

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
LE MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES



FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

## Mémoire

De fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master II

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (S. N.V.)

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Intitulé du thème :

**Evaluation des propriétés biochimiques et biologiques des feuilles  
d'argousier**

Présenté par : Mesboub khaira

Haret Salma

Mémoire soutenue devant l'honorable jury composé de :

Présidente de jury :	Dr. Meziani Samira	MCA	UDL Sidi Bel Abbes
Encadreur	: Dr. Chenni Fatima Zohra	MCA	UDL Sidi Bel Abbes
Examinatrice	: Dr. El Kadi Fatima Zohra	MCB	UDL Sidi Bel Abbes
Examinatrice	: Dr. Draa Amira Ghizlane	MCB	UDL Sidi Bel Abbes

Année universitaire 2020-2021

Session : «Juin »

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## **Remercîments**

*Nous tenons tout d'abord à remercier dieu le tout puissant et miséricordieux pour son guide, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce travail*

*Mes premières profonds remerciements a mon directeur de mémoire Chenni Fatîma Zohra pour son encadrement, son assistance et à l'intérêt qu'elle m'a apporté quant à la réalisation de ce travail qui ne serait pas réalisé sans sa précieuse aide*

*En second lieu, nous remercions tous les membres de jury qui ont accepté de juger ce travail.*

*Nous remercions très sincèrement toutes les personnes qui d'une façon ou d'une autre, ont participé à l'élaboration de ce travail.*

*Nous tenons aussi à remercier de tous nos collègues de la promotion 2020/2021 et nous leur souhaitons beaucoup de réussite.*

## **Dédicace**

*Avec mes sentiments de gratitude les plus profonds, je vous dédie, mes chers parents, ce modeste travail. Je pourrais jamais être à la hauteur de vos sacrifices et patience. Je prie Dieu pour qu'il vous accorde santé et une longue vie.*

*Mes très chères sœurs : Nebia, Souad, Houria et Saïda qui m'ont toujours encouragée,*

*Mon très cher frère : Kada.*

*À mon fiancé Kada et son mère à qui je dois beaucoup de respect je m'incline devant la mémoire de son père qu'il repose en paix.*

*À mes petites chères : Israe, Sondose, Chaïma.*

*À mon binôme : Salma.*

*À Aïcha, Intisar, Nabahet, Salma, Nesrine les amies les plus serviables et les plus proches de moi.*

*Mesboub Kheïra*

## **Dédicace**

*Je dédie ce travail :*

*Les deux personnes les plus chères a mon cœur, mon père et ma mère, qui m'ont soutenue dans mes études, et pour leurs encouragements et leur amour.*

*A mes chères sœurs : Hafida, Fatima, Fatna et Nour el houda.*

*A mes chers frères : Kadiro, Mohamed, Hichem et Seddik.*

*A tous ma familles sans exception du plus grand jusqu'au petit.*

*N'oublions pas mon cher binôme Kheira que j'admire beaucoup.*

*A Nabahet, Intisar, Aicha, Kheira et Nesrine les amies les plus serviables et les plus proches de moi.*

*A tous les étudiants de ma promotion*

**Haret Salma**



## Résumé

Le présent travail est consacré à la caractérisation biochimique des feuilles d'argousier (*Hippophae Rhamnoides L.*) récoltées de la région de Tipaza, est une plante modèle car elle est très riche en composés naturels et constitue une excellente plante doués de plusieurs vertus thérapeutiques. Le travail expérimental consiste à déterminer les métabolites primaires et secondaires et de réaliser les analyses quantitatives et qualitatives des feuilles d'argousier. Pour atteindre notre objectif, nous avons déterminé le taux d'humidités, les teneurs en cendres et en lipides ainsi que les protéines via deux méthodes, Lowry et Bradford. Nos résultats révèlent des teneurs en matières sèches estimées à 94.5% et donc une faible teneur en eau estimées à 5.5%. Le taux des minéraux s'élève à 46.93% alors que la teneur en matière organique des feuilles est estimée à 53.07 %. Les teneurs en matières grasses sont comprises entre 13.56% et 40.8%. Toutefois, le dosage des protéines par les deux méthodes permet d'observer que la concentration de la teneur en protéines obtenu par la méthode de Lowry (645 µg/ml) est légèrement plus élevée que celle trouvée par la méthode de Bradford (549 µg/ml).

Par ailleurs l'extrait des feuilles d'argousier, les capacités de piégeage du peroxyde d'hydrogène sont importante et les tests réalisés in vitro montrent des valeurs comprises entre  $46.5 \pm 0.1$  et  $62.06 \pm 0.5$  µl/mg.

L'évaluation préliminaire de la composition des feuilles d'argousier a révélé la présence de molécules biologiquement actives telles que les phénols, saponines, terpénoïdes, glucosides et les phlobatannins...

Ces résultats témoignent la richesse des feuilles d'argousier en molécules bioactives naturelles et ses fortes capacités antioxydantes d'où la nécessité de les valoriser pour en tirer profit dans les différents secteurs en Algérie.

**Mots clés :** Argousier, hippophae rhamnoides, feuilles, phlobatannins, peroxyde d'hydrogène.

## **Abstract**

The present work is devoted to the biochemical characterization of sea buckthorn leaves (*Hippophae Rhamnoides L.*) harvested from the region of Tipaza, is a model plant because it is very rich in natural compounds and is an excellent plant endowed with several therapeutic virtues. The experimental work consists in determining the primary and secondary metabolites and to carry out the quantitative and qualitative analyses of the sea buckthorn leaves. To achieve our objective, we determined the moisture content, the ash and lipid contents as well as the proteins via two methods, Lowry and Bradford. Our results reveal a dry matter content estimated at 94.5% and a low water content estimated at 5.5%. The mineral content is 46.93% while the organic matter content of the leaves is estimated at 53.07%. However, the determination of protein by both methods allows to observe that the concentration of protein content obtained by the Lowry method (645  $\mu\text{g/ml}$ ) is slightly higher than that found by the Bradford method (549  $\mu\text{g/ml}$ ).

On the other hand, the hydrogen peroxide scavenging capacity of sea buckthorn leaves is important and the tests carried out in vitro show values between  $46.5 \pm 0.1$  and  $62.06 \pm 0.5$   $\mu\text{l/mg}$ .

The preliminary evaluation of the composition of sea buckthorn leaves revealed the presence of biologically active molecules such as phenols, saponins, terpenoids, glucosides and phlobatannins...

These results show the richness of sea buckthorn leaves in natural bioactive molecules and its strong antioxidant capacities, hence the need to develop them to take advantage in different sectors in Algeria.

Key words: Sea buckthorn, *hippophae rhamnoides*, leaves, phlobatannins, hydrogen peroxide.

## المخلص

هذا العمل مخصص للوصف الكيميائي الحيوي لأوراق النبق البحري (*Hippophae Rhamnoides L*) التي تم جمعها من منطقة تيبازة ، وهو نبات نموذجي لأنه غني جدًا بالمركبات الطبيعية ويشكل نباتًا ممتازًا يتمتع بعدة مزايا علاجية. يتكون العمل التجريبي من تحديد الأيضات الأولية والثانوية وإجراء التحليلات الكمية والنوعية لأوراق النبق البحري. لتحقيق هدفنا ، حددنا محتوى الرطوبة ، ومحتوى الرماد والدهون ، والبروتين باستخدام طريقتين ، لوري وبرادفورد. تكشف نتائجنا عن محتويات المادة الجافة المقدر بـ 94.5% وبالتالي محتوى مائي منخفض يقدر بـ 5.5%. بلغ المحتوى المعدني للأوراق 46.93% بينما المحتوى العضوي للأوراق يقدر بـ 53.07%. تتراوح محتويات الدهون بين 13.56% و 40.8% ، ومع ذلك ، فإن تحديد البروتينات بالطريقتين يسمح بملاحظة أن تركيز محتوى البروتين الذي تم الحصول عليه بطريقة Lowry (645 ميكروغرام / مل) أعلى قليلاً من ذلك الموجود بواسطة طريقة برادفورد (549 ميكروغرام / مل). بالإضافة إلى ذلك ، فإن مستخلص أوراق النبق البحري ، وقدرات الاصطياد لبيروكسيد الهيدروجين مهمة ، وتظهر الاختبارات التي أجريت في المختبر قيمًا تتراوح بين  $0.1 \pm 46.5$  و  $0.5 \pm 62.06$  ميكروولتر / مجم. كشف التقييم الأولي لتكوين أوراق النبق البحري عن وجود جزيئات نشطة بيولوجيا مثل الفينولات ، والصابونين ، والترينويدات ، والجلوكوزيدات ، والفلوباتانينات ... تشهد هذه النتائج على ثراء أوراق نبق البحر في الجزيئات الطبيعية النشطة بيولوجيا وقدراتها القوية المضادة للأكسدة ، ومن هنا تأتي الحاجة إلى تعزيزها للاستفادة منها في مختلف القطاعات في الجزائر. الكلمات الأساسية: نبق البحر ، *hippophae rhamnoides* ، الأوراق ، الفلوباتانين ، بيروكسيد الهيدروجين.

## *Liste d'abréviation*

Ppm : Part par millions

PH : (Potentiel Hydrogène) mesure quantitative de l'acidité ou de la basicité de solutions aqueuses ou liquides

HDL : Les lipoprotéines de haute densité (high density lipoprotein)

LDL : Les lipoprotéines de basse densité (low density lipoprotein)

m : Mètre

mm : Millimètre

mg : milligramme

g : gramme

ml : millilitre

ssp : sous espèce

APG : Angiosperm Phylogeny Group

Fe : Fer

Ca : calcium

K : potassium

Mg : magnésium

Na : sodium

Cu : cuivre

Zn : Zinc

Al : Aluminium

CD : cadmium

Cr : Chrome

Mn : Manganèse

Kg : Kilogramme

T/ha : Tonne/ hectare

Li : lithium

UV : ultra-violet

nm : nanomètre

AGPI : Acide gras poly saturé

SLE : Extrait brute des feuilles d'argousier

PRF : Fraction riche en composés phénoliques

E-coli : Escherichia coli

S-typhi : salmonella typhi

S- dysenteriae : Shigella dysenteriae

S-pneumoniae : Streptococcus pneumoniae

S- aureus : Staphylococcus aureus

NaNO<sub>2</sub> : Nitrite de sodium

GSH : Glutathion SH

ERO : Espèces Réactives Oxygénées

SOD : Superoxyde dismutase

µg : Microgramme

°C : Degré Celsius

% : Pourcent

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 01:</b> Taxonomie de l'argousier <i>Hippophaë rhamnoides</i> .....	7
<b>Tableau. 02 :</b> Liste des espèces et sous-espèces du genre <i>Hippophaë</i> .....	8
<b>Tableau. 03:</b> Les composés biologiquement actifs les plus importants de l'argousier et leur principal effet thérapeutique.....	30
<b>Tableau. 04 :</b> Teneur moyenne en éléments dans les fruits de l'argousier.....	37
<b>Tableau. 05:</b> Teneur en acides aminés des fruits de l'argousier.....	38
<b>Tableau. 06 :</b> Teneur moyenne des composés biologiquement actifs sélectionnés dans l'huile d'argousier obtenue à partir des graines et de la pulpe.....	40
<b>Tableau. 07 :</b> réalisation de la courbe d'étalonnage de la BSA à 595 nm.....	51
<b>Tableau 08 :</b> La masse d'huile obtenue dans les trois extractions.....	59
<b>Tableau 09 :</b> Les résultats de screening phytochimique effectués sur les feuilles d'argousier sont mentionnés dans le tableau suivant.....	63

## Liste des figures

<b>Figure.01</b> : La plantation expérimentale d'argousier .....	4
<b>Figure.02</b> : La présence de l'argousier ( <i>Hippophae rhamnoides</i> ) .....	6
<b>Figure.03</b> : Distribution géographique des sous-espèces européennes de l'espèce <i>Hippophae rhamnoides</i> .....	9
<b>Figure.04</b> : Baies d'argousier .....	11
<b>Figure.05</b> : les feuilles d'argousier .....	12
<b>Figure.06</b> : les épines d'argousier .....	13
<b>Figure.07</b> : Argousier ; fleurs femelles et mâles .....	14
<b>Figure.08</b> : Podarok Sadu .....	15
<b>Figure.09</b> : Avgustinka .....	16
<b>Figure.10</b> : Botanicheskaya .....	16
<b>Figure.11</b> : Nivelena .....	17
<b>Figure. 12</b> : structures chimiques des lignanes de l'espèce <i>Hippophae</i> .....	22
<b>Figure. 13</b> : Structure de l'acide mévalonique .....	23
<b>Figure. 14</b> : Exemples de triterpènes identifiés dans l'argousier, .....	24
<b>Figure. 15</b> : Exemples de phytostérols identifiés dans l'argousier .....	25
<b>Figure.16</b> : Exemple d'un caroténoïde identifié dans l'argousier .....	25
<b>Figure.17</b> : Exemples d'alcaloïdes indoliques isolés de l'argousier .....	26
<b>Figure.18</b> : Localisation de station d'échantillonnage .....	44
<b>Figure.19</b> : Les étapes de préparation des feuilles .....	44
<b>Figure.20</b> : Le refroidissement dans le dessiccateur .....	45
<b>Figure.21</b> : l'incinération d'échantillon dans un four à moufle .....	46

<b>Figure.22</b> : L'appareil de soxhlet .....	48
<b>Figure.23</b> : Ballon après le séchage.....	48
<b>Figure.24</b> : Ballon après l'extraction.....	48
<b>Figure. 25</b> : Le liquide obtenu après l'extraction.....	48
<b>Figure. 26</b> : Rota-vapeur.....	48
<b>Figure. 27</b> : Préparation de tampon phosphate.....	49
<b>Figure. 28</b> : Homogénéisation de l'échantillon.....	53
<b>Figure. 29</b> : Lecteur de l'absorbance par spectrophotomètre.....	53
<b>Figure. 30</b> : L'huile obtenue après l'extraction.....	60
<b>Figure. 31</b> : Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines.....	61
<b>Figure. 32</b> : Histogramme illustrant le dosage des protéines selon les deux méthodes : Lowry et Bradford.....	61
<b>Figure. 33</b> : Histogramme illustrant L'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène.....	62

