the time necessary for efficient fruit peeling and the amount of extracted oil were determined with regard to the fruit drying time (0 to 28 days). Argan oil quality was studied using, as markers, moisture content, specific extinction, acid index, peroxide index, fatty acid composition, and Rancimat oxidative stability. Oil from fresh fruit presents a high moisture content, high acidity and peroxide values, and short shelf life. Ten to fourteen days of sun-drying is optimum to obtain high quality argan oil.

Keywords: *Argania spinosa*, Fruit dehulling, Drying time, Oil quality, Shelf life.

Argan oil is extracted from the kernels contained in the nuts of the argan tree, *Argania spinosa* (L.) Skeels [1], which is endemic to only Morocco [2]. To stop argan forest decline and stimulate its economy, systematic phytochemical analysis of *A. spinosa* was initiated several years ago. The very intensive work that was carried out led to the isolation of numerous secondary metabolites [3-7]. However, the expectation raised and the economic goals set were never achieved. Presently, the phytochemical program has been terminated and the sustainable development of the argan forest is almost entirely based on argan oil, which is used for culinary and cosmetic purposes [8-10]. Edible argan oil is the basis of the "amazigh diet" [11] and is prepared by cold-pressing roasted argan kernels. It possesses hepato- and cardio-protective properties [12], but could be useful to prevent other diseases [13]. Beauty and cosmetic oils are prepared from unroasted kernels by either cold-pressing or solvent extraction, respectively. Solvent-extracted oil has no odor and its reproducible yellow-light color is valued to prepare cosmetics. However, it contains a lower level of natural preservatives, so its shelf life is limited compared with that of press-extracted oil, which can be used for up to

two years [14]. Beauty and cosmetic argan oils have hair and skin protective properties [12].

Argan fruit and kernel quality is an essential factor impacting on argan oil quality. The oil preparative process includes fruit picking, sun-drying, peeling, kernel collection, storage, and oil extraction.

Regarding fruit collection, concerns come from goats that often freely circulate in the argan forest where they eat the fruit peel and then regurgitate the nuts. Collection of argan kernels from goat-regurgitated fruit is tempting in order to eliminate the peeling and sun-drying steps. However, this improper practice leads to oil of poor quality [15]. Therefore, only fruit surrounded with its peel must enter into the oil extraction process. If so, argan oil presents good stability [16,17] and quality [18-22] profiles. Methods detecting adulteration with cheaper oils [23,24] also contribute to ascertain oil quality. Regarding kernel storage, we have already shown that only storage at 4°C is suitable for long-term kernel storage [25]. Sun-drying the fruit and fruit peeling are two steps that should be carefully monitored. Prior fruit drying is necessary for efficient removal of the sticky, latex-rich peel of fresh argan fruit.

Fruit peeling is a time consuming task that gets easier when the peel is dry. Argan fruit retailers dry the fruit by leaving a shallow layer in a sunny place for up to 4 weeks. However, in a subtropical country such as Morocco, a prolonged fruit drying-time (FDT) can result in oil oxidation or deterioration and hence poor quality oil. This is particularly bad for solvent-extracted oil for which optimum kernel quality is necessary. The aim of this research was to correlate precisely 1) fruit depulping efficiency, 2) oil physico-chemical parameters, and 3) optimum FDT.

Mechanical peeling of fresh argan fruit (FDT₀) was impossible because of the high latex content of the peel. Peeling yield still remained poorly reproducible when sun drying was between one and six days (data not shown). However, after one week of sun drying, the color of the peel turned brown and the fruit could be mechanically peeled with a reproducible yield of 71% (Table 1). Prolonged FDT led to an increase in fruit peeling yield. Indeed, after 3 weeks of sun drying, the black peel easily crumbled and the peeling yield reached 88%, a value not significantly different from that obtained after 4 weeks (92%) of sun-drying. Consequently, for efficient peeling, FDT longer than 3 weeks is unnecessary.

Then we investigated argan oil fatty acid composition more closely. Comparison of the level of the four main argan oil fatty acids indicated no significant variations (Table 1), establishing the lack of influence of FDT, over 4 weeks, on the fatty acid distribution.

Though argan nut is hard to break, its hull constitutes a porous shield. Consequently, peel drying also results in kernel drying. Therefore, we investigated the residual moisture content of each kernel sample to compare the peel and kernel drying kinetic and possibly identify pro-oxidative delays. In fresh fruit kernels (FDT₀), the moisture content was 17% (Table 2). After one week of sun-exposure (FDT₁), the kernel moisture content was 4%, a value not significantly different from that of the steady state (2.5%) reached after three weeks.

These results show that dried kernels are obtained faster than dried peel fruit, likely to be as a consequence of the initial smaller amount of moisture contained in the kernels, compared with the fruit peel.

Oil extraction yield can be affected by FDT. As shown in Table 2, similar yields were obtained for all five samples. Reported yields include a correction for the varying moisture content of the samples and are reported on the basis of dry weight. Our results clearly show that prolonged FDT does not quantitatively modify the oil level in argan kernels.

Table 1: Argan fruit peeling yield [%] and fatty acid composition [%] of argan oil as a function of fruit drying time (FDT).

	FDT ₀	FDT ₁	FDT ₂	FDT ₃	FDT ₄
Peeling yield	0 ^a	71 ^b ±3	83 ^b ±4	88 ^b ±4	92 ^b ±5
Palmitic acid	14.8 ^a ±0.5	14.7 ^a ±0.4	14.9 ^a ±0.4	14.9 ^a ±0.6	14.7 ^a ±0.3
Stearic acid	6.3 ^a ±0.3	5.9 ^a ±0.2	5.9 ^a ±0.3	5.8 ^a ±0.3	5.7 ^a ±0.6
Oleic acid	43.1 ^a ±0.9	44.7 ^a ±1.1	45.8 ^a ±0.9	45.5 ^a ±0.8	45.2 ^a ±0.9
Linoleic acid	34.4 ^a ±0.9	32.9 ^a ±0.9	31.7 ^a ±1.2	32.1 ^a ±0.7	32.2 ^a ±1.1

Values are the mean of 3-5 determinations ±S.D. ^aMeans with different superscripts in the same row are statistically different ($p < 0.05$).

Table 2: Physico-chemical parameters of argan oil as a function of fruit drying time (FDT).