## ***Tableau de matière***

Remerciement	
Dédicace	
Liste d'abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	1
<b>Partie I : Synthèse bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Généralité sur l'argousier (Hippophae rhamnoides)</b>	
I. Présentation de l'argousier (Hippophae rhamnoides).....	3
I.1 Historique sur l'argousier.....	4
I.2 Description.....	5
I.3 Distribution naturelle.....	6
I.4 Gestion de la culture.....	7
I.5 Classification.....	7
I.6 La famille des Elaeagnaceae.....	10
I.7 Composition des différentes parties de l'argousier.....	10
➤ Baies d'argousier.....	10
➤ Feuilles d'argousier.....	11
➤ La pulpe.....	12

➤ Les rameaux .....	13
➤ Les épine.....	13
I.8 L'argousier comme plante de verger non conventionnelle.....	13
I.9 Caractéristiques des variétés d'argousier.....	13
➤ Podarok Sadu.....	15
➤ Avgustinka .....	16
➤ Botanicheskaya.....	16
➤ Nivelena.....	16
➤ Trofimovskay .....	17
➤ Plamiennaya .....	17

## **Chapitre II : Description phytochimique de l'argousier**

II. Molécules issues du métabolisme primaire et secondaire.....	18
II.1. Molécules issues du métabolisme primaire.....	18
II.1.1. Les glucides.....	18
II.1.2. Acides aminés et organiques.....	19
II.1.3. Les lipides.....	20
II.2. Molécules issues du métabolisme secondaire.....	21
II.2.1. Les composés phénoliques.....	21
II.2.1.1. Les acides phénoliques.....	21
II.2.1.2. Les lignanes.....	22
II.2.1.3. Les flavanoïdes.....	22

II.2.1.3.1. Les flavonols.....	22
II.2.1.3.2. Les flavan-3-ols.....	23
II.2.2. Dérivés terpéniques.....	23
II.2.2.1. Triterpènes.....	24
II.2.2.2. Phytostérols.....	24
II.2.2.3. Caroténoïdes.....	25
II.2.3. Alcaloïdes.....	25
II.3. Autres constituants.....	26
II.3.1. Les vitamines.....	26
II.3.2. Les composés volatils.....	27
II.3.3. Les éléments minéraux.....	27

### **Chapitre III : les propriétés de l'argousier**

III.1 L'argousier dans l'industrie cosmétique.....	28
III.1.1 Protection contre les rayons UV.....	28
III.1.2 Rides et sécheresse de la peau.....	28
III.1.3 Maladies dermatologiques.....	29
III.2 L'argousier en pharmacie.....	30
III.2.1 Traitement du diabète.....	31

III.2.2 Remplacement des médicaments antibiotiques.....	32
III.2.3 Traitement des maladies cancéreuses.....	33
III.2.4 Protection des yeux.....	33
III.2.5 Les effets cardioprotecteurs.....	34
III.2.6 Les effets antiathérogènes.....	34
III.2.7 Les effets hépatoprotecteurs.....	34
III.2.8 Les effets immunomodulateurs.....	35
III.2.9 Les activités antioxydante.....	35
➤ Baies d'argousier.....	35
➤ Graine.....	36
➤ Feuille.....	36
III.3 L'argousier dans l'industrie alimentaire.....	37
III.3.1 Jus et boissons.....	37
III.3.2 Confitures et gelées.....	38
III.3.3 Compléments alimentaires et additifs alimentaires.....	39
III.3.4 Produits laitiers.....	40
III.3.5 Boissons alcoolisées.....	41
III.4 Développement et défi des produits de l'argousier à l'avenir.....	41

## **Partie II : Etudes expérimentales**

### **Chapitre I : Matériels et méthodes**

IV.1 L'objectif.....	42
IV.2 Matériels nécessaires.....	42
IV.3 Produits nécessaires.....	43
IV.4 Localisation de station d'échantillonnage.....	43
IV.5 Méthodes.....	44
IV.5.1 Préparation des feuilles.....	44
IV.5.2 Déterminations du pourcentage d'humidité.....	45
IV.5.3 Détermination de la teneur en cendres.....	45
IV.5.4 Détermination de la teneur en lipides.....	46
IV.5.5 Les analyses quantitatives et qualitatives de l'extrait des feuilles d'argousier.....	49
IV.5.5.1 Les analyses quantitatives.....	49
IV.5.5.1.1 Estimation des protéines foliaires (méthode de Lowry).....	49
IV.5.5.1.2 Dosage des protéines totales (méthode de Bradford).....	50
IV.5.5.1.3 Test de piégeage du radical peroxyde d'hydrogène.....	53
IV.5.5.2 Les analyses qualitatives.....	54
IV.5.5.2.1 Screening phytochimique.....	54

I.4.5.2.1.1 Caractérisation des métabolites secondaires.....	54
➤ Evaluation des phénols.....	54
➤ Evaluation des flavonoïdes.....	54
➤ Evaluation des coumarines.....	54
➤ Evaluation des saponines.....	54
➤ Evaluation des tannins.....	55
➤ Evaluation des terpénoïdes.....	55
➤ Evaluation d’anthraquinone.....	55
➤ Evaluation d’anthocyanine et de la bétacyanine.....	55
➤ Evaluation des glycosides cardiaques.....	55
➤ Evaluation phlobatannins.....	56

## **Chapitre II : Résultats et discussion**

V.1 Déterminations du pourcentage d’humidité.....	57
V.2 Détermination de la teneur en cendres.....	57
V.3 Détermination de la teneur en lipides.....	58
V.4 Les analyses quantitatives et qualitatives des feuilles d’argousier.....	60
V.4.1 Les analyses quantitatives.....	60
V.4.1.1 Détermination de la teneur en protéines (méthodes de Bradford et lowry).....	60
V.4.1.2 Test de piégeage du radical peroxyde d’hydrogène.....	62
V.4.2 Analyse qualitative.....	63
➤ Screening phytochimique.....	63
V.5 Discussion.....	66

Conclusion.....70

Références bibliographique



# **Introduction Générale**

### Introduction Générale

Les plantes, un élément vital de la diversité biologique, servent essentiellement au bien de l'être humain, elles ont un rôle important dans la culture et un fort potentiel économique pour l'alimentation, l'énergie, l'habillement et dans la construction des logements (Mpondo *et al.*, 2012). Un autre rôle très important, découvert depuis longtemps par nos ancêtres, l'usage des plantes dans la médecine traditionnelle. Plus de 3000 plantes sont qualifiées de plantes médicinales pour leur pouvoir de guérison et leur potentiel thérapeutique, elles peuvent être utilisées entièrement ou en partie (feuille, écorce, bourgeons ...).

Dans la phytothérapie, les extraits de plantes médicinales sont employés car ils contiennent des mélanges de métabolites secondaires, il existe plusieurs types des extraits, selon le solvant employé et la partie du végétal (feuilles, écorce, ...), influençant le type de métabolites extraits. Les métabolites secondaires des plantes ont été trouvés impliqués dans plusieurs activités biologiques, notamment antioxydante et anti- inflammatoire (Yi *et al.*, 2007).

Dans la visualisation de cet intérêt est une meilleure exploitation des substances naturelles issues de matrice complexes, la mise en œuvre des méthodologies innovantes en matière d'extraction, de fractionnement et d'identification de produits naturels d'origine végétale, en utilisant l'argousier (*Hippophaë rhamnoides* L.) comme plante modèle, s'avère d'un grand intérêt.

Dans ce contexte, l'objectif principal de notre étude est de caractériser l'argousier à partir des feuilles récoltées de la région de Tipaza (Hadjout). Il s'agit d'une étude des propriétés physiques et chimiques des feuilles d'argousier, en ciblant les métabolites primaires et secondaires dont le but d'évaluer la valeur nutritionnelle des feuilles de l'argousier souvent méconnue en Algérie.

Le travail est subdivisé en deux parties : Dans une première partie nous présentons la synthèse bibliographique, rappelant des généralités sur l'argousier (*Hippophae rhamnoides* L.), une description phytochimiques et les propriétés de la plante. La seconde partie porte essentiellement sur la méthodologie du travail réalisé sur les feuilles d'argousier, et un deuxième chapitre présent les principaux résultats

obtenus suivis par une discussion. Enfin, une conclusion générale suivie par des perspectives achèvent ce travail.

# **Partie I**

## **Revue bibliographique**

# **Chapitre I**

## **Généralités sur l'argousier**

## I. Présentation de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*)

L'argousier (*Hippophae rhamnoides*) est un arbuste rustique, à feuilles caduques, aux baies jaunes ou orange (Figure.01) (Bailey et Bailey, 1978), qui est utilisé depuis des siècles en Europe et en Asie. Dans la Grèce antique, les feuilles de l'argousier ajoutées au fourrage des chevaux étaient réputées pour faire gagner du poids et rendre le poil brillant, d'où le nom latin "Hippophae" qui signifie "cheval brillant" (Lu, 1992). L'argousier est une plante naïve largement répandue dans le monde entier l'argousier est cultivé dans les zones tempérées entre 27° et 69° de latitude nord et 7° et 122° de longitude ouest (Rousi, 1971), notamment en Chine, en Mongolie, en Russie, en Grande-Bretagne, en France, au Danemark, aux Pays-Bas, en Allemagne, en Pologne, en Finlande, en Suède et en Norvège (Wahlberg et Jeppsson, 1990). Au cours de la dernière décennie, il a attiré une attention considérable de la part des chercheurs du monde entier, et récemment en Amérique du Nord, principalement pour sa valeur nutritionnelle et médicale.

L'argousier peut être cultivé, mais ne parvient pas à donner des fruits, à une altitude de 3900 m (Rousi, 1971). En Russie, de grandes populations indigènes poussent à des altitudes de 1200 à 2000 m au-dessus du niveau de la mer (Eliseev et Fefelov, 1977). Il peut supporter des températures de -43 à 40 °C (Lu, 1992). L'argousier est considéré comme résistant à la sécheresse (Heinze et Fiedler, 1981); cependant, la plupart des populations naturelles poussent dans des régions recevant de 400 à 600 mm de précipitations annuelles. Myakushko et al. (1986) ont recommandé que l'argousier ne soit pas cultivé sur des sols secs, et Lu (1992) a noté le besoin d'irrigation dans les régions recevant moins de 400 mm de précipitations par année. Certaines espèces ou sous-espèces d'argousier peuvent supporter l'inondation mais ne peuvent pas être cultivées sur des sols lourds et gorgés d'eau (Myakushko et al., 1986), bien qu'elles absorbent rapidement l'eau (Heinze et Fiedler, 1981). L'argousier développe rapidement un système racinaire étendu et est donc une plante idéale pour prévenir l'érosion des sols (Cireasa, 1986). Elle a également été utilisée pour la mise en valeur des terres (Kluczynski, 1979) pour sa capacité à fixer l'azote et à ± conserver d'autres éléments nutritifs essentiels (Andreeva et al., 1982).

L'argousier a été importé au Canada en provenance de Russie à la station de recherche de Morden, Agriculture et Agroalimentaire Canada, Morden, Manitoba, en 1938 (Davidson et al., 1994). Les plantations étaient limitées aux paysages ornementaux, sauf dans les provinces

de la Saskatchewan et du Manitoba. Le Centre des brise-vent de l'administration du rétablissement agricole des Prairies (ARAP) d'Agriculture et Agroalimentaire Canada (Indian Head, Saskatchewan) cultive l'argousier depuis 30 ans. C'est l'une des plantes ligneuses les plus rustiques et les plus adaptables utilisées dans les programmes de conservation des prairies (Schroeder, 1988). Plus d'un million de semis ont été distribués et plus de 250 000 plantes matures produisant des fruits poussent dans les prairies pour l'amélioration de l'habitat faunique, la protection des fermes, le contrôle de l'érosion et la récupération des terres marginales (Schroeder, 1990).



**Figure.01** : La plantation expérimentale d'argousier (Pilate, 2014).

### **I.1 Historique sur l'argousier**

Le mot hippophae est dérivé du mot latin "hippo", qui signifie "cheval", et "phaos", qui signifie "briller". En Grèce, les feuilles et les rameaux de l'hippophae étaient utilisés pour nourrir les animaux, ce qui a donné lieu à une histoire d'utilisation dans le traitement de nombreuses conditions médicales. Beaucoup de ses effets pharmacologiques ont été enregistrés dans des classiques tels que Sibū Yidīan de la dynastie Tang et Jing Zhu Ben Cao de la dynastie Qing. Les références à l'utilisation médicinale de l'argousier ont été trouvées dans les anciens textes médicaux tibétains, y compris "le Rgyud Bzi" ( les quatre livres de la pharmacopée) daté de l'époque de la dynastie Tang (618-907AD) (Rousi, 1971).