	FDT ₀	FDT ₁	FDT ₂	FDT ₃	FDT ₄
Moisture content [%]	17 ^a ±2.5	4 ^a ±1.5	3 ^a ±1.5	2.5 ^a ±1.5	2.5 ^a ±1.5
Oil yield [%]	52 ^a ±2	54 ^a ±2	55 ^a ±2	54.5 ^a ±2	53 ^a ±2
Acid value [mg/g]	1.1 ^a ±0.4	0.3 ^a ±0.1	0.2 ^a ±0.1	0.2 ^a ±0.1	0.2 ^a ±0.1
Peroxide value [Meq/kg]	8.2 ^a ±0.3	2.3 ^b ±0.2	2.5 ^b ±0.1	2.1 ^b ±0.2	2.1 ^b ±0.1
Specific extinction					
K_{232}	2.1 ^a ±0.2	1.3 ^b ±0.2	1.2 ^b ±0.1	1.2 ^b ±0.2	1.3 ^b ±0.2
K_{270}	0.3 ^a ±0.1	0.2 ^a ±0.1	0.2 ^a ±0.1	0.2 ^a ±0.1	0.2 ^a ±0.1
Refractive index	1.470 ^a	1.467 ^a	1.467 ^a	1.468 ^a	1.467 ^a
Induction time [hrs]	7.9 ^a ±0.3	35.9 ^b ±0.8	25.0 ^b ±0.5	21.3 ^b ±0.5	18.7 ^b ±0.4

Values are the mean of 3-5 determinations ±S.D. ^aMeans with different superscripts in the same row are statistically different ($p < 0.05$).

Qualitative impact of FDT was then examined using acid and peroxide value, specific extinction, refractive index, and Rancimat of each sample.

All oil samples except FDT₀ showed an acid value of 0.3 or 0.2. The FDT₀ acid value was 1.1, a value that should be related to the fresh kernels' high moisture content. Indeed, it is very likely that kernel grinding induces the lipid-storage vacuole breaking, followed by triglyceride hydrolysis, possibly lipase-assisted. Consequently, concomitant to fruit drying, kernel drying appears to be an important step in obtaining a low acid value and FDT should be long enough to ascertain sufficient kernel drying. Furthermore, peroxide values corroborated this observation since FDT₀ showed the high peroxide value of 8.2 (Table 2) compared with other samples that displayed much lower and homogeneous values (2.1 to 2.5). Though all samples satisfy the official norm for the peroxide value [28], that observed for FDT₀ is by itself worrisome for the preservation of this oil sample. As for the high acid value, the high peroxide value for FDT₀ is likely to result from oxidative processes occurring swiftly in the presence of high levels of moisture during kernel grinding.

Specific extinction at 232 and 270 nm, and the refractive index were only moderately influenced by

FDT (Table 2). Primary oxidation product marker (K_{232}) values observed for FDT₀ were slightly higher than that observed at longer FDT. However, determination of the hydroperoxide decomposition rate as a function of FDT is difficult to quantify.

Oxidative stability of argan oil samples was found to be highly sensitive to FDT. For sample FDT₀, a very short Rancimat induction time of 7.9 hours was obtained (Table 2). Sample FDT₁ displayed by far the best oxidative stability (induction time of 35.9 hours) that slowly decreased to 18.7 hours for FDT₄. The short induction time observed for FDT₀ can be related to the high peroxide value of this sample. However, the peroxide value of FDT₁₋₄ is quasi-stable whereas the Rancimat induction time decreases regularly. This suggests the involvement of molecules other than peroxides in the oil oxidative process. Water appears to be the most obvious incriminating molecule, but its direct involvement still needs to be demonstrated.

Cumulatively, our results indicate that a FDT of 1.5 to 2 weeks is sufficient to satisfy the needs required for the production of high quality argan oil. Shorter FDT induces poor peeling yields and affords oil with poor physico-chemical and preservation parameters. FDT longer than 2 weeks does not lead to a significant improvement of the fruit peeling easiness, oil quality, and even leads to oil with sub-optimum properties and reduced preservation time.

Experimental

Chemicals: All the reagents were of either analytical or HPLC grade and purchased from Professional Labo (Casablanca, Morocco).

Materials: Argan fruit (80 kg) was collected in Tiout (Province of Taroudant, Morocco) argan forest in June 2007. Fruit was used fresh (sample FDT₀) or dried for one week (sample FDT₁), two weeks (sample FDT₂), three weeks (sample FDT₃), or four (sample FDT₄). During this 4 week period, the lowest temperature was 14°C (night temperature) and the highest 45°C. Wind speed was never above 12m/s for more than 30 min.

Sample preparation: On harvest day, 12 kg (FDT₀) of collected fruit were manually hulled. Then, argan nuts were rapidly broken and all analyses were performed during the harvest day. The remaining fruit (68 kg) was divided into 4 equal batches that were sun dried then sampled after 7, 14, 21, and 28 days affording samples

FDT₁, FDT₂, FDT₃, and FDT₄, respectively. Partially or fully dried fruit was mechanically hulled (SMIR Technotour, Agadir, Morocco). Peeling yield was calculated as: (initial mass of fruit- mass of unpeeled fruit) x100/ initial mass of fruit.

Oil extraction: For each analysis, approx. 600 g of kernels were collected then ground using a blender at high speed for 2 mins. Oil extraction was performed according to the AOCS Official method Am 2-93 [26]. About 20 g of ground kernels were extracted for 8 h using a Soxhlet apparatus and *n*-hexane (100 mL) as extraction solvent. *N*-Hexane was removed *in vacuo*. The obtained oil was stored at 4°C until further investigation.

Analytical methods: Kernel moisture content was determined according to the standard method of the Association of Official Analytical Chemists [27] using 5 g of ground argan kernels that were placed in a forced draft oven, temperature-controlled at $103.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$ until constant weight. The analysis was performed in triplicate.

The oxidative stability of each sample was determined as the induction period (IP, h) recorded by a 743 Rancimat (Metrohm, Switzerland) apparatus using 3 g of oil sample. Samples placed into Rancimat standard tubes were subjected to the normal operation of the test by heating at 110°C with an air flow of 20 L/h.

Acidity, peroxide value, UV light absorption (K_{270} and K_{232}), fatty acid composition, and refractive index were determined and statistically analyzed as previously described [19].

Statistical methods: The reported results are the average value of at least 5 independent measurements. The results are shown as mean values. Standard deviations are indicated as a percentage of the mean value. The differences between the plots in each parameter for different oil samples were analyzed using the analysis of variance, after the homogeneity of variance had been tested (significance level $P=0.05$).

Acknowledgments - We thank M. Chafchaoui (Association Ibn Al-Baytar), the women of the Taitmatine co-operative in Tiout, and Lesieur Cristal. This work was realized in the frame of "Projet Arganier" supported by "Agence de Développement Social, Maroc" and the EEC.