Depuis des siècles, les populations d'Asie centrale et du sud-est utilisent l'argousier comme agent de la médecine traditionnelle pour prévenir diverses affections. Il a été considéré comme l'une des plus importantes bio-ressources de valeur, étant utilisé localement pendant des siècles comme combustible, fourrage, petit bois, nourriture et médecine. Chaque partie de la plante, comme le fruit, la feuille, le rameau, la racine et l'écorce, a été traditionnellement utilisée comme médicament, supplément nutritionnel, bois de chauffage et clôture. Les baies de l'argousier ont été utilisées comme source de médicaments à base de plantes, d'aliments de santé et de soins naturels de la peau en Europe et en Asie. Dans les médecines traditionnelles tibétaine et mongole, les baies de l'argousier étaient utilisées dans le traitement de l'expectoration et de la toux, et pour améliorer la circulation sanguine et la fonction du système digestif et des maladies de la peau, de la jalousie, de l'asthme, pour le traitement gastro-intestinal, comme laxatif et pour le traitement des rhumatismes. Les populations locales utilisaient les baies l'argousier pour le traitement de l'hypertension, du système digestif et des maladies de la peau (Li et wang, 1998). L'huile extraite des baies est utilisée pour le traitement de la gastrite, des ulcères d'estomac, de l'érosion de l'utérus et de l'inflammation des organes génitaux. En Allemagne, l'utilisation du l'argousier a commencé il y a longtemps, pour la réhabilitation écologique des terres dégradées, en particulier pour le reboisement des décharges industrielles et des décharges des mines de charbon et le contrôle de l'érosion du sol (Singh et Moersel, 2005).

## **I.2 Description**

L'argousier est un arbuste à feuilles caduques, dioïque, généralement épineux, atteignant 2 à 4 m de hauteur. Il a une écorce rugueuse brune ou noire et une couronne épaisse verte grisâtre. Les feuilles sont alternes, narinaires et lancéolées avec une couleur gris argenté sur la face supérieure (Synge, 1974). Cette espèce calcicole tolère les basses températures, le pH élevé du sol 8 et les embruns salés (Bond, 1983). Le système racinaire étendu de la plante est capable de retenir le sol sur les pentes fragiles. L'argousier peut être planté dans des sols marginaux grâce à son association symbiotique avec des actinomycètes fixateurs d'azote (Akkermans et *al.*, 1983). Les racines de l'argousier sont également capables de transformer les matières organiques et minérales insolubles du sol en des matières plus solubles (Lu, 1992). La plante se propage rapidement par les racines des rhizomes et colonise rapidement les zones adjacentes.

Le sexe des semis ne peut être déterminé avant qu'ils ne commencent à fleurir (Synge, 1974). Les bourgeons floraux se forment principalement sur du bois de trois ans, différencié au cours

de la saison de croissance précédente (Bernath et Foldesi, 1992). L'inflorescence est composée de quatre à six fleurs apétales. Le pollen est libéré en grande quantité lorsque la température de l'air atteint 6 à 10 °C. L'inflorescence fémorale est généralement constituée d'une seule fleur apétale avec un ovaire et un ovule. La plante dépend entièrement du vent pour la pollinisation : ni les fleurs mâles ni les fleurs femelles ne possèdent de nectaires et n'attirent pas les insectes.

### I.3 Distribution naturelle

L'argousier est originaire d'Europe et d'Asie (Figure 02). La superficie totale de l'argousier en Chine, en Mongolie et en Russie est d'environ 810 000 ha de peuplements naturels et 300 000 à 500 000 ha de peuplements plantés (Sun, 1995). Les peuplements naturels d'argousier sont également répandus en Europe sur les berges des rivières et les dunes côtières le long de la côte baltique de la Finlande, du Portugal et de l'Allemagne (Rousi, 1971) et sur la côte ouest et le long du golfe de Botnie en Suède. En Asie, l'argousier est largement répandu dans les régions himalayennes, notamment en Inde, au Népal et au Bhoutan, ainsi que dans le nord du Pakistan et de l'Afghanistan (Lu, 1992).



**Figure.02 :** La présence de l'argousier (*Hippophae rhamnoides*) en Eurasie Source (Li et Beveridge, 2003).

#### I.4 Gestion de la culture

L'argousier est normalement transplanté ou semé directement au printemps. Sa croissance est optimale dans un sol profond, bien drainé, de type loam sableux et riche en matières organiques (Wolf et Wegert, 1993). Dans les zones arides ou semi-arides, l'eau doit être fournie pour l'établissement.

Les informations dans la littérature concernant la culture de l'argousier sont limitées. En Saskatchewan, au Canada, les semis plantés dans des brise-vent sont souvent stressés par le manque de gestion appropriée. Pour la production commerciale dans des plantations de type verger, la gestion culturelle est clairement importante. De bonnes conditions de croissance produisent un rendement plus élevé et des fruits de bonne qualité (Walhberg et Jeppsson, 1990). La gestion des cultures d'argousier devrait inclure la fertilisation et des pratiques culturales telles que l'espacement, la taille, l'irrigation et le contrôle des mauvaises herbes.

#### I.5 Classification

**Tableau.01:** Taxonomie de l'argousier *Hippophaë rhamnoides*.

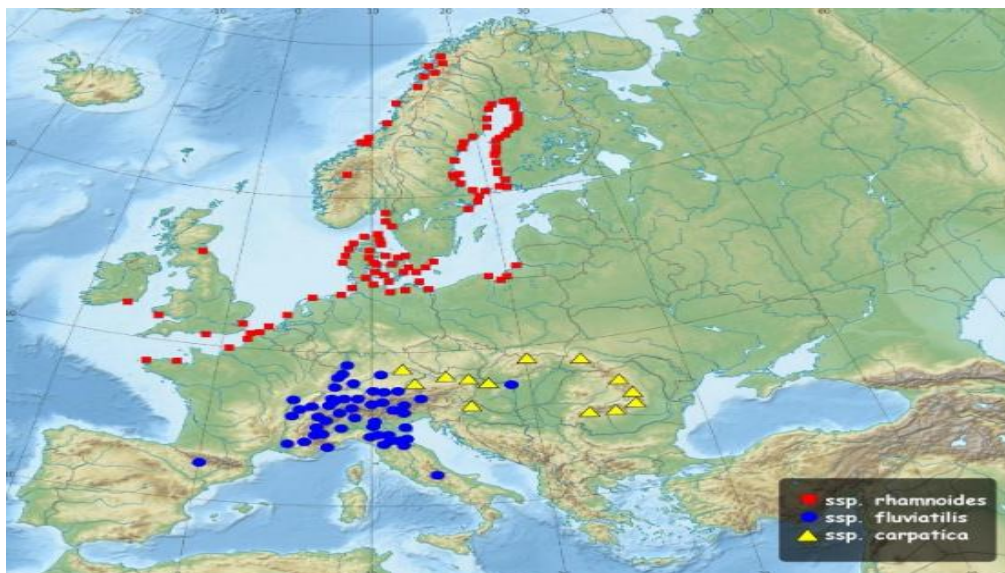
<b>Règne végétale</b>	
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Rosidae (Rosides)
Ordre	Rosales
Famille	Elaeagnaceae
Genre	Hippophaë
Espèce	Hippophaë rhamnoides L.

Le genre *Hippophaë* (Elaeagnaceae), comprend sept espèces parmi lesquelles *H. rhamnoides* est la plus importante avec une subdivision en huit sous-espèces (Bartish et *al.*, 2002) (Tableau 02). Il existe aussi de nombreux cultivars puisque la plante est maintenant largement cultivée. Son aire de répartition s'étend entre 27° et 69° de latitude Nord et entre 7° de longitude Ouest et 122° de longitude Est. Cependant, parmi les sept espèces seule *H. rhamnoides* s'étend pleinement sur le plateau eurasiatique couvrant la Chine, la Mongolie, la Russie, le Kazakhstan, la Turquie, la Roumanie, la Suisse, la France, la Grande-Bretagne, la Norvège, la Suède et la Finlande. Les autres espèces se retrouvent principalement en Chine et dans les pays juxtaposant la chaîne de l'Himalaya (Rousi, 1971).

**Tableau. 02 :** Liste des espèces et sous-espèces du genre *Hippophaë* adaptée selon Bartish et *al.*, 2002.

Espèces	Sous espèces
<i>Hippophaë goniocarpa</i>	
<i>Hippophaë gyantsensis</i>	
<i>Hippophaë neurocarpa</i>	ssp. <i>Neurocarpa</i> ssp. <i>Stellatopilosa</i>
<i>Hippophaë litangensis</i>	

Hippophaë rhamnoides	ssp. Carpatica ssp. Fluviatilis ssp. Mongolica ssp.rhamnoides ssp. Sinensis ssp. Turkestanica ssp. Wolongensis ssp. Yunnanensis
Hippophaë salicifolia	
Hippophaë tibetana	



**Figure.03:** Distribution géographique des sous-espèces européennes de l'espèce Hippophaë rhamnoides, adaptée d'après Rousi 1971.

### **I.6 La famille des Elaeagnaceae**

La famille des Elaeagnaceae appartient à l'ordre des Rosales et se constitue de trois genres (*Elaeagnus* L., *Hippophaë* L., *Sherpherdia* Nutt.) et de 45 espèces. D'après la dernière version du groupe de phylogénie des angiospermes (APG, Angiosperm Phylogeny Group) (The Angiosperm Phylogeny Group, 2009), cette famille botanique est principalement présente dans l'hémisphère nord (Amérique du Nord, Europe et Asie) bien qu'elle tende à se développer dans d'autres régions du monde par l'utilisation de certaines espèces en agriculture ou comme plante ornementale. Tous les membres des Elaeagnaceae ont la particularité de développer des symbioses bactériennes au niveau de leurs racines avec un actinomycète *Frankia* (Benson et Silvester, 1993). Les nodules racinaires ainsi formés sont capables de fixer l'azote ce qui permet à ces plantes de coloniser des milieux pauvres.

### **I.7 Composition des différentes parties de l'argousier**

#### **➤ Baies d'argousier**

Les baies sont nutritives, bien qu'elles soient très acides. Elles sont de riches sources de protéines et de divers acides aminés essentiels. Elles contiennent également des éléments minéraux comme Ca, P, Fe et surtout K qui est le plus abondant parmi tous les autres éléments (Bal *et al.*, 2011). En outre, les fruits d'*Hippophae* comprennent des leviers élevés de vitamines, comme la C (695 mg/100g, ce qui est comparativement plus que les citrons et les oranges), les tocophérols (1-10 mg/100g) et les caroténoïdes (3-15 mg/100g) en particulier le  $\beta$ -carotène, le ly-copène, la zéaxanthine. Les baies contiennent également certaines autres vitamines comme l'acide folique, B1, B2. De plus, elles ont de grandes quantités de sucres - principalement du glucose et du fructose qui varient largement dans le jus de baies de 0,6 à 24,2 g/100ml. De plus, des acides organiques sont présents dans les fruits d'*Hippophae*, tels que les acides malique et quinique, ainsi que les acides oxaliques, citrique et tartrique. L'écorce de la tige et les baies contiennent de la 5-hydroxytryptamine, ce qui est rare chez les plantes.

La composition chimique des baies de l'argousier varie. Considérablement en raison de leur origine, du climat, de la taille et de la maturité des fruits, et de la méthode de traitement. En ce qui concerne l'arôme unique des baies d'*Hippophae*, il n'est

comparable à aucun autre fruit commun, en raison de leurs composés volatils, à savoir le dodécénoate d'éthyle, l'octanoate d'éthyle, le décanol, le dé-canoate d'éthyle et le dodécanoate d'éthyle (Kumar et *al.*, 2011).

En outre, les d'Hippophae contiennent des quantités élevées d'antioxydants naturels, ce qui se traduit par l'une des plus riches plantes en métabolites bioactives (Bal et *al.*, 2011). Leur principal antioxydant est l'acide ascorbique, alors qu'elles contiennent également des toco-phérols, des caroténoïdes, des flavonoïdes (Wang et *al.*, 2011). Le flavonoïde trouvé en plus grande quantité est l'isorhamnétine, suivi de l'isorhamnétine-3-O-13-D-glucoside, de la rutine, de l'ustzagaline, de la quercétine, de la myricétine et du kaempférol. Le tableau 1 présente la composition antioxydante du jus de baies d'argousier. Ce jus est nourrissant et a l'avantage de rester liquide même à des températures négatives, car il a un point de congélation de -22°C.

De plus, les fruits de l'argousier sont riches en acides gras insaturés (acide oléique, acide linoléique, acide linoléique) avec une moyenne de 86,3% (Suryakumar et Gupta ; 2011). Les baies contiennent également des phytostérols comme le  $\beta$ -sitostérol, l'ergostérol et les amyrynes (Bal et *al.*, 2011).



**Figure.04** : Baies d'argousier (Craaq, 2008).

#### ➤ Feuilles d'argousier

Les feuilles ont une teneur remarquable en nutriments et en composants bioactifs, notamment phénoliques. Ces substances dans les feuilles sont représentées par les flavonols leucoanthocyanidines, (-) épicatechine, (+) gallocatéchine, (-) épigallocatéchine et acide gallique (Suryakumar et Gupta ; 2011). Guan et *al* ; 2005 ont constaté que les feuilles fraîches

d'argousier sont riches en caroténoïdes totaux (26,3 mg/100g) et en chlorophylle totale (98,8 mg/100g), un indicateur de qualité pour les légumes verts ; alors que les feuilles séchées contiennent encore de grandes quantités de composés bioactifs comparables aux légumes couramment consommés. Les feuilles d'Hippophae contiennent également des quantités significatives de protéines (20,7%), d'acides aminés (0,73% de lysine, 0,13% de méthionine et de cystine) (Biswas *et al.*, 2010), de minéraux (Ca, Mg et K), d'acide folique, de catéchines, de stérols estérifiés, de triterpénols et d'isoprénols (Guan *et al.* ; 2005 ). Selon Kumar *et al.*, 2011, les tannins hippophaenins A et B ont isolés des feuilles de l'argousier.