References

- [1] Charrouf Z, Guillaume D, Driouich A. (2002) The argan tree, an asset for Morocco. *Biofutur*, 220, 54-57 (in French).

- [2] Morton JF, Voss GL. (1987) The argan tree (*Argania sideroxylon*, Sapotaceae), a desert source of edible oil. *Economic Botany*, **41**, 221-233.
- [3] Oulad-Ali A, Kirchner V, Lobstein A, Weniger B, Anton R, Guillaume D, Charrouf Z. (1996) Structure elucidation of three triterpene glycosides from the trunk of *Argania spinosa*. *Journal of Natural Products*, **59**, 193-195.
- [4] El Fakhar N, Charrouf Z, Coddeville B, Leroy Y, Michalski JC, Guillaume D. (2007) New triterpenoid saponins from *Argania spinosa*. *Journal of Natural Medicine*, **61**, 375-380.
- [5] Harhar H, Gharby S, Ghanmi M, El Monfalouti H, Guillaume D, Charrouf Z. (2010) Composition of the essential oil of *Argania spinosa* (Sapotaceae) fruit pulp. *Natural Product Communications*, **5**, 935-936.
- [6] Charrouf Z, Guillaume D. (2002) Chemistry of the secondary metabolites of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *Current Topics in Phytochemistry*, **5**, 99-102.
- [7] Charrouf Z, Guillaume D. (2002) Secondary metabolites from *Argania spinosa* (L.) Skeels. *Phytochemistry Reviews*, **1**, 345-354.
- [8] Charrouf Z, Guillaume D. (2008) Argan oil, functional food, and the sustainable development of the argan forest. *Natural Product Communications*, **3**, 283-288.
- [9] Charrouf Z, Guillaume D. (2009) Sustainable development in northern Africa: The argan forest case. *Sustainability*, **1**, 1012-1022.
- [10] Charrouf Z, Harhar H, Gharby S, Guillaume D. (2008) Enhancing the value of argan oil is the best means to sustain the argan grove economy and biodiversity, so far. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, **15**, 269-271.
- [11] Charrouf Z, Guillaume D. (2010) Should the amazigh diet (regular and moderate argan oil consumption) have a beneficial impact on human health. *Critical Review Food Science and Nutrition*, **50**, 473-477.
- [12] Charrouf Z, Guillaume D. (2008) Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 632-636.
- [13] Khallouki FY, Younos C, Soulimani R, Oster T, Charrouf Z, Spiegelhalder B, Bartsch H, Owen RW. (2003) Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European Journal of Cancer Prevention*, **120**, 67-75.
- [14] Gharby S, Harhar H, Guillaume D, Haddad A, Matthäus B, Charrouf Z. (2010) Oxidative stability of edible argan oil: A two-year study. *LWT-Food Science and Technology*, DOI: 10.1016/j.lwt.2010.07.003.
- [15] Charrouf Z, El Hamchi H, Mallia S, Licitra G, Guillaume D. (2006) Influence of roasting and seed collection on argan oil odorant composition. *Natural Product Communications*, **1**, 399-404.
- [16] Yagmur A, Aserin A, Mizrahi Y, Nerd A, Garti N. (2001) Evaluation of argan oil for deep-fat frying. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, **34**, 124-130.
- [17] Khallouki F, Mannina L, Viel S, Owen RW. (2008) Thermal stability and long-chain fatty acid positional distribution on glycerol of argan oil. *Food Chemistry*, **110**, 57-61.
- [18] Rezanka T, Rezankova, H. (1999) Characterization of fatty acids and triacylglycerols in vegetable oils by gas chromatography and statistical analysis. *Analytica Chimica Acta*, **398**, 253-261.
- [19] Hilali M, Charrouf Z, El Azziz Souhli A, Hachimi L, Guillaume D. (2005) Influence of origin and extraction method on argan oil physico-chemical characteristics and composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 2081-2087.
- [20] Cayela JA, Rada M, Pérez-Camino MC, Benaissa M, Elamrani A, Guinda A. (2008) Characterization of artisanally and semiautomatically extracted argan oils from Morocco. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **110**, 1159-1166.
- [21] Marfil R, Cabrera-Vique C, Giménez R, Bouzas PR, Martínez O, Sanchez JA. (2008) Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil: Influence of the extraction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 7279-7284.
- [22] Matthäus B, Guillaume D, Gharby S, Haddad A, Harhar H, Charrouf Z. (2010) Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chemistry*, **120**, 426-432.
- [23] Hilali M, Charrouf Z, El Azziz Souhli A, Hachimi L, Guillaume D. (2007) Detection of argan oil adulteration using campesterol GC-analysis. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **84**, 761-764.
- [24] González A, Amenta S, de la Guardia M. (2010) Adulteration detection of argan oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Food Chemistry*, **121**, 878-886.
- [25] Harhar H, Gharby S, Guillaume D, Charrouf Z. (2010) Effect of argan kernel conditions on argan oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **112**, 915-920.
- [26] American Oil Chemist's Society (1998). In: *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemist's Society*. Firestone D. (Ed.) AOCS Press, Champaign.
- [27] Association of Official Analytical Chemists. (1995). *Official methods of analysis*, 15th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
- [28] Service de normalisation industrielle (Snima): (2003) Corps gras d'origine animale et végétale- Huiles d'argane. Spécifications, Norme Marocaine NM 08.5.090. Snima, Rabat (Morocco).

Composition of the Essential Oil of *Argania spinosa* (Sapotaceae) Fruit Pulp

Hicham Harhar^a, Said Gharby^a, Mohamed Ghanmi^b, Hanae El Monfalouti^{ac}, Dominique Guillaume,^{c*} and Zoubida Charrouf^{d*}

^aLaboratoire de Chimie des Plantes et Synthèse organique et Bioorganique, Faculté des Sciences, Université Mohammed V-Agdal, BP1014, Rabat, Morocco

^bCentre de Recherche Forestière, BP 763. Agdal. Ma-10050 Rabat, Morocco

^cUMR6229, UFR Pharmacie, Laboratoire de Chimie Thérapeutique, 51 rue Cognacq Jay, 51100 Reims, France

zcharrouf@menara.ma, dominique.guillaume@univ-reims.fr

Received: February 11th, 2010; Accepted: XX, 2010

The composition of the essential oil from the fresh and dried pulp of the fruit of *Argania spinosa* (Skeels) L. has been studied. Camphor was the major component in both oil types, but in addition, the fresh fruit oil had significant amounts of 1,8-cineole, endo-borneol, and 2-(4-methylcyclohex-3-enyl)-propan-2-ol, and the dried pulp oil 3,5-dimethyl-4-ethylidene-cyclohex-2-ene-1-one, 1,8-cineole, and 2-methylbutanoic acid. The presence of camphor and 1,8-cineole in argan fruit essential oil suggests that it could be used locally as an insect repellent, offering an output for argan fruit pulp that is at present a waste product.