**Figure.05 :** Les feuilles d'argousier (Craaq, 2008).

#### ➤ **La pulpe**

La pulpe de l'argousier contient principalement des  $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -carotènes, du glycopène et de la zéaxantine. Le groupe des vitamines B est principalement représenté par la B1 (thiamine), la B2 (riboflavine), la B6 (pyridoxine), la vitamine PP (nicotinamine, niacine, vitamine B3), et l'acide folique nécessaire à la synthèse des acides nucléiques. La teneur en vitamine C dépend de la variété et des conditions naturelles. Les plantes poussant en Asie centrale contiennent 150-200 mg/100 g, et les plantes alpines environ 800 mg/100 g. Les baies ne contiennent pas d'ascorbinase pour l'acidolyse ascorbique, la vitamine C est donc bien conservée dans les fruits secs et dans les produits (Valiček et Havelka, 2008). L'écorce de la tige et des fruits contient de la 5-hydroxytryptamine, que l'on trouve rarement dans les plantes (Kumaret *al.* ; 2011). Cette substance (5-hydroxytryptamine) est utilisée pour le traitement de la dépression post-choc.

➤ **Les rameaux**

Beaucoup sont longs et ramifiés et portent de nombreuses épines

➤ **Les épines**

Présence d'épines apicales et latérales dont la longueur est variable selon les variétés (Laurie Brown, 2015).



**Figure.06** : Les épines d'argousier (Craaq, 2008).

### **I.8 L'argousier comme plante de verger non conventionnelle**

L'argousier étant une plante dioïque, il a des fleurs unisexuées, ce qui signifie que les fleurs femelles poussent sur certains arbustes sur lesquels les fruits sont déposés, tandis que sur d'autres arbustes, les fleurs mâles poussent (Figure 07) et leur tâche est de produire du pollen pour la fertilisation des fleurs femelles. Les fruits sont classés comme non climactériques. Selon la variété, les fruits mûrs sont de forme ovale et le plus souvent de couleur jaune, orange ou rouge. Le poids du fruit est généralement compris entre 4 et 60 g 100-1, et pour certaines variétés russes, il dépasse 60 g (Pilat, 2014).

Dans les plantations de produits de base, l'argousier est cultivé sous forme d'arbustes ou d'arbres d'une hauteur de 2 à 4 m. Les plantes femelles sont dominantes, et les individus mâles, qui sont plantés comme pollinisateurs, devraient représenter environ 7 à 8 % du total. Il est préférable de planter les mâles dans la première rangée du côté des vents les plus

fréquents, puis dans chaque troisième rangée, tous les 6 ou 7 plants. Dans la pratique, le pourcentage de variétés pollinisatrices peut être réduit à Beata Pilat et al.424.4-5%, ce qui permet de récolter plusieurs tonnes supplémentaires par hectare. Le moment le plus propice pour la plantation est l'automne (octobre) ou le début du printemps. Le matériel de plantation doit être constitué d'arbustes âgés d'un an ou de deux ans, plantés à un espacement de 4 m x 2 m (1 250 plants/ha). En cas de plantation de variétés à faible croissance et d'application de la culture sous forme d'arbres à faible croissance, il est possible d'augmenter la densité des plantations (4 m x 1,5 m). En Pologne, dans les plantations industrielles, le rendement moyen est de 7-9 tonnes par 1 ha. Ceci est similaire aux rendements obtenus dans d'autres pays européens. Ces rendements sont obtenus tous les deux ans en raison de la méthode de récolte appliquée (coupe des pousses avec les fruits). Par conséquent, le rendement annuel moyen réel pour 1 ha est d'environ 4 t/ha (Pluta, 2014). Lors de la gestion de la plantation, il est nécessaire de contrôler les mauvaises herbes, de tondre l'herbe, d'appliquer une fertilisation minérale, une taille sanitaire des plantes ainsi qu'une irrigation en cas de sécheresse, et de protéger les plantes contre les maladies et les ravageurs. Les plantes peuvent être infectées par des maladies fongiques, par exemple le flétrissement fusarien (*Fusarium oxysporum*) et le flétrissement verticillien (*Verticillium* sp.), qui provoquent un dessèchement massif des plantes ainsi que la gangrène du tronc et le cancer noir. Les ravageurs les plus dangereux sont le *Rhagoletis batata*, la teigne de l'argousier, l'*Eriophyoidea*, le puceron vert de l'argousier, et la mouche de l'argousier.



**Figure.07:** Argousier ; fleurs femelles et mâles (Dasbuchvom Wurzen et *al.*, 1989).

### I.9 Caractéristiques des variétés d'argousier

L'argousier, en tant que plante poussant dans de nombreuses zones climatiques, a subi des modifications naturelles au cours des siècles, qui ont abouti à la création d'espèces différant par de nombreuses caractéristiques, par exemple l'habitat des arbres ou des arbustes, la taille et la couleur des fruits, la longueur du pédicelle, la densité des fruits sur les pousses, la tendance à la chute des fruits et la résistance aux parasites et aux maladies. Les premières plantations d'argousier ont été établies en Russie, où 60 variétés ont été sélectionnées parmi environ 150 variétés poussant à l'état sauvage (Lipowski et *al.*, 2012). En Pologne, la superficie des plantations de produits de base est faible. Le plus souvent, les arbustes d'argousier sont plantés à des fins esthétiques, dans les lotissements sous forme de haies et dans les parcs. À cette fin, un biotype communément appelé "Nadbałtycki" (ou "Baltique") est utilisé. Les recherches sur la culture effectuées à l'Institut de recherche sur l'horticulture de Skierniewice ont permis de sélectionner la variété "Jozef", ce qui nécessite sa promotion et son introduction dans les cultures. Actuellement, dans les plantations d'argousier, on cultive des variétés allemandes et des variétés enregistrées en Biélorussie et en Russie. Ces variétés comprennent : 'Podarok Sadu', 'Avgustinka', 'Botanicheskaya', 'Nivelena', 'Trofimovskay', et 'Plamiennaya'.

#### ➤ Podarok Sadu

C'est une variété mi-tardive avec des fruits légèrement ellipsoïdes, de couleur orange à rouge orangé (Figure 08). Les fruits mûrissent à la fin du mois d'août et en septembre. La teneur en vitamine C est de 85-166 mg/100 g, les sucres de 2,6-4,97%, les acides organiques de 1,75-3,6% et les graisses de 4,6-4,91%. Les arbustes ont des couronnes semblables à des parapluies et atteignent une hauteur de 3 m. C'est une variété résistante au gel, qui donne une récolte de 15-24 kg par arbuste, (Skalij, 2007 ; Lipowski et *al.*, 2012).



**Figure.08:** Podarok Sadu (Bieniek, 2007).

➤ **Avgustinka**

C'est une variété aux fruits orange, sphériques, légèrement ellipsoïdes (Figure 09). La teneur en vitamine C est de 95-174 mg.100<sup>-1</sup>g, la teneur en sucres de 1,1-4,5%, en acides organiques de 1,5-4,3% et en graisses de 2,7-4,8%. La récolte obtenue à partir d'un arbuste se situe dans une fourchette de 12,5-20,5 kg (Skalij, 2007).



**Figure.09** : Avgustinka (Skalij, 2007).

➤ **Botanicheskaya**

C'est une variété caractérisée par de petits fruits sphériques de couleur jaune foncé (Figure 10). La teneur en vitamine C est de 120-140mg.100<sup>-1</sup>g de fruits, les sucres de 3,1-5,67%, les acides de 1,60-3,1%, et les graisses de 3,67-5,6%. Jusqu'à 2,5 kg de fruits peuvent être récoltés sur un arbuste (Pilat, 2014).



**Figure.10** : Botanicheskaya (Bieniek, 2007).

➤ **Nivelena**

C'est une variété mi-précoce. La date de récolte se situe entre le 15 et le 20 août. Les fruits sont de couleur jaune et orange. La teneur en vitamine C est d'environ 81 mg/100 g de fruit, et

la teneur en graisses est de 3%. Cette variété donne d'excellentes récoltes. On peut récolter jusqu'à 35 kg de fruits sur un arbuste (Szalkiewicz et Zadernowski, 2006).



**Figure.11:** Nivelena (Szalkiewicz et Zadernowski, 2006).

➤ **Trofimovskay**

C'est une variété mi-tardive. La date de récolte des fruits se situe au tournant des mois d'août et de septembre. Elle est résistante au gel. Les fruits sont ovales et oblongs, de couleur orange. La teneur en vitamine C est de 91,78-183 mg.100<sup>-1</sup>g, en sucres 3.1-5%, en graisses 3,99-4,8%. La récolte d'un arbuste est, selon l'année, de 1,79 à 10,43 kg. (Szalkiewicz et Zadernowski, 2006).

➤ **Plamiennaya**

C'est une variété mi-précoce. Les fruits, de forme ovale, sont de couleur rouge et orange et sont récoltés entre le 15 et le 20 août. La récolte d'un arbuste est, en moyenne, de 19 kg, jusqu'à un maximum de 29 kg par plante (Szalkiewicz et Zadernowski, 2006).

**Chapitre II**

**Description phytochimique de**

**l'argousier**

## II. Molécules issues du métabolisme primaire et secondaire

Dans le monde végétal, les molécules naturellement synthétisées peuvent être classées en deux grandes catégories. Premièrement, il y a les composés qui sont produits dans toutes les cellules et qui jouent un rôle central dans le métabolisme et la reproduction de ces cellules. Ces molécules comprennent les acides nucléiques, les acides aminés communs, les acides gras et les sucres. Ils sont connus sous le nom de métabolites primaires. Deuxièmement, il y a les molécules qui peuvent être parfois caractéristiques de certaines familles et/ou espèces végétales et qui ne sont pas indispensables à la survie de la plante. Ces molécules correspondent aux métabolites secondaires qui peuvent être classés en trois grands groupes: les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes. La plupart des métabolites primaires exercent leurs effets biologiques au sein de la cellule ou de l'organisme qui est responsable de leur production, tandis que les métabolites secondaires, bio-synthétisés en réponse à un stress biotique et/ou abiotique, ont la particularité d'avoir des effets biologiques sur d'autres organismes, d'où leur intérêt dans les domaines cosmétique, pharmaceutique et agronomique (Guignard, 2006). Comme mentionné ci-dessus ces molécules sont synthétisées par les plantes en réponse aux variations de leur environnement proche. Leur teneur peut donc être fortement influencée au sein de la plante avec parfois des localisations spécifiques. Différentes études ont ainsi montré que la composition chimique et nutritive de l'argousier était soumise à d'importantes variations suivant les sous-espèces, le climat, l'origine, la maturité ou encore la méthodologie employée pour obtenir des molécules d'intérêt (Raffo et *al.*, 2004 ).

### II.1.1 Molécules issues du métabolisme primaire

#### II. 1.1.1 Les glucides

Les glucides sont des molécules indispensables à la survie des organismes vivants car leurs formes les plus simples sont à la base des mécanismes énergétiques et de la biosynthèse des autres métabolites. Chez les végétaux on les retrouve sous différentes formes (Bruneton, 2008) :

- ❖ Polymères énergétiques (amidon) ou structuraux (cellulose, pectines...).
- ❖ Sucres simples.
- ❖ Hétérosides (sucre lié avec une molécule non osidique).
- ❖ Précurseurs de voies de biosynthèse.

Dans cette partie, seuls les oses simples et leurs dérivés seront abordés, les hétérosides seront décrits en même temps que leurs génines.

Les baies d'argousier sont une source riche en oses simples et dérivés. Une équipe Finlandaise s'est attardée à l'identification des sucres des baies ainsi qu'à leur variation en fonction de l'origine, du climat et de la variété d'argousier (Zheng et *al.*, 2011). Les sucres majoritaires sont le glucose, le fructose et le xylose, sont des ingrédients importants des baies d'argousier. Les sucres solubles totaux rapportés pour les origines chinoises varient de 5,6 à 22,7% dans le jus brut. Les origines chinoises présentent des concentrations en sucres totaux plus élevées que les origines russes (Shyrko et Radzyuk, 1989), qui à leur tour, sont plus riches en sucres que les origines finlandaises (Kallio et *al.*, 1999). Le glucose est un composant majeur du sucre dans toutes les origines. Le glucose et le fructose représentent environ 90 % de la teneur totale en sucre pour les origines chinoise et russe (Ma et *al.*, 1989), mais seulement 60 % environ pour les Finlandais. La présence d'alcools de sucre mannitol, sorbitol, et xylitol à de faibles niveaux a été observée. Yang (2009), a rapporté les contenus en sucre dans les baies de trois sous-espèces (*Hippophaë rhamnoides* ssp.*sinensis*, *rhamnoides andmongolica*) collectées en Chine, Finlande et Russie sur quatre années consécutives. La somme du fructose et du glucose variait largement de 0,6 g/100 ml dans le jus de baies finlandaises de ssp.*Rhamnoides* à 24,2 g/100 ml dans le jus de baies sauvages chinoises de ssp.*sinensis*. Des variations annuelles ont également été constatées dans la teneur en sucre des baies collectées au cours de différentes années, ce qui pourrait s'expliquer par les légères variations des dates de collecte et des conditions climatiques au fil des ans.

### II.1.1.2 Acides aminés et organiques

Un total de 18 des 22 acides aminés connus ont été trouvés dans le fruit de l'argousier, dont la moitié sont essentiels puisqu'ils jouent un rôle critique dans divers processus de notre corps tels que la production d'énergie, la construction de cellules et de muscles, la perte de graisse, l'humeur et les fonctions cérébrales. Le jus d'argousier est riche en divers acides aminés libres. Chen (1988) a détecté 18 types d'acides aminés libres dans le jus d'argousier chinois. La teneur totale en acides aminés de l'argousier chinois donnée par Zhang, Yan, et *al.*, (1989) contient plus d'acide aspartique (426,6 mg/100 g) que celle révélée par Chen (1988). Parmi ceux-ci, huit acides aminés libres (thréonine, valine, méthionine, leucine, lysine, tryptophane, isoleucine et phénylalanine) sont essentiels pour le corps humain. Les baies de l'argousier contiennent des acides organiques, principalement des acides malique et quinique, qui constituent ensemble environ 90 % de tous les acides du fruit dans différentes origines. De grandes variations dans les concentrations d'acides ont également été rapportées entre les différentes origines. Les baies russes ont montré des concentrations relativement plus faibles

d'acidité totale (2,1-3,2 g/100 ml), les génotypes finlandais étaient intermédiaires avec une gamme de 4,2-6,5 g/100 ml, tandis que les génotypes chinois ont montré les plus fortes concentrations d'acide organique avec une gamme de 3,5-9,1 g/100 ml (Zhang et *al.*, 1989). Cependant, on ne sait pas dans quelle mesure les variations des traits mentionnés ci-dessus ont une base génétique

### II.1.1.3 Les lipides

Le terme lipide est en général utilisé pour décrire des molécules à caractère hydrophobe et solubles dans des solvants organiques. Cette définition peut convenir à différentes classes moléculaires telles que les acides gras, les terpènes, les caroténoïdes ou les stérols. Dans cette partie, seuls les acides gras et leurs dérivés seront abordés, les autres classes étant issues du métabolisme secondaire seront évoquées par la suite.

Les lipides qui sont de nature hydrophobe se retrouvent principalement dans les fractions huileuses de la plante. L'argousier a la particularité de produire deux types d'huile, qui diffèrent par leur composition métabolique, l'une issue des parties charnues du fruit (pulpe et peau) et l'autre issue des graines. La quantité d'huile varie considérablement dans les parties tendres (de 1 à 35%) en fonction de la variété, de l'origine géographique et de la maturation des fruits, alors que la quantité d'huile dans les graines, moins soumise aux variations, est d'environ 10 % (Yang et Kallio, 2002). Pour l'huile des parties tendres, les acides gras majoritaires sont l'acide palmitoléique (16:1 n-7), l'acide palmitique (16:0) et l'acide oléique (18:1 n-9). L'huile issue des graines est riche en acides gras insaturés, dont les deux majoritaires sont l'acide linoléique (18:2 n-6) et l'acide linoléique (18:3 n-3). Néanmoins d'autres acides gras sont présents dans les graines, comme l'acide stéarique (18:0), l'acide oléique (18:1 n-9), l'acide palmitique (16:0) et l'acide vacénique (18:1 n-7). Les baies d'argousier sont également riches en tocophérols et tocotriénols. Dans la pulpe et la peau, l' $\alpha$ -tocophérol, ou vitamine E, constitue à lui seul 90 % de la quantité totale en tocophérols et tocotriénols alors que dans la graine les isomères  $\alpha$  et  $\gamma$  du tocophérol représentent chacun 30 à 50 % du total. L' $\alpha$ -,  $\beta$ -et  $\gamma$ -tocotriénol sont les plus présents dans les parties tendres alors que seulement le  $\beta$ -tocotriénol domine dans les graines (Yang et Kallio, 2002).

## II.1.2. Molécules issues du métabolisme secondaire

### II.1.2.1 Les composés phénoliques

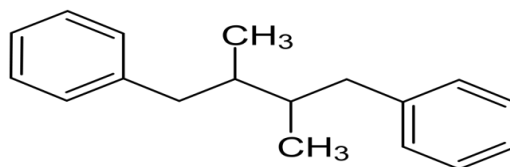
Les composés phénoliques des végétaux correspondent à un vaste ensemble de molécules qui ont toutes en commun un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ce sont des molécules issues du métabolisme secondaire et qui sont ubiquitaires du règne végétal et notamment des angiospermes. Les composés phénoliques interviennent dans différents aspects de la vie de la plante, ils sont ainsi impliqués dans la physiologie de la plante (lignification, interactions symbiotiques...), dans les mécanismes de défenses de la plante (interactions biotiques et abiotiques) ou encore dans la coloration des fleurs. Par ailleurs ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies de par leur action sur le métabolisme humain et leur propriété antioxydante. D'un point de vue biosynthétique, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques: la voie du shikimate, la plus courante, qui conduit entre autre à la formation des acides phénoliques, flavonoïdes et lignanes; et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones (Macheix et *al.*, 2005).

#### II.1.2.1.1 Les acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts que sont les acides hydroxybenzoïques (C6-C1) et les acides hydroxycinnamiques (C6-C3). Des composés de ces deux groupes ainsi que leurs dérivés estérifiés et glycosylés ont été trouvés dans les baies et les feuilles d'argousier par Arimboor et *al.*, 2008. Dans la pulpe et les graines, cinq acides hydroxybenzoïques (l'acide salicylique, l'acide  $\rho$ -hydroxybenzoïque, l'acide protocatéchique, l'acide gallique et l'acide vanillique) et quatre acides hydroxycinnamiques (l'acide cinnamique, l'acide  $\rho$ -coumarique, l'acide caféique et l'acide férulique). Une étude antérieure mentionne également la présence d'acide ellagique dans les baies d'argousier. Les feuilles quant à elles, sont moins riches en structures moléculaires avec seulement six acides phénoliques caractérisés, mais comme pour la pulpe et les baies c'est l'acide gallique qui est le plus abondant. Récemment, un dérivé glucosylé de l'acide férulique le 1-feruloyl- $\beta$ -D-glucoside, a été isolé et identifié des feuilles d'argousier (Kim et *al.*, 2011).

### II.1.2.1.2 Les lignanes

Les lignanes désignent des molécules qui résultent, le plus souvent, de l'établissement d'une liaison entre deux carbones de la chaîne latérale de deux acides hydroxycinnamiques. Ils interviennent dans les mécanismes de défense de la plante. Chez l'argousier deux lignanes ont été identifiés, le (-)-sécoisolaricirésinol et le (-)-matairésinol (Yang et *al.*, 2006).



**Figure. 12 :** Structures chimiques des lignanes de l'espèce Hippophae.

### II.1.2.1.3 Les flavanoïdes

L'ensemble des flavanoïdes, qui possèdent une origine biosynthétique commune, ont un élément structural de base en C15 (C6-C3-C6). Selon le degré d'oxydation du noyau central, qui peut être ouvert ou fermé, les flavanoïdes peuvent être regroupés en neuf classes distinctes: chalcones, aurones, flavones, isoflavones, flavonols, flavanones, flavane-3-ols, flavane-3,4-diols et anthocyanes. Dans la plante, ils sont très souvent liés avec des sucres, on parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à un sucre. La liaison glycosidique pouvant être de type C-O-C ou de type C-C. D'autres types de liaisons se retrouvent fréquemment dans les flavanoïdes comme des sulfatations ou des prénylations (Macheix et *al.*, 2005 ; Bruneton 2008). L'argousier contient de nombreux dérivés flavonoïques qui sont principalement représentés par des dérivés de flavonols et de flavane-3-ols.

#### ➤ Les flavonols

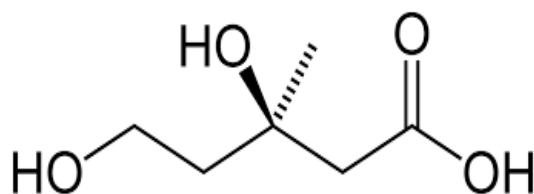
De nombreux travaux ont pu démontrer la richesse en flavonols et surtout en flavonols glycosylés des baies et des feuilles d'argousier. Pour exemple, les travaux réalisés par Rosch et *al.*, 2004 ont permis de détecter trente-quatre flavonols glycosylés et/ou acylés dans le jus d'argousier. Parmi ces composés il a pu être démontré que les flavonols glycosylés majoritaires des baies étaient l'isorhamnétine-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside, l'isorhamnétine-3-O-rutinoside, l'isorhamnétine-glucoside, l'isorhamnétine-3-O-sophoroside-7-O-rhamnoside, la quercétine-3-O-rutinoside, la quercétine-3-O-glucoside et la quercétine-3-O-sophoroside-7-O-rhamnoside. Les parties aglycones sont majoritairement représentées par l'isorhamnétine, la quercétine et le kaempférol (Zu et *al.*, 2006).

### ➤ Les flavan-3-ols

Les flavan-3-ols sont des flavonoïdes qui se caractérisent par un cycle central C très peu substitué et l'absence de fonction cétone. Par ailleurs, les flavan-3-ols sont à l'origine des tannins condensés ou proanthocyanides, qui correspondent à des oligomères ou des polymères de flavan-3-ols dérivés de la (+)-catéchine (Macheix et *al.*, 2005). Dans l'argousier, il a pu être mis en évidence que le jus et les résidus de fruits contiennent des monomères de (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (+)-gallocatéchine et (-)-épigallocatéchine (Rösch et *al.*, 2003), et que les feuilles contiennent seulement de la (+)-catéchine (Zu et *al.*, 2006). Toutefois, c'est dans les graines (contenues dans les résidus) et sous la forme de proanthocyanides que l'on retrouve majoritairement les flavan-3-ols. Dans le monde végétal, les polymères de flavan-3-ols peuvent être groupés en deux classes: les procyanidines constituées de sous unités (-)-épicatéchine, et les prodelphinidines constituées de sous unités (-)-épigallocatéchine. Les polymères dominants de l'argousier sont de type prodelphinidine avec des unités élémentaires (epi) gallocatéchine couplées, par des liaisons C4-C8, à des unités terminales gallocatéchine, ce qui est très rare dans le monde végétal dans lequel les procyanidines dominent largement (Fan et *al.*, 2007).

#### II.1.2.2 Dérivés terpéniques

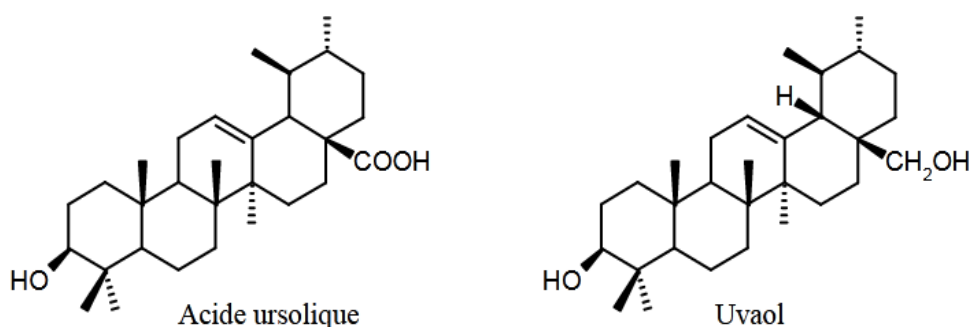
Les terpénoïdes sont une classe importante de métabolites secondaires qui proviennent du même précurseur biosynthétique, l'acide mévalonique (Figure 13). Chaque classe de terpènes est issue du couplage «tête-à-queue» d'unités isopréniques. La première étape de leur biosynthèse commence toujours par condensation de deux dérivés phosphorylés de l'acide mévalonique, l'isopentényl pyrophosphate et le diméthylallyl pyrophosphate (Bruneton, 2008).



**Figure. 13:** Structure de l'acide mévalonique (Thomas, 2011).

### II.1.2.2.1 Triterpènes

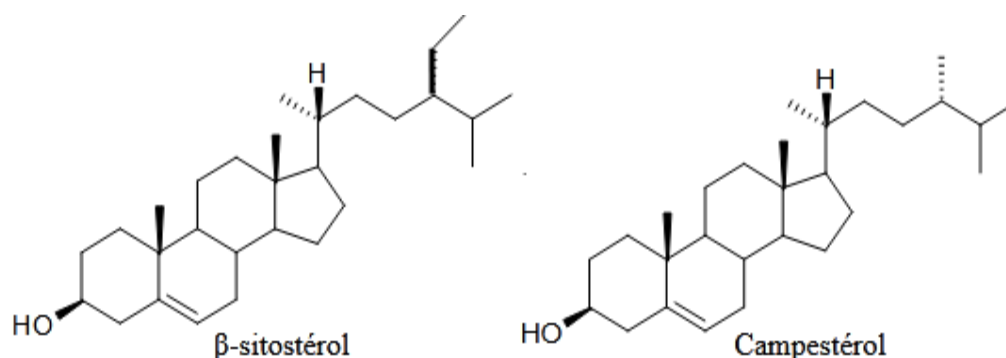
Les triterpènes sont des composés en C<sub>30</sub> issus de la cyclisation du squalène. Ils sont très souvent hydroxylés et présentent une très forte unité structurale (Bruneton, 2008). Dans l'argousier des triterpènes ont été identifiés dans différentes parties de la plante. Ainsi, dans les baies et les graines, l' $\alpha$  et  $\beta$ -amyrine, le lupeol, l'uvaol et l'acide ursolique ont été détectés (Figure 14). De l'acide ursolique a également été identifié dans les tiges (Yasukawa, 2009), ainsi que de l'acide oléanolique, des dérivés d'acide oléanolique et d'acide maslinique (Yang *et al.*, 2007).



**Figure. 14:** Exemples de triterpènes identifiés dans l'argousier (Thomas, 2011).

### II.1.2.2.2 Les phytostérols

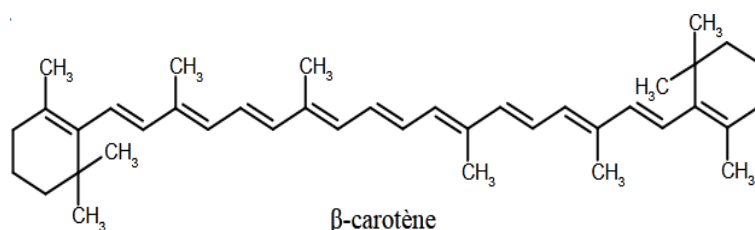
Les phytostérols, l'un des sous-groupes les plus importants des triterpènes, sont très présents dans les baies d'argousier. Ils constituent 0,02-0,04 % de l'huile des parties tendres et 0,1-0,2 % de l'huile de graines (Yang et Kallio, 2002). Différents travaux ont montré que le  $\beta$ -sistostérol était le phytostérol le plus abondant dans l'huile d'argousier. Parmi les autres phytostérols majoritaires (Figure 15) peuvent être cités: le campestérol, l'avenastérol, l'isofucostérol, le stigmastérol, le citrostadiérol, le cycloarténole, le 24-méthylnecycloartanol et l'obtusifoliolé. La composition en phytostérols majoritaires est peu soumise à variations en fonction de l'origine et de la période de récolte, au contraire des minoritaires. Toutefois, la composition en phytostérols isolés varie considérablement en fonction de la méthode d'extraction utilisée (Li *et al.*, 2007).