Keywords: Argan tree, *Argania spinosa*, Sapotaceae, camphor, 1,8-cineole, insect repellent.

Argan oil is prepared from the kernels of the fruit of the argan tree, *Argania spinosa* (Skeels) L. [1], a tree naturally growing exclusively in Morocco. Presently, a program aimed at sustainably developing the argan forest [2] ensures the production of high quality oil in cooperatives that apply stringent preparative rules [1]. One rule is the mandatory use of pulped fruit to ensure the discarding of fruit damaged by feeding goats, the use of which leads to low quality oil [3,4]. Therefore, tons of fresh and dry fruit pulp are generated during the summer, and the rest of the year, respectively. So far, this pulp is simply used to feed cattle. To perpetuate the argan forest, sustainable uses for argan pulp are being investigated.

Of the various chemicals already isolated from argan fruit pulp, only phenolic compounds present a commercial potential [5]. The interest presently devoted to essential oils and their numerous biological effects [6] prompted us to evaluate the essential oil compositions of fresh and dried argan fruit pulp to assess their potential commercial value.

Hydrodistillation, steam distillation, and microwave-assisted methods are frequently used to extract essential oils [7]. We evaluated all three methods with fresh and

Table 1: Yield and composition of *Argania spinosa* fruit pulp essential oil (%).

	KRI	Fresh pulp	Dried pulp
Furan-2-carbaldehyde	83.0	2.2	3.4
2-Methylbutanoic acid	95.6	4.9	6.1
1,8-Cineole	1033	16.0	7.8
Toluene	1042	0.5	1.5
Linalool	1098	1.6	1.7
2-Phenylethanol	1108	0.8	nd
3,5-Dimethyl-4-ethylidene-cyclohex-2-ene-1-one	1131	1.4	12.6
Camphor	1143	35.5	33.9
endo-Borneol	1165	11.8	6.6
2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]			
Heptan-3-one	1173	0.4	nd
1-Isopropyl-4-methylcyclohex-3-en-ol	1185	11.1	3.7
1-Phenylethane-1,2-diol	1238	2.0	1.0
2,4-Decadienal	1294	1.2	1.1
5-Hexyl-dihydrofuran-2(3H)-one	1463	2.4	1.5
2-Pentadecyn-1-ol	1535	0.7	2.1
6-Heptyl-tetrahydro-pyran-2-one	1681	0.9	0.9
Total		97.5	86.2

dried fruit pulp. Hydrodistillation consistently afforded higher essential oil yields (0.08 and 0.06%, for fresh and dried fruit argan pulp, respectively). The use of steam distillation and microwave led to essential oil yields of 0.04% ($\pm 0.01\%$) and 0.02% ($\pm 0.01\%$); respectively. The essential oil composition of each oil type is displayed in Table 1.

Oxygenated terpene derivatives (OTD) are the main constituents of argan fruit pulp essential oils. In dried fruit, OTD constitute 79.5% of the essential oil components and 83% for fresh fruit. Camphor was the main compound in fresh (35.5%) and dried fruit (33.9%) oils. 1,8-Cineole was present in appreciable amount in the fresh fruit oil (16.0%) but, in dry fruit pulp oil, its content was slightly reduced (7.8%), even though it remained one of the major compounds. Endo-borneol and 2-(4-methylcyclohex-3-enyl)-propan-2-ol were found in similar amounts in the fresh fruit pulp oil (11.8 and 11.1%, respectively). Essential oil from dried fruit pulp contained higher amount of oxidation products. Hence, 3,5-dimethyl-4-ethylidene-cyclohex-2-ene-1-one was found as the second major component and derivatives such as furan-2-carbaldehyde and 2-methylbutanoic acid were found in higher percentages than in fresh fruit pulp.

The presence of camphor and 1,8-cineole in appreciable amounts in the pulp of the argan fruit is highly interesting. Indeed, it has been proposed that oils presenting such an association should possess insect repellent or insecticide activity [8]. Fighting insects with affordable and non-toxic compounds is a priority in the argan forest. Therefore, argan fruit pulp essential oil can be proposed to protect family households. Variations in OTD composition between fresh and dried fruit pulp should have little influence for this purpose. Our results provide the cooperatives with a new opportunity to diversify their production and offer a useful product to the local population, as well as adding value to a by-product that is wasted at the moment.

References

- [1] Charrouf Z, Guillaume D, Driouch A. (2002) The argan tree, an asset for Morocco. *Biofutur*, 220, 54-57 (in French).
- [2] Charrouf Z, Guillaume D. (2008) Argan oil, functional food, and the sustainable development of the argan forest. *Natural Product Communications*, 3, 283-288.
- [3] Charrouf Z, El Hamchi H, Mallia S, Licita G, Guillaume D. (2006) Influence of roasting and seed collection on argan oil odorant composition. *Natural Product Communications*, 1, 399-404.
- [4] Matthais B, Guillaume D, Gharby S, Haddad A., Harhar H, Charrouf Z. (2010) Effect of processing on the quality of edible argan oil. *Food Chemistry*, 120, 426-432.
- [5] Charrouf Z, Hilali M, Jauregui O, Soufiaoui M, Guillaume D. (2007) Separation and characterization of phenolic compounds in argan fruit pulp using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectroscopy. *Food Chemistry*, 100, 1398-1401.
- [6] Bakkaki F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- [7] Gómez N E, Witte L. (2001) A simple method to extract essential oils from tissue samples by using microwave radiation. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 2351-2359.
- [8] Djibo A K, Samaté AD, Nacro M. (2004) Composition chimique de l'huile essentielle de *Ocimum americanum* Linn., syn. *O. canum* Sims du Burkina Faso. *Comptes Rendus Chimie*, 7, 1033-1037.
- [9] (a) Adams RP. (1995). Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy (2nd ed.). Carol Stream, IL: Allured; (b) Adams, RP. (2001). Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy (3rd ed.). Carol Stream, IL: Allured.

Experimental

Plant material: Fresh argan fruit pulp was collected in Agadir County in May 2008. Dried fruit pulp was obtained from fruit that was sun-dried for at least 3 weeks.