**Figure. 15:** Exemples de phytostérols identifiés dans l'argousier (Thomas, 2011).

### II.1.2.3 Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des terpènes en C40 qui possèdent un chromophore avec au moins dix doubles liaisons. Ce sont des pigments végétaux qui donnent une couleur jaune-orangée aux organes qui les contiennent. Les caroténoïdes peuvent être séparés en deux grandes classes, les carotènes et les xanthophylles qui diffèrent respectivement par l'absence ou la présence de fonctions hydroxyles. Ce sont ces molécules qui sont responsables de la couleur des baies d'argousier pouvant varier du jaune au rouge. La quantité de caroténoïdes est donc sujette à de nombreuses variations notamment en fonction des variétés, du climat et du degré de maturation des fruits (Andersson, 2008). Les caroténoïdes présents dans la baie, l'huile de pulpe et de graines, et dans les résidus d'argousier, s'y retrouvent sous forme de carotènes, de xanthophylles mais aussi sous forme de carotènes estérifiés (Raffo et *al.*, 2004). Les pigments majoritaires sont le β-carotène (Figure 16), la zéaxanthine et la β-cryptoxanthine, mais d'autres caroténoïdes ubiquitaires comme le lycopène, le γ-carotène ou la lutéine sont également présents.

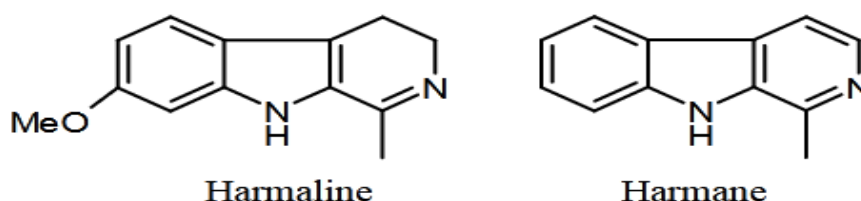


**Figure.16:** Exemple d'un caroténoïde identifié dans l'argousier (Thomas, 2011).

### II.1.2.2.3 Les alcaloïdes

Certaines publications datant d'au moins une vingtaine d'années et publiées en Russe ou en Allemand portent sur l'identification d'alcaloïdes présents dans différentes parties de l'argousier. Ces travaux mentionnent que des alcaloïdes indoliques, à savoir l'harmaline, l'harmane (Figure 17) (Pasich et *al.*, 1984) et l'éléagnine (Massagetov, 1946) sont présents

dans différentes parties de l'argousier. Plus récemment, Tolkachev et *al.*, 2008 ont confirmé la présence d'alcaloïdes indoliques de type  $\beta$ -carboline, à caractère hallucinogène, dans différentes plantes de la famille des Elaeagnaceae et notamment dans l'écorce des tiges d'argousier avec la présence de l'harmane et de ses dérivés.



**Figure.17:** Exemples d'alcaloïdes indoliques isolés de l'argousier

### II.1.3 Autres constituants

#### II.1.3.1 Les vitamines

Les fruits d'argousier sont très riches en vitamines (C, E, A, B1, B2, F, K et P) (Lu, 1992). Des études réalisées avec des fruits de la sous-espèce *sinensis* ont donné des concentrations en vitamines A, B2 et C beaucoup plus élevées que celles contenues dans d'autres fruits et légumes tels que la carotte, la tomate et l'orange (Zeb, 2004).

La teneur en vitamine C peut varier de 30.4 mg/100 g, chez les fruits de la sous-espèce *gyantsensis* (Rongsen, 2005), à 2500 mg/100 mg chez les fruits de la sous-espèce *chinoise sinensis* (Schroeder et Yao, 1995). Pour le cultivar *Indian-Summer*, Beveridge et *al* (1999; 2002) ont rapporté une teneur en vitamine C oscillant entre 137-193 mg/100 g. Comme le contenu de vitamine C est influencée par plusieurs facteurs, tels que le degré de maturation, l'origine et le temps de la cueillette, les conditions et le temps de stockage, ainsi que par des facteurs génétiques et géographiques, il existe une grande variation de la teneur en vitamine C entre les différentes sous-espèces et variétés.

Les tocophérols et tocotriénols (vitamine E) sont aussi trouvés dans des quantités appréciables dans les fruits d'argousier. La teneur totale de ces composants varie de 100 à 300 mg/kg et de 10 à 150 mg/kg dans les graines et les baies fraîches, respectivement (Yang et Kallio, 2002). Récemment, Cenkowski et *al.*, (2006) ont trouvé des concentrations de tocophérols et tocotriénols variant entre 273.6 et 430.3 mg/100 g et entre 127.4 et 173 mg/100 g, pour les huiles des graines et la pulpe d'argousier respectivement, chez le cultivar *Indian-Summer*.

### II.1.3.2 Les composés volatils

La composition en composés volatils de l'huile essentielle de fruits d'argousier a été analysée par Cakir (2004). Trente composés ont pu être identifiés représentant 94,6 % de l'huile. Les composés majoritaires de cette huile sont l'éthyl dodécenoate, l'éthyl octanoate, le décanol et l'éthyl décanoate. De même Tian et *al.*, (2004) ont pu identifier les composés volatils des feuilles d'argousier dont les majoritaires sont le tetracosane(10–40%), l'acide hexadecanoïque(<0.1–11%), l'octadecatriénol (5–27%), le tetracosene (3–11%), et l'eicosanol (<0.1–13%).

### II.1.3.2 Les éléments minéraux

De nombreux éléments minéraux sont présents dans les baies/le jus et les graines de l'argousier et au moins 24 éléments chimiques sont présents dans le jus d'argousier, par exemple l'azote, le phosphore, le fer, le manganèse, le bore, le calcium, l'aluminium, le silicium et autres (Tong et *al.*, 1989). Le potassium joue un rôle important dans l'équilibre ionique et contribue à maintenir l'excitabilité des tissus du corps humain. Le potassium est le plus abondant de tous les éléments étudiés dans les baies ou les jus (Chen, 1988). La concentration de potassium est la plus abondante parmi tous les éléments étudiés dans les fruits et les graines de *H. rhamnoides*. Elle varie entre 10,12 et 14,84 ppm dans la pulpe et entre 9,33 et 13,42 ppm dans la graine (Dhyani et *al.*, 2007) de l'espèce indienne. Kallio et *al.* (1999) ont comparé huit éléments entre l'argousier chinois et finlandais et ont trouvé que les baies finlandaises contenaient moins de fer, de calcium et de plomb mais plus de cadmium que les baies chinoises. Il a été constaté que la maturité du fruit affecte le niveau de N, Ca, K, Na, Mg, Cu, Fe, Zn, et Mn (Bounous et Zanini, 1988). Dans les liqueurs préparées à partir de l'argousier, des traces d'Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Li, Pb, Rb et Zn ont été détectées par Harju et Ronkainen (1984). Les baies finlandaises contiennent moins de Fe, Ca et Pb, mais plus de Cd que les baies chinoises, ce qui peut s'expliquer par la teneur naturelle en éléments du sol et par la contamination du sol et de l'air. D'autres macro et micronutriments, à savoir le sodium, le magnésium, le fer, le cuivre, le zinc... etc. sont présents en quantité faible à modérée dans la pulpe et les graines des fruits.

**Chapitre III**  
**Propriétés de l'argousier**  
**(Hippophae Rhamnoides. L)**

### III. L'utilisation de l'argousier

#### III.1 L'argousier dans l'industrie cosmétique

L'huile extraite des fruits et des graines de l'argousier est la ressource la plus précieuse et la plus utilisée dans l'industrie cosmétique (Wilkowska et *al.*, 2009). L'une de ses propriétés les plus connues est son effet nourrissant et régénérant sur la peau et les muqueuses, qui se traduit par une teneur élevée en vitamines liposolubles (vitamine A et E) et en nutriments (AGE, phytostérols) (Bawa et *al.*, 2002).

L'huile d'argousier, comme toutes les graisses végétales, peut être divisée en deux groupes en raison de leur construction chimique. Le premier groupe est constitué d'esters, qui peuvent subir une hydrolyse alcaline ce sont principalement des triacylglycérols et ils sont des composants fondamentaux des huiles végétales. Le second groupe comprend des substances appelées fraction insaponifiable, qui ne subissent pas d'hydrolyse alcaline. La fraction insaponifiable avec les esters d'alcools autres que le glycérol crée la fraction non glycérique, formée par de nombreuses substances chimiques à potentiel cosmétique telles que les hydrocarbures, les esters, les stérols, les céramides, les lécithines, les tocophérols et les caroténoïdes. La composition et la teneur de cette fraction peuvent varier en fonction de divers facteurs tels que la variété de la plante, les conditions climatiques ou l'irrigation des cultures. La teneur moyenne en fraction insaponifiable de l'huile d'argousier est de 2,5 à 4,0 % (Pytkowska et *al.*, 2008).

##### III.1.1 Protection contre les rayons UV

Les caroténoïdes ( $\alpha$ -,  $\beta$ - et  $\gamma$ -Carotène) représentent jusqu'à 0,6% de la fraction insaponifiable de l'huile d'argousier et ce sont des composés très précieux pour l'industrie cosmétique. Ils ont la capacité d'absorber les rayons UV et de les transformer en vitamine A (rétinol). L'huile d'argousier, qui absorbe fortement les rayons UV-B dont la longueur d'onde est comprise entre 290 et 320 nm et qui peuvent provoquer le bronzage et les coups de soleil, peut être utilisée comme écran solaire naturel. Cependant, la caractéristique la plus importante des caroténoïdes est leur activité anti-radicalaire - ils peuvent capturer les radicaux libres tels que l'oxygène (Beveridge et *al.*, 1999).

##### III.1.2 Rides et sécheresse de la peau

Les autres propriétés les plus courantes des substances présentes dans l'huile d'argousier sont leur action régénératrice, émolliente et anti-âge. Ces caractéristiques rendent les produits à

base d'argousier souhaitables pour revitaliser et soigner la peau (Bawa et *al.*, 2002). Une étude menée sur 350 patients en Chine a montré les effets positifs d'une crème cosmétique à base d'huile d'argousier. Elle a fait disparaître la décoloration de la peau et les taches de rousseur, lissé les rides et éliminé la sécheresse de la peau (Zhong et *al.*, 1989). L'effet thérapeutique positif de la crème cosmétique à base d'huile d'*H.Rhamnoides*, utilisée pour de nombreuses affections cutanées, a été confirmé par les essais cliniques menés au Shantow Tropical Diseases Hospital et au Shanxi Pharmaceutical Research au Népal. Ces études ont également montré que l'extrait d'argousier pouvait accélérer le métabolisme et inhiber le processus de vieillissement de la peau, la rendant à la fois plus douce et plus lisse. Cet extrait a également retardé la chute des cheveux (alopécie) et amélioré leur croissance (Bawa et *al.*, 2002).

Les propriétés lissantes de l'argousier ont également été confirmées par Yang et *al.* (2009). Après 12 semaines de supplémentation en huile d'argousier, la peau des patients est devenue beaucoup plus hydratée et sa rugosité a diminué (Yang et *al.*, 2009). Schwartz et *al.* (2006) ont également décrit les effets positifs de compléments alimentaires pour la peau contenant entre autres de l'argousier et de la zéaxanthine. La peau des personnes ayant reçu un complément à base d'argousier était plus humide que celle du groupe témoin, qui avait reçu un placebo (huile de tournesol). Une meilleure hydratation de la peau a entraîné une réduction des rides et ridules du visage causées par le processus de vieillissement de la peau (Schwartz et *al.*, 2006).

### **III.1.3 Maladies dermatologiques**

Les substances à potentiel sanitaire contenues dans l'argousier peuvent également prévenir les maladies dermatologiques comme l'eczéma atopique, le chloasma, le xérodème ou la dermatite récurrente (Khan et *al.*, 2010). Chirila et *al.* (2014) décrivent les effets positifs de la crème cosmétique à l'extrait d'argousier sur d'autres affections comme les changements de couleur de la peau causés par la thyroïdite de Hashimoto et le vitiligo ou l'acné juvénile. Dans le premier cas, chez une femme de 34 ans, après 4 mois d'utilisation de la crème, la peau a été régénérée de 35-40%. Dans le second cas, un jeune homme de 15 ans souffrait de nombreuses pustules, de nodules douloureux et d'abcès profonds sur la peau, dont le nombre a diminué de 25-50% après un mois d'utilisation de la crème à l'extrait d'argousier. Après 4 mois de traitement, l'infection staphylococcique chez le même garçon a été complètement éliminée. On a également constaté une régénération de 50% des cicatrices laissées par l'acné (Chirila et *al.*, 2014).

### III.2 L'argousier en pharmacie

L'argousier est une plante qui contient beaucoup de composés bioactifs doués de propriétés thérapeutiques (tableau 03) et pour cette raison il est largement utilisé dans les préparations galéniques. Elle a des propriétés antimicrobiennes, antivirales, antioxydantes et antidiabétiques. Ses substances actives ont un impact positif sur le système cardio-vasculaire, les yeux et les fonctions hépatiques. De plus, ces composés ont un effet neuroprotecteur et peuvent prévenir les maladies cancéreuses.

**Tableau. 03:** Les composés biologiquement actifs les plus importants de l'argousier et leur principaux effets thérapeutiques (Krejcarová et *al.*, 2015).

Nom du composé	Effet thérapeutique
Tocophérols	Activité antioxydante Limitation de la lipidperoxydation Soulagement de la douleur
Caroténoïdes	Activité antioxydante Participation à la synthèse du collagène Participation à la croissance de l'épithélium
Vitamine K	Prévention des hémorragies Cicatrisation des plaies Effet positif contre l'ulcération
Vitamine B	Activité antioxydante Maintien de l'intégrité de la membrane cellulaire
Vitamines du groupe B	Stimulation de la régénération cellulaire Régénération du tissu neural
Phytostérols	Amélioration de la microcirculation de la peau Effet anti-tumoral Action anti-athérosclérose. Prévention de la formation d'ulcères. Régulation des processus inflammatoires

Polyphénols	Activité antioxydante Effet cytoprotecteur Effet cardioprotecteur Cicatrisation des plaies
Acides gras poly saturés (AGPI)	Effet immunomodulateur Effet neuroprotecteur Effet anti-tumoral

### III.2.1 Traitement du diabète

Dans le cas de patients atteints de diabète, il permet de diminuer l'activité de l'alpha-glucosidase. Cette enzyme a la capacité de couper les liaisons glycosidiques des oligosaccharides. Par conséquent, les composés qui peuvent inhiber cette enzyme sont nécessaires pour prévenir l'hyperglycémie postprandiale (Kim et *al.*, 2004). L'argousier comprend un grand nombre de substances différentes aux propriétés variées. Les flavonoïdes des graines et des fruits de *Hippophae rhamnoides L.* provoquent une hypoglycémie et une hypolipidémie (Cao et *al.*, 2003).

En 2015, ont été présentés les résultats d'une recherche, dont le but était d'évaluer l'effet des extraits d'argousier. Les chercheurs ont utilisé deux extraits différents - aqueux et méthanolique - à différentes concentrations (de 0,0625 à 0,5 mg/ml). Ils voulaient évaluer les fonctions antidiabétique et antioxydante des feuilles d'argousier. Pour évaluer l'activité antidiabétique de la plante, ils ont utilisé le test d'inhibition de l'alpha-glucosidase. Les résultats ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles a provoqué de meilleurs effets liés aux valeurs d'IC50. Ce paramètre (IC50) est la quantité d'échantillon analysé qui est nécessaire pour inhiber 50% de l'activité d'une enzyme. L'activité d'inhibition de l'alpha-glucosidase de l'extrait aqueux (0,50 mg/ml) était inférieure à 50%, et dans le cas de l'extrait méthanolique (0,50 mg/ml) cette valeur était d'environ 73,67%. La valeur du paramètre IC50 de l'extrait méthanolique était dans la concentration de 0,25 mg/ml, mais il était impossible d'évaluer des effets similaires dans l'extrait aqueux. Ces résultats ont montré que l'extrait méthanolique des feuilles d'argousier comprend des composés démontrant une activité d'inhibition de l'alpha-glucosidase. Ces particules biochimiques peuvent être utilisées dans le traitement du diabète car elles peuvent contrôler l'absorption du glucose (Bhardwaj et *al.*, 2015). Il existe également des résultats d'une autre recherche basée sur des rats diabétiques induits par la streptozotocine, où les feuilles d'argousier utilisées ont également montré une activité antidiabétique. Dans cette recherche, des rats non-diabétiques et diabétiques ont été comparés. Les rats diabétiques nourris à l'argousier présentaient des taux de glucose et de

cholestérol sanguins inférieurs à ceux des rats non diabétiques nourris avec le même supplément (Kim et *al.*, 2010).

### III.2.2 Remplacement des médicaments antibiotiques

Aujourd'hui, les chercheurs s'intéressent de près aux propriétés antimicrobiennes de nouvelles substances, en raison du problème majeur de la résistance des micro-organismes aux antibiotiques synthétiques. Les bactéries peuvent provoquer des maladies infectieuses chez les plantes, les animaux et les humains. De nos jours, les plantes médicinales sont recherchées comme source de composés pouvant présenter une activité identique ou même supérieure à celle des médicaments antimicrobiens courants. L'argousier possède des feuilles et des graines qui présentent une efficacité antimicrobienne. Les feuilles brutes, l'huile des graines et l'extrait des graines ont été analysés par rapport aux bactéries gram-positives et gram-négatives et aux cultures fongiques.

Les résultats étaient prometteurs, car tous les extraits ont montré une activité antimicrobienne significative ou intermédiaire contre les bactéries à gram positif (*B. subtilis*, *B. thuringiensis*). Dans le cas des micro-organismes à gram négatif (*Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Acinetobacter junii*), l'extrait de graines d'argousier a montré une activité antibactérienne. Il est probable que les extraits ont montré une plus grande activité contre les bactéries gram-positives que contre les bactéries gram-négatives parce que les bactéries gram-positives ont une couche de peptidoglycane sur la paroi cellulaire, qui est une barrière inefficace. Seuls deux champignons (*Mucor indicus*, *Tilletia indica*) n'ont pas présenté de résistance à ces extraits de plantes. En revanche, *Rhizopusoryzae* était invulnérable à l'argousier. Les résultats de cette recherche ont montré que *Hippophae salicifolia L.* l'une des espèces d'argousier présentait la plus forte activité antimicrobienne et antifongique dans l'extrait brut de graines par rapport aux feuilles brutes et à l'huile de graines. On peut donc penser que l'argousier peut être utilisé comme médicament naturel et comme conservateur alimentaire (Gupta et *al.*, 2014). Il est connu que *Hippophae salicifolia L.* a une quantité plus élevée de composés phénoliques dans les feuilles et d'autres phénols dans les graines par rapport aux autres espèces d'argousier. Ces substances actives sont responsables de l'activité antibactérienne et antifongique. D'autres chercheurs ont montré des activités antioxydantes et antibactériennes élevées des extraits bruts de graines d'argousier dans divers systèmes modèles *in vitro* (Chauhan et *al.*, 2007).

Les bactéries responsables de différentes maladies infectieuses peuvent être trouvées dans les aliments. Les polyphénols sont responsables des propriétés antimicrobiennes de cette plante, ces composés sont présents dans les fruits, les feuilles et l'écorce de l'argousier (Chirinos et *al.*, 2010). En 2013 ont été publiés les résultats d'une étude réalisée sur les feuilles d'argousier. Les chercheurs ont essayé de mesurer l'activité antibactérienne de deux extraits en les comparant à un antibiotique bien connu - l'ampicilline. Les deux extraits ont montré des propriétés antibactériennes contre *E. coli*, *S. typhi*, *S. dysenteriae*, *S. pneumoniae* et *S. aureus*. L'activité la plus élevée de deux de ces extraits était contre *S. dysenteriae*, mais l'effet le plus marquant était observé avec la fraction phénolique comparée à l'extrait brut. Ces résultats suggèrent que l'activité antibactérienne pourrait être due aux flavonoïdes des extraits de feuilles de l'argousier (Yogendra Kumar et *al.*, 2013).

### III.2.3 Traitement des maladies cancéreuses

*Hippophae rhamnoides L.* est une plante qui a une signification importante dans le traitement des maladies cancéreuses. Cette plante contient des composés qui ont une meilleure activité que l'acide ascorbique pour prévenir la production de tumeurs. Dans le cadre d'une étude, des rats Wistar ont été nourris avec un régime contenant des suppléments d'aminopyrine (0,2 %) et de NaNO<sub>2</sub> (0,2 %), ainsi que de l'eau du robinet, du jus d'argousier et une solution d'acide ascorbique. La durée de vie moyenne de ces rats était significativement plus élevée (270 jours) dans le groupe nourri au jus d'argousier que dans celui nourri à l'eau du robinet (195 jours) et à la solution d'acide ascorbique (220 jours). De plus, dans le foie des rats nourris au jus d'argousier, il y avait moins de foyers de carcinogénèse que dans les autres groupes. Les résultats reçus suggèrent que la supplémentation en jus d'*Hippophae rhamnoides L.* peut avoir un impact sur le blocage de la formation endogène de composés N-nitroso avec des effets bien meilleurs que ceux de l'acide ascorbique ou de solutions aqueuses avec de l'aminopyrine (0,2%) et du NaNO<sub>2</sub> (0,2%) (Li et *al.*, 1991).

### III.2.4 Protection des yeux

Les caroténoïdes sont des substances très importantes dans le groupe des composés biologiquement actifs, en raison de leurs propriétés antioxydantes, anti-mutagènes et antitumorales (Britton et *al.*, 2009). Dans le vaste groupe des caroténoïdes de cette plante, il y a beaucoup de substances différentes, comme la zéaxanthine, la b-cryptoxanthine et le b-carotène (Andersson et *al.*, 2009). La zéaxanthine peut être trouvée dans la rétine et le cristallin de l'œil, elle est responsable de l'apparition de la couleur jaune. Il est donc généralement admis que ce composé et la lutéine peuvent protéger les yeux de la détérioration liée à l'âge et

de la cataracte. Dans la macula lutea de l'œil, ces substances qui ont des fonctions protectrices empêchant les dommages photo-oxydatifs de la tache jaune. Ces composés ont cette fonction en raison de leur rôle antioxydant. La zéaxantine et la lutéine peuvent filtrer la lumière bleue à haut niveau d'énergie. Il est probable que la diminution de la quantité de cette lumière bleue, qui peut atteindre la macula lutea, a la capacité de réduire le stress oxydatif dans la rétine (Krinsky et *al.*, 2003).

### **III.2.5 Les effets cardioprotecteurs**

Les flavonoïdes contenus dans l'argousier ainsi que les acides gras insaturés contenus dans l'huile de baie sont capables d'améliorer la fonction du système cardiovasculaire (Zeb, 2006) et de prévenir les maladies cardiaques (Christaki, 2012). Les flavonoïdes montrent un effet favorable sur la force de contraction du muscle cardiaque et le rythme cardiaque (Li et Beveridge, 2003 ; Kumar et *al.*, 2013).

### **III.2.6 Les effets antiathérogènes**

Il a été prouvé qu'une supplémentation alimentaire en argousier pouvait réduire le cholestérol total, les triglycérides et le cholestérol LDL, et augmenter le taux de cholestérol HDL par rapport à un régime sans argousier (Yang et Kallio, 2002). L'huile de graines est la plus efficace dans ce domaine. Basu et *al.* (2007) ont constaté que l'huile de graines d'argousier présentait des effets antiathérogènes et cardioprotecteurs significatifs chez les lapins.

### **III.2.7 Les effets hépatoprotecteurs**

Le foie est souvent affecté par une multitude de polluants environnementaux et de médicaments, qui font peser sur cet organe vital une charge susceptible d'endommager et d'affaiblir le foie et de conduire finalement à une hépatite ou une cirrhose. L'argousier a montré de nombreux effets positifs sur la protection du foie et le traitement des maladies du foie (Barkatet et *al.*, 2010). Les hépatotoxines telles que l'éthanol, le tétrachlorure de carbone et l'acétaminophène provoquent à divers degrés des dommages aux hépatocytes, la dégénérescence et la mort subséquente des cellules hépatiques (Michel et *al.*, 2012). Les substances contenues dans l'argousier comme les acides gras insaturés, l' $\alpha$ -tocophérol ou le  $\beta$ -carotène protègent les cellules hépatiques contre les dommages causés par les hépatotoxines. Les flavonoïdes sont principalement responsables de la protection contre l'engraissement du foie. L'argousier pourrait également contribuer à la prévention de la fibrose hépatique dans le futur (Li et Beveridge, 2003).

### III.2.8 Les effets immunomodulateurs

L'argousier renforce et accélère la réponse immunitaire de l'organisme (Michel et *al.*, 2012). Il accélère la régénération des muqueuses dans le tractus gastro-intestinal, comme dans l'estomac, le gros intestin, les voies urinaires et la cavité buccale (Christaki, 2012). Les composants de l'argousier qui contribuent le plus à l'effet immunomodulateur sont les flavonoïdes tels que la leucocyanidine et la catéchine en premier lieu, puis également l'isorhamnétine, la quercétine et la quassine. Ces substances renforcent le système immunitaire de l'organisme et augmentent la résistance aux maladies (Li et Beveridge, 2003).

### III.2.9 Les activités antioxydantes

#### ➤ Les baies d'argousier

La littérature fournit de nombreuses informations sur l'activité antioxydante des baies d'argousier en raison de leur richesse en molécules bioactives. L'étude seule des flavonols des baies d'argousier montre que ceux-ci sont fortement corrélés à l'activité antioxydante (Sharma et *al.*, 2007). Cependant, lorsque l'ensemble des molécules, hydrophiles et lipophiles, est pris en compte, la capacité antioxydante des baies est attribuée à l'action combinée de l'acide ascorbique, des polyphénols (acides phénoliques et flavonoïdes) et des caroténoïdes. Ainsi, l'augmentation de la quantité de caroténoïdes dans les fruits au cours de la maturation, entraîne une augmentation de l'activité antioxydante. L'étude de la contribution des molécules hydrophiles d'un jus de baies d'argousier, en fonction de leur structure et de leur concentration, a permis de déterminer que l'acide ascorbique et les proanthocyanidines (tanins condensés) sont les antioxydants hydrophiles majeurs du jus d'argousier, suivis par les dérivés glycosylés des flavonols. L'acide ascorbique est la molécule qui contribue le plus à l'activité antioxydante de par sa forte concentration dans les fruits, toutefois les proanthocyanidines sont plus antioxydants que l'acide ascorbique, mais à cause de leur faible concentration elles ne contribuent pas énormément à la capacité antioxydante de ceux-ci. Des travaux ciblés sur les proanthocyanidines de résidus d'argousier réalisés par Rösch et *al.* (Rösch et *al.*, 2004) ont confirmé que celles-ci avaient une capacité antioxydante supérieure à celle de l'acide ascorbique.