Hydro-/Steam-distillation/ Microwave-assisted extraction: Fruit pulp (300 g) was cut into 5 mm strips and subjected either to hydrodistillation for 4 h in a Clevenger-type apparatus containing 400 mL of double distilled water, or to steam distillation for 3 h using an indirect steam distillation apparatus with 600 mL of de-ionised water. The essential oil was collected and dried overnight in a desiccator. Essential oil was stored at -18°C until analysis. Microwave-assisted extraction, was performed for 20 min using a microwave oven.

GC/MS: Essential oils were analyzed by GC/MS using a Trace gas chromatograph (GC Ultra-thermo Scientific) coupled to an Agilent HP mass spectrometer. A VB-5 fused silica capillary column (30 m, 0.25 mm, 0.25 mm) was used. GC/MS operating conditions were: injector temperature 200°C; transfer line 220°C; oven temperature, from 50 to 200°C at 3°C/min; carrier gas, He at 1.4 mL/min; split ratio, 1:70. Compounds were identified by comparing their GC retention times and MS with authentic compounds, NIST MS library, and literature [9]. Quantification (expressed as percentage of total peak area of chromatogram) was carried out by peak area normalization measurements.

Acknowledgments – We thank Association Ibn Al-Baytar for its financial support.

Can Fruit-form be a Marker for Argan Oil Production?

Saïd Gharby^{a,b}, Hicham Harhar^a, Badr Eddine Kartah^a, Hanae El Monfalouti^{a,c},
Clément Denhez^c, Miloudi Hilali^a, Dom Guillaume^{c,*} and Zoubida Charrouf^{a,*}^aLaboratoire de Chimie des Plantes et de Synthèse Organique et Bioorganique, Faculté des Sciences,
Université Mohammed V-Agdal, BP 1014- Rabat, Morocco^bEtablissement Autonome de Contrôle et de Coordination des Exportations, Agadir, Morocco^cCNRS-UMR6229, UFR Médecine-Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51100 Reims, France

dominique.guillaume@univ-reims.fr, zoubida.charrouf@menara.ma

Received: May 12th, 2012; Accepted: August 25th, 2012

Deforestation is an important matter for the argan forest whose preservation necessitates planting trees. Macroscopic parameters are urgently needed to identify trees presenting good potential as oil producers. This study demonstrates that argan oil produced from kernels of apiculate fruit is richer in d-tocopherol, whereas oil produced from spherical fruit is richer in linoleic acid, and that produced from fusiform fruit is richer in oleic acid. Therefore, the use of fruit-form as a marker could permit an easy organic production of "naturally enriched" oils.

Keywords: Argan oil, Fruit shape, Tocopherol, Oleic acid rich, Linoleic acid rich, Oxidative stability.

The xerophytic vegetation of south-western Morocco is overwhelmingly dominated by the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] of the family Sapotaceae [1]. Exclusively naturally endemic in Morocco, the argan tree plays a major role in the biodiversity of the argan forest, and economy as well [2]. However, overgrazing, overexploitation, excessive clearance of woodlands, improper tapping, and consecutive droughts are currently dramatically endangering the argan grove [2].

Edible [3] and cosmetic [4] grade argan oils are rising stars in the press-oil kingdom and their commercial success is rapidly modifying the fragile equilibrium of the argan forest [5, 6]. Even though the argan oil preparative process has been improved over the years, it is still basically prepared by crushing argan kernels [2]. The world-wide commercial success encountered by argan oil has triggered a vast government-supported domestication and preservation program of the argan tree in Morocco. This program, principally aimed at managing the argan forest by sustainably developing the production of argan oil, includes a reforestation part. Therefore, markers for selecting the best trees that will perpetuate the argan forest's high productivity status are particularly looked for by foresters, oil producers, and Moroccan government agencies. Tree quality can be expressed in several different terms: kernel oil content, oil composition of major and/or minor components, oil preservation, easiness of kernel-crushing, easiness of stone breaking, or tree resistance to dryness. Because studies linking oil quality and macroscopic tree-characters are scarce and principally focused on horticultural criteria [7-10], tree selection is difficult, so far. Interestingly, due to minor genotypic variations, argan fruit can be apiculate, spherical, oval, or fusiform. The objective of this study was to compare the chemical composition and oxidative stability of argan oils prepared from the kernels of fruit of different shapes to evaluate if the fruit form could be used as a selection marker to identify the most promising trees.

The quantity of oil obtained from argan kernels varied significantly as a function of the fruit form (Table 1). Indeed, whereas kernels from oval fruit delivered argan oil in 42.8% yield, apiculate fruit afforded 58.6% of oil. If this clearly indicates that kernels from

apiculate fruit deliver more oil than any other type of kernels, it must be noted that these results do not mean that kernels from apiculate fruit necessarily contain more oil than the other kernels. Indeed, it cannot be discarded that, due, for example, to kernel brittleness differences, oil extraction from kernels of apiculate fruit occurs in higher yields. Kernels from fusiform or spherical fruit delivered argan oil in similar percentages (53-54%).

Table 1: Parameters for argan oil prepared from fruit of different shape.

	Apiculate	Oval	Fusiform	Spherical
Oil extracted (% kernels)	58.6±2.5	42.8±0.7	54.4±1.3	53.1±1.5
Free acidity (% oleic acid)	0.1±0.01	0.09±0.01	0.15±0.01	0.11±0.01
Peroxide value (meqO ₂ /kg)	1.20±0.2	1.25±0.3	1.78±0.5	1.10±0.3
<i>K</i> ₂₃₂	1.56±0.03	1.52±0.05	1.64±0.01	1.49±0.01
<i>K</i> ₂₇₀	0.20±0.01	0.19±0.02	0.23±0.02	0.17±0.01
Refractive index (20°C)	1.467±0.001	1.471±0.001	1.470±0.001	1.471±0.001

No significant variation was observed in the free acidity of the four oils (Table 1). Free acidity never exceeded the upper limit of 0.8% imposed by the official norm (SNIMA) [11]. Refraction index of each oil sample did not present any significant difference. Peroxide value and UV data are markers to assess the state of the different stages that lead to oil oxidation, then rancidity. All oil samples (Table 1) presented a low peroxide value: between 1.10 and 1.78 meqO₂/kg. Together with extinction coefficient values of 232 and 270 nm (*K*₂₃₂ and *K*₂₇₀, respectively, Table 1), these combined parameters attested that samples from the four forms of fruit presented a similar and satisfactory initial state. Therefore, these results allow discarding the hypothesis of a higher quantitative release of argan oil from the kernels of apiculate fruit consecutively to a higher oxidative (or altered) state. These results also demonstrated that each of the oils had a satisfactory profile in terms of official norm. Therefore any type of tree should be considered as desirable.

Oleic and linoleic acids were the major fatty acids identified in each oil. Palmitic and stearic acids were found in smaller amount.

Linolenic, arachidic, and gadoleic acids were only present as traces. Interestingly, in argan oil from spherical fruit, linoleic acid was found to constitute 35.6% of the total fatty acid content. This value was significantly different from the linoleic acid content of the argan oil from fusiform fruit that was only 29.4%. Also, oleic acid concentration was found to be significantly higher in argan oil from fusiform fruit than spherical fruit (49.1 vs 44.2%, respectively). Therefore, the production of naturally enriched linoleic- or oleic-acid argan oil can be seriously envisioned after tree selection. Interestingly, the (un)saturated fatty acid contents of the four types of oil were not significantly different.

Table 2: Fatty acid composition (%) of argan oil prepared from fruit of different shape.

	Apiculate	Oval	Fusiform	Spherical
Palmitic acid	13.3±0.3	13.7±0.2	13.9±0.5	11.75±0.3
Stearic acid	6.1±0.2	7.1±0.4	5.7±0.3	6.5±0.3
Oleic acid	45.3±0.1	46.5±0.1	49.1±0.5	44.2±0.5
Linoleic acid	33.5±0.4	31.2±0.3	29.4±0.4	35.6±0.1
Linolenic acid	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
Arachidic acid	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.4±0.2
Gadoleic acid	0.3±0.1	0.4±0.3	0.3±0.1	0.3±0.3
Total SFA*	19.4±0.5	20.8±0.5	19.6±0.5	18.25±0.5
Total UFA*	79.5±0.5	78.5±0.5	79.2±0.5	80.6±0.5

* SFA: Saturated fatty acids, UFA: Unsaturated fatty acids.

Table 3 shows the triglyceride composition of the four types of oil. Five triglycerides (LLO, LOO, LOP, POO, and OOO) composed roughly 73% of each oil triglyceride fraction. No significant variations were observed in the triglyceride composition of argan oil prepared from the four shapes of argan fruit.

Table 3: Triglycerides (%) in argan oil prepared from fruits of different shape.

	Apiculate	Oval	Fusiform	Spherical
LLL	5.7±1.1	4.9±0.4	5.5±1.2	4.1±1.4
LLO	12.1±1.5	11.0±1.1	11.6±0.7	10.3±2.2
LLP	5.3±1.3	4.8±1.45	5.4±1.4	5.2±1.9
LOO	15.4±0.3	15.5±0.3	15.3±0.6	14.7±1.0
LOP	13.9±1.3	13.5±0.5	13.9±0.3	15.0±1.8
PPL	1.8±1.5	1.7±1.4	2.0±0.3	2.2±1.0
OOO	15.1±2.0	16.5±1.3	14±2.3	14.1±1.9
POO	18.5±0.3	19.7±0.3	18.2±0.5	19.7±1.0
OPP	4.4±0.2	4.4±0.3	4.5±0.4	5.3±0.6
SOO	4.8±1.0	5.1±0.4	5.4±1.3	5.6±0.3
SOP	2.1±1.1	2.2±0.3	2.9±0.5	3.5±1.8

Sterols found in argan oil are considered to be important nutrients for human health [12]. Results of the sterol analysis are presented as a percentage of the total sterol content Table 4. Campesterol was consistently found in very low concentration, independently of fruit shape. This parameter is essential since low campesterol content is a marker to detect adulteration of argan oil with other common, cheap vegetable oils [13]. Therefore, this method remains perfectly useable, even with argan oil prepared from a single form of fruit.

Table 4: Composition of sterols (%) in argan oil obtained from fruit of different shape.

	Apiculate	Oval	Fusiform	Spherical
Campesterol	0.3±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1
Stigma-8,22-dien-3-ol	3.9±0.4	3.7±0.2	4.7±0.1	4.1±0.1
Spinasterol	42.2±1.5	38.3±0.1	38.2±0.3	35.4±0.4
Schottenol	44.6±0.7	46.4±0.2	42.9±0.3	43.9±0.3
Stigmasta-7,24-dien-3-ol	4.2±0.5	3.8±0.1	3.8±0.0	4.3±0.5
Total sterols (mg/100 g)	178±11	164±10	171±8	169±11

Concerning the four major sterols of argan oil, each analyzed sample contained between 164 and 178 mg of sterol/100 g of oil, with the highest total sterol level observed in the oil from apiculate fruit.

Tocopherols constitute a group of molecules presenting vitamin E and strong antioxidant activities. One specificity of argan oil is its high content of tocopherols, γ -tocopherol being the major one [14].

Table 5 shows the tocopherol content of the four oil samples. Interestingly, γ -tocopherol levels in argan oil from apiculate and oval fruit were much higher than in oil from fusiform and spherical fruit. In oil prepared from apiculate and oval fruit, the γ -tocopherol level was in the range of 675 mg/kg of oil, whereas in oil from fusiform and spherical fruit, levels were 540 mg/kg of oil. Oil prepared from apiculate fruit was also rich in α -tocopherol. Only oil from oval fruit contained a high level of δ -tocopherol. Overall, the oil from apiculate and oval fruit are richer in tocopherols than that from fusiform and spherical fruit. Again this analysis is helpful to produce naturally argan oil enriched in tocopherols.

Table 5: Tocopherols (mg/kg of oil) found in argan oil obtained from different shapes of fruit.

	Apiculate	Oval	Fusiform	Spherical
α -Tocopherol	54.7±2	40.5±1.5	41.3±1.5	39.9±1
β -Tocopherol	-	-	1.08±0.5	1.24±0.5
γ -Tocopherol	677±5	678±2.5	543±2	531±1.5
δ -Tocopherol	40±5	51±5	39±5	38±5
Total	772±10	769.5±5	625.2±7	615±5

Oxidative stability is another important factor to depict oil quality. It can be evaluated from the Rancimat induction time [15]. Under the accelerated conditions and at 110°C, oils from the four fruit shapes showed a high resistance to oxidation and no significant differences were observed between the four oils. All presented an oxidative induction period between 18 and 21±1.5 hours. Hence, the lower tocopherol contents in the oil from spherical or fusiform fruit did not significantly impact on the oxidative stability of the oil.

Prior to this work, only fatty acid and tocopherol composition of argan oil from three types of fruit had been studied [6]. The results of our full analysis clearly show that tree selection based on the fruit shape should permit the natural production of argan oil enriched in tocopherols and/or linoleic acid, and/or oleic acids from apiculate fruit, spherical, or fusiform fruit, respectively. Considering the tremendous potential of argan oil [16], such enriched oils might be of major importance in the highly and permanently competitive edible- and cosmetic-oil fields [17].

Experimental

Vegetal samples: Argan fruit was hand-picked in Taroudant County (south-western Morocco) in August 2008. Fruit was air-dried for 3 weeks, mechanically dehulled (SMIR Technotour, Agadir, Morocco), and nuts were manually opened to afford the kernels.

Chemicals and materials: All reagents were of either analytical or HPLC grade. Iso-octane and iso-propanol, used as the HPLC mobile phase, and cyclohexane used for extinction coefficient determinations, were purchased from Professional Labo (Casablanca, Morocco).

Oil extraction and yield quantification: Twenty g of ground kernels were extracted in a Soxhlet apparatus with 150 mL of boiling *n*-hexane for 8 h. The organic phase was collected, concentrated under vacuum, and dried for 5 min at 105°C. Extraction yield was determined using the official recommendation [18], and the oil was used for the analyses.

Physicochemical parameters: Determination of physicochemical parameters (acidity, peroxide value and UV absorption), was carried out according to the analytical methods described for olive oil by the European Union Commission Regulation [19]. Acidity, given as percentage of oleic acid, was determined by titration of a solution of oil dissolved in EtOH/Et₂O (1:1) with 0.1 M KOH in EtOH. To determine the peroxide value, expressed as meq/kg oil, a mixture of

oil and iso-octane-acetic acid was left to react with a solution of KI in darkness; the free iodine was then titrated with sodium thiosulfate solution. K_{270} and K_{232} extinction coefficients were determined from absorption at λ : 270 and 232 nm, respectively, with a UV spectrophotometer (CARY 100, Varian), using pure cyclohexane as a blank. Refractive index was measured at 20°C (± 0.2 °C) on a NAR-1T refractometer (Atago, Bellevue, WA) according to the AOCs procedure [12].

Fatty acids composition: Oil samples were saponified according to the AOCs standard method Ce 2-66 [20]. Into 5 mL screw top test tubes, 0.60 g of oil and 4 mL of iso-octane were introduced, followed by 0.20 mL of 2N methanolic KOH solution. Tubes were tightened with a screw cap provided with a PTFE joint, then vigorously shaken. The upper layer was separated and methyl esters were extracted with *n*-hexane. Aliquots (1 μ L) were injected into a gas chromatograph (Varian CP-3800, Varian Inc.) equipped with a FID. The column used was a CP-Wax 52CB column (30 m $\times$ 0.25 mm i.d.; Varian Inc., Middelburg, The Netherlands). The carrier gas was helium, and the total gas flow rate was 1 mL/min. The initial column temperature was 170°C, and the final temperature 230°C; the temperature was increased by steps of 4°C/min. The injector and detector temperature was 230°C. Data were processed using Varian Star Workstation v 6.30 (Varian Inc., Walnut Creek, CA).

Tocopherol content: Tocopherols were analyzed as recommended [21] by HPLC using a Shimadzu CR8A instrument (Champ sur Marne, France) equipped with a C18-Varian column (25 cm $\times$ 4 mm; Varian, Middelburg, The Netherlands). Detection was performed using a fluorescence detector (excitation wavelength 290 nm, detection wavelength 330 nm). Eluent used was a 99:1 iso-octane/iso-propanol (v/v) mixture, flow rate: 1.2 mL/min.

Sterol determination: The sterol fraction extracted from argan oil was analyzed using α -cholestanol as internal standard [22]. To 5 g of argan oil, 500 mL of a 0.2% solution of α -cholestanol in chloroform was added. Saponification was performed using 2N ethanolic KOH solution. After 1h of boiling, 100 mL of water was added and extraction of unsaponifiable matter was carried out using 200 mL of Et₂O. The organic solution was collected, evaporated, and 20 mg of unsaponifiable matter was dissolved in 0.5 mL of chloroform then chromatographed on a silica gel plate eluted with a

mixture of *n*-hexane and diethylether (65:35 v/v). Then the plate was sprayed with a solution of 2,7-dichlorofluorescein (0.2% in EtOH), and the band corresponding to sterols carefully removed. The silicagel recovered from the plate was suspended in chloroform and filtered through a paper filter. The solvent was evaporated under N₂ and the sterol composition determined after trimethylsilylation of the crude sterol fraction. Trimethylsilylated derivatives were analyzed by GC using a Varian 3800 instrument equipped with a VF-1ms column (30 m, 0.25 mm i.d.) using helium (flow rate 1.6 mL/min) as carrier gas. Column temperature was isothermal at 270°C; injector and detector temperature was 300°C. Injected quantity was 1 mL for each analysis.

Triglycerides: Triglyceride composition was determined by HPLC analysis using a C18 analytical column (250 x 4.6 mm) packed with silica according to EEC/2568/91 regulation [19]. Triglycerides were identified by comparing, under the same analytical conditions, their retention time to that of standard triglycerides. A mobile phase of dry acetonitrile/acetone (50:50, v/v) was used at the rate of 0.5 mL/min. Detection was performed using a HP10 47A refractometer.

Oil stability: Oil oxidative stability was evaluated by the Rancimat method [15]. Stability was expressed as the oxidative induction period (IP, h) measured at 110°C on a Rancimat 743 (Metrohm Co, Basel) apparatus using 3 g of oil sample with an air flow of 20 L/h. Volatile oxidation products were stripped from the oil and dissolved in cold water, whose conductivity increased progressively. The time taken to reach a level of conductivity was measured

Statistical analysis: Values reported in tables are the means $\pm$ SE of 3-5 replications. The significance level was set at $P = 0.05$. Separation of means was performed by Tukey's test at the 0.05 significance level

Acknowledgments - We thank the Association Ibn Al Baytar for their interest in this work and financial support. This work was realized in the frame of "Projet Arganier" supported by "Agence de Développement Social, Morocco" and the European Economic Community. We are grateful to the women of the Taitmatine cooperative in Tiout for sharing observations on argan oil preparation.

References

- [1] Charrouf Z, Guillaume D, Driouch A. (2002) The argan tree, an asset for Morocco. *Biofutur*, 220, 54-57 (in French).
- [2] Charrouf Z, Guillaume D. (2008) Argan oil, functional food, and the sustainable development of the argan forest. *Natural Product Communications*, 3, 283-288.
- [3] Charrouf Z, Guillaume D. (2010) Should the amazigh diet (regular and moderate argan oil consumption) have a beneficial impact on human health. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 50, 473-477.
- [4] Guillaume D, Charrouf Z. (2011) Argan oil and other argan products; use in dermocosmetology. *European Journal of Lipid Science Technology*, 113, 403-408.
- [5] Lybbert TJ, Aboudrar A, Chaloud D, Magnan N, Nash M. (2011) Booming markets for Moroccan argan oil appear to benefit some rural households while threatening the endemic argan forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108, 13963-13968.
- [6] Charrouf Z, D. Guillaume (2009) Sustainable development in Northern Africa: The argan forest case. *Sustainability*, 1, 1012-1022.
- [7] Belcadi-Haloui R, Zekhnini A, Hatimi A. (2008) Comparative study on fatty acid and tocopherol composition in argan oils extracted from the fruits of different forms. *Acta Botanica Gallica*, 155, 301-305.
- [8] Ait Abd N, El Ayadi F, Msanda F, El Mousadik A. (2011) Evaluation of agromorphological variability of argan tree under different environmental conditions in Morocco: Implication for selection. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 3, 73-82.
- [9] Ait Abd N, El Ayadi F, Msanda F, El Mousadik A. (2010) Genetic variability of argan tree and preselection of candidate plus trees. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38, 293-301.
- [10] Nouaim R, Echani A, Kaaya M, Chaussod R. (2007) Contribution to the domestication of the argan tree for oil production purposes. *Cahiers Agricolures*, 16, 199-204 (in French).
- [11] Service de normalisation industrielle (Snima): (2003) Corps gras d'origine animale et végétale- Huiles d'argane. Spécifications, Norme Marocaine NM 08.5.090. Snima, Rabat (Morocco).
- [12] Khallouki FY, Younos C, Soulimani R, Oster T, Charrouf Z, Spiegelhalter B, Bartsch H, Owen RW. (2003) Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European Journal of Cancer Prevention*, 120, 67-75.

- [13] Hilali M, Charrouf Z, El Aziz Soulhi A, Hachimi L, Guillaume D. (2007) Detection of argan oil adulteration using campesterol GC-analysis. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 84, 761-764.
- [14] Charrouf Z, Guillaume D. (2008) Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. *European Journal of Lipid Science Technology*, 110, 632-636.
- [15] ISO (1989) ISO-6886: Animal and vegetable fats and oils-Determination of oxidative stability (accelerated oxidation test).
- [16] El Monfalouti H, Guillaume D, Denhez C, Charrouf Z. (2010) Therapeutic potential of argan oil-A review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62, 1669-1675.
- [17] Masson L, Camilo C, Gonzalez K, Caceres A, Jorge N, Torija M. (2008) New sources of oilseeds from Latin American native fruits. *Natural Product Communications*, 3, 357-362.
- [18] ISO 659:2009, (2009) Oilseeds- Determination of oil content (Reference method).
- [19] EC/2568/91. (2003) Commission of the European Communities. Regulation 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on relevant methods of analysis. *Official Journal of the European Community*, L-248, 1-109.
- [20] AOCS (1993) In *Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society*, 5th Edition, AOCS (Ed.) Champaign, IL (Cc 7-25; Cc 13e-92; Ce 2-66)
- [21] IUPAC. (1987) International Union of Pure and Applied Chemistry. Determination of tocopherol and tocotrienols in vegetable oils and fats by HPLC: Method 2.432. In *Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives*. Paquot C, Haufenne A, (Eds) Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2432/1-2432/7.
- [22] AOCS (2009) Determination of the composition of the sterol fraction of animal and vegetable oils and fats by TLC and capillary GLC. In *Official methods and recommended practices of the AOCS*, 6th Edition, Firestone D. (Ed.), AOCS, Urbana, IL (Ch 6-91).

Résumé:

L'huile d'argane est traditionnellement utilisée au Maroc en usage externe pour le traitement des affections cutanées et en usage interne pour prévenir les troubles cardiovasculaires. Particulièrement riche en acides gras insaturés, l'huile d'argane est caractérisée également par ses composés mineurs : polyphénols, tocophérols, stérols, du squalène, et alcools triterpéniques. L'objectif de ce travail est de contribuer à la valorisation de l'huile d'argane et de ses co-produits. C'est un travail pluridisciplinaire car il est composé de deux parties : phytochimie et activité pharmacologique.

Pour la partie phytochimique, onze polyphénols des co-produits d'argane ont été identifiés et quantifiés par LC-ESI-MS. Leur activité antioxydante a été évaluée par plusieurs techniques. La composition chimique des composés volatiles de l'huile d'argane a été étudiée en fonction du temps de torréfaction des amandons. Ces arômes, obtenus par microextraction en phase solide (SPME), ont été élucidés et quantifiés par CPG-MS. La deuxième partie de ce travail, a mis en exergue pour la première fois des propriétés photoprotectrices et antioxydantes de l'huile d'argane. En effet, l'effet antioxydant de l'huile d'argane a été confirmé, lors d'une étude clinique, par la mesure sérique de la vitamine E chez des femmes ménopausées après 8 semaines de consommation de 25 ml d'huile d'argane vs huile d'olive. Les résultats sont significatifs chez le groupe consommant de l'huile d'argane. Le dosage de la vitamine E dans le sérum, a été réalisé par HPLC. Les propriétés photoprotectrices de l'huile d'argane ont été mises en évidence in-vitro par l'action des UVC sur un modèle moléculaire de l'ADN : la thymidylyl-(3',5')-thymidine. Les résultats préliminaires sont encourageants. L'huile d'argane, même diluée 9 fois par la paraffine, reste toujours active.

Mots clés : *Argania Spinosa*, ADN, antioxydant, polyphénols, composés volatiles, propriétés pharmacologiques.

Abstract:

Argan oil is traditionally used in Morocco as an ointment to cure some skin pathologies or is ingested to prevent cardiovascular diseases. Its content in unsaturated fatty acids is high as is its content in polyphenols, tocopherols, sterols, squalene and triterpenic alcohols.

The aim of this thesis was to increase the value of argan oil and derivatives. Our work focuses on phytochemistry and pharmacology.

Concerning the phytochemical aspect, 11 polyphenols were identified and quantified by LC-ESI-SM. Their anti-oxidant activity has been evaluated as a function of kernel roasting time. Volatiles obtained by microextraction were also quantified using CPG-SM. In a second section, photoprotective and anti-oxidant properties of argan oil were studied. Blood vitamine E level was determined in post menopausal women after 8 weeks of daily consumption of 25 ml of argan. Olive oil was given as a blank. Photoprotective properties of argan oil were evidenced in vitro using UV-C and Thymidylyl-(3',5') thymidine as DNA model. Preliminary results indicate a good photoprotective activity even when argan oil is diluted (1/10) in paraffin oil.

Keywords: *Argania Spinosa*, DNA, antioxydant, polyphenols, volatils compounds, pharmacological properties.