Le caractère antioxydant des baies d'argousier a été vérifié sur des lymphocytes soumis à un stress oxydatif (Geetha et *al.*, 2002).

➤ **Graines d'argousier**

La description de l'activité antioxydante des graines d'argousier est ici séparée en deux parties, car des différences au niveau des molécules actives apparaissent selon que l'activité a été mesurée sur des extraits hydrophiles ou sur de l'huile de graines. En utilisant différents modèles *in vitro*, l'équipe de Chauhan 2007 a pu démontrer que les graines d'argousier possédaient une forte activité antioxydante, particulièrement lorsque l'extraction était réalisée avec des solvants polaires (méthanol, eau), mais sans aucune identification des molécules d'intérêt. Un travail réalisé par Fan, 2007a montré que les fractions de graines d'argousier étaient constituées de proanthocyanidines. Les polymères dominants étant de type prodelphinidine avec des unités élémentaires (epi) gallocatéchine et des unités terminales gallocatéchine.

L'huile de graines d'argousier possède également des propriétés antioxydantes. Ainsi, l'application d'huile de graines d'argousier sur des rats blessés par brûlure entraîne une augmentation de la quantité de glutathion SH réduit (GSH) et réduit la production d'Espèces Réactives Oxygénées (ERO) au niveau des tissus blessés (Upadhyay et *al.*, 2009). Récemment, une étude réalisée *in vitro* et *in vivo* sur l'effet antioxydant de l'huile de graines (Ting et *al.*, 2011) a mis en évidence que l'administration d'huile de graines joue un rôle important dans la réduction du stress oxydatif. Cette forte activité antioxydante serait due d'une part, à la présence de tocophérols et de caroténoïdes qui ont la capacité de diminuer l'effet des ERO et d'autre part, à l'activation des systèmes de défense antioxydants cellulaires tel que les enzymes de type catalase ou superoxyde dismutase (SOD). Par ailleurs, une étude de Yang et *al.* (Yang et *al.*, 2011), confirme que l'huile de graines et de pulpes d'argousier possède une activité antioxydante importante sur différents modèles *in vitro*, et que ce sont les tocophérols et les caroténoïdes qui sont les antioxydants majoritaires de l'huile.

➤ **Feuilles d'argousier**

Longtemps délaissées par rapport aux baies, les feuilles d'argousier subissent un regain d'intérêt comme le justifie les études récentes portant sur l'activité antioxydante de celles-ci. Les feuilles d'argousier ont ainsi été montrées comme antioxydantes sur différents modèles *in vitro* en corrélation avec la présence de composés phénoliques tels que des dérivés flavonoïques (e.g. isorhamnétine, quercétine, isorhamnétine-3-O-glucoside, quercétine-3-O-galactoside, quercétine-3-O-glucoside, kaempférol, kaempférol-3-O-β-D-(6'-O-coumaryl)glycoside...) ou des dérivés d'acides phénoliques (i.e. 1-feruloyl-β-D-glucoside) (Kim et *al.*, 2011).

### III.3 L'argousier dans l'industrie alimentaire :

En raison de la richesse des substances bioactives présentes dans les fruits de l'argousier, il est maintenant très souvent utilisé dans la production d'aliments fonctionnels et diététiques en raison de l'augmentation constante de la demande des clients potentiels (Marszałek et *al.*, 2014). L'argousier fait partie des plantes les plus nutritives et les plus riches en vitamines. La variété des minéraux et des acides aminés contenus dans l'argousier est présentée dans les tableaux 2 et 3. Dans l'industrie alimentaire, l'argousier peut être utilisé comme agent de conservation ou additif alimentaire, ou bien il peut augmenter la valeur nutritionnelle et organoleptique des aliments (Schroeder et *al.*, 1995).

#### III.3.1 Jus et boissons

L'un des produits les plus populaires et les plus anciens fabriqués à partir de l'argousier est les jus ainsi que les boissons. Au début des années 40 du 20ème siècle, les fruits de l'*H.Rhamnoides* ont commencé à être utilisés à l'échelle industrielle en Russie. En 1943, une société pharmaceutique suisse a lancé des jus et des sirops comme complément à l'alimentation quotidienne. Ces boissons nutritives, riches en vitamine C et en carotène, sont très populaires en Chine, en Allemagne, en Scandinavie et dans les autres pays nordiques. Lors des Jeux Olympiques de Séoul en 1992, elles étaient les boissons officielles des athlètes chinois. Les boissons fabriquées à partir de cette plante étaient également utilisées dans le régime alimentaire des soldats indiens - ils recevaient des boissons multivitaminées à base de jus d'argousier pendant leur travail à des températures très basses. Les jus sont généralement obtenus par centrifugation de la fraction huileuse de la pulpe du fruit de l'argousier (Niesteruk et *al.*, 2013).

**Tableau. 04 :** Teneur moyenne en éléments dans les fruits de l'argousier (Beveridge et *al.*, 1999).

Élément chimique	Teneur moyenne [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Potassium (K)	497
Calcium (Ca)	143
Phosphore (P)	131
Magnésium (Mg)	70.4
Sodium (Na)	76.9
Cobalt (Co)	$\leq 0.1$
Chrome (Cr)	0.178
Cuivre (Cu)	0.384
Manganèse (Mn)	1.67

Nickel (Ni)	0.237
Strontium (Sr)	0.429
Vanadium (V)	0.0069
Fer (Fe)	7.58
Molybdène (Mo)	0.044
Zinc (Zn)	0.763
Étain (Sn)	0.170
Sélénium (Se)	9.21
Bore (B)	1.06
Bar (Ba)	0.244
Titane (Ti)	0.407
Lithium (Li)	0.203
Cadmium (Cd)	<0.05
Arsenic (As)	<0.5
Plomb (Pb)	0.551
Aluminium (Al)	7.88

**Tableau. 05:** Teneur en acides aminés des fruits de l'argousier (Beveridge et *al.*, 1999).

Acide aminé	Teneur [mg/100 g]	Acides aminés	Teneur [mg/100g]
Asparagine	426.6	Glutamine	19.4
Proline	45.2	Isoleucine	17.4
Thréonine	36.8	Glycine	16.7
Sérine	28.1	Histidine	13.7
Lysine	27.2	Tyrosine	13.4
Valine	21.8	Arginine	11.3
Alanine	21.2	Cystéine	3.3
Phényloalanine	20.0	Méthionine	2.3

### III.3.2 Confitures et gelées

Malgré leur goût aigre et exotique, les baies d'argousier peuvent être utilisées pour la production de confitures et de gelées. Sa saveur piquante peut être neutralisée en mélangeant le jus ou la pulpe de l'argousier et d'autres fruits au goût beaucoup plus doux dans différentes proportions (Bal et *al.*, 2011).

Les recherches menées par Marszałek et *al.*, 2014 ont montré que l'argousier, en raison de sa teneur élevée en composés biologiquement actifs, est un matériau précieux pour la production de confitures. Au cours de l'étude, une variété de saveurs a été préparée, en mélangeant des baies d'argousier avec d'autres fruits comme des pommes, des groseilles à maquereau, des framboises et des fraises, ce qui a également donné aux confitures des couleurs différentes (de l'orange au rouge foncé). L'analyse sensorielle a révélé que les confitures d'argousier additionnées de groseilles et de framboises ont obtenu les meilleures notes. Le plus grand

potentiel pour la santé caractérise les confitures d'argousier et de framboises, en raison de leur teneur élevée en vitamine C et en phénols.

La plus grande quantité de caroténoïdes a été trouvée dans la confiture d'argousier-framboise. Au cours de la recherche, outre les confitures édulcorées au sucre, produites de manière traditionnelle, des confitures dont la valeur énergétique est réduite à environ 70 % ont également été développées. En raison de la plus grande teneur en fruits et de la moindre quantité de sucre, les confitures sucrées avec des mélanges spéciaux d'édulcorants sont plus appréciées par les consommateurs et beaucoup plus nutritives et saines (Marszałek et *al.*, 2014).

### III.3.3 Compléments alimentaires et additifs alimentaires

Sur le marché alimentaire, les produits fabriqués à partir de l'argousier avec l'ajout de son huile jouent un rôle important. Les huiles provenant des graines et de la pulpe du fruit ont des propriétés nutritionnelles qui diffèrent les unes des autres en fonction des diverses méthodes de traitement. Le contenu de certains composés biologiquement actifs de l'huile d'argousier est présenté dans le tableau 06. Les huiles d'argousier peuvent entrer dans la composition de certains compléments alimentaires, par exemple ceux qui améliorent l'état des muqueuses. Ces compléments sont attrayants pour les consommateurs car ils sont une source naturelle de nombreuses substances favorables à la santé comme les caroténoïdes, les phytostérols (Bawa et *al.*, 2002).

Malheureusement, il existe également des cas de falsification de compléments alimentaires à base d'huile d'argousier. À cet effet, l'huile de tournesol est utilisée. L'ajout de  $\beta$ -carotène donne au produit une teinte similaire à la couleur orange de l'huile d'argousier originale (Hurkova et *al.*, 2016).

L'huile de *H. rhamnoides* combinée à d'autres huiles végétales peut également être utilisée pour élargir et diversifier l'offre d'huiles pressées à froid actuellement disponibles. Des recherches menées par Pacholek et *al.*, 2004 ont montré que les mélanges d'huile de lin contenant 5% d'huile d'argousier ont reçu un score élevé dans l'opinion des consommateurs en raison de la plus grande désirabilité de la couleur et du goût. Les mélanges ayant une teneur plus élevée en huile d'argousier ont été moins bien notés. L'ajout d'huile de baies d'argousier a entraîné une diminution de la stabilité à l'oxydation de l'huile de lin, ce qui est corrélé avec une durabilité moindre, il convient donc de s'en souvenir lors de la création de nouveaux

produits (Pacholek et *al.*, 2014). En outre, en Finlande, l'argousier est utilisé comme ingrédient nutritionnel dans les aliments pour bébés. Les restes du jus constituent un bon complément fonctionnel pour les produits à base de viande désossée mécaniquement et de viande désossée à la main en raison de l'inhibition de la décomposition des acides gras qu'ils contiennent et de l'enrichissement de la viande en polyphénols d'origine végétale, qui sont bénéfiques pour la santé humaine. Des études ont montré que l'ajout de 2% de baies en poudre n'entraîne pas de détérioration des caractéristiques organoleptiques des produits fabriqués à partir de viande désossée mécaniquement, comme le goût, l'odeur et la texture (Püssa et *al.*, 2008).

**Tableau. 06 :** Teneur moyenne des composés biologiquement actifs sélectionnés dans l'huile d'argousier obtenue à partir des graines et de la pulpe (Pilat et *al.*, 2015).

Composé chimique	Huile de graine	Huile de pâte à papier
Vitamine E	207 mg/100g	171 mg/100g
Vitamine K	110-230 mg/100g	54-59 mg/100g
Caroténoïdes (total)	10-50 mg/100g	130 mg/100g
Acides organiques (total)	11 mg/100g	38 mg/100g
Stérols (total)	1094 mg/100g	721 mg/100g
Acides gras insaturés (total)	87%	67%
Acide palmitoléique	<0,5%	33%
Acide oléique	18%	15%
Acide linoléique	38%	10%
acide $\alpha$ -linoléique	28%	8%
Acides gras saturés (total)	12%	33%
Acide palmitique	8%	28%

### III.3.4 Produits laitiers

L'argousier peut être exploité comme additif dans les produits laitiers comme le kéfir, le yaourt ou le fromage également. Des études menées par Liszka et *al.* (2014) ont montré que l'ajout de pulpe de baies d'argousier a entraîné une augmentation significative des propriétés antioxydantes des boissons lactées fermentées et a en outre augmenté l'acidité des produits testés. Le kéfir avec l'argousier était caractérisé par un nombre plus élevé de streptocoques mésophiles et un niveau plus faible de lactobacilles, tandis qu'aucun impact important de la pulpe sur le niveau de la microflore du yoghourt n'a été enregistré (Liszka et *al.*, 2014). Les baies de *H. rhamnoides* ont également été utilisées dans la production de fromage feta, où elles ont joué le rôle d'un échafaudage biodégradable sur lequel la souche de bactéries probiotiques bénéfiques *Lactobacillus casei* ATCC 393 a pu se développer. En outre, l'ajout

d'argousier a également contribué à réduire le nombre de microorganismes pathogènes et à améliorer les propriétés organoleptiques du fromage (Terpou et *al.*, 2016).

### **III.3.5 Boissons alcoolisées**

La production de boissons alcoolisées à partir de l'argousier est également possible. Au Tibet, la teinture faite à partir de cette plante, riche en flavonoïdes, en vitamine K et en tanins, est utilisée depuis longtemps comme aide digestive dans de nombreuses affections du système digestif comme le syndrome de l'intestin paresseux. Il peut améliorer fonctionnement de l'estomac et maintenir l'activité normale du tractus gastro-intestinal (Bawa et *al.*, 2002). À son tour, le vin à base de fruits de l'argousier a gagné en popularité.

Sa popularité est la plus grande en République tchèque, où il est aussi généralement produit. Elle est caractérisée par une couleur dorée et un arôme agréable (Niesteluk et *al.*, 2013). Il est également possible de produire de la bière à partir de l'argousier (Lee et *al.*, 2012).

### **III.4 Développement et défi des produits de l'argousier à l'avenir**

Les baies d'argousier sont riches en substances phytochimiques bénéfiques pour la santé. Il est donc utile de développer davantage de produits alimentaires et de soins de santé à partir des différentes parties de la plante et de promouvoir son exploitation à grande échelle. La sélection des matières premières et des technologies influence la qualité des produits. En outre, les qualités sensorielles des baies d'argousier, en particulier l'astringence et l'amertume provoquées par le large éventail de composés phénoliques, constituent un défi particulier pour le développement. L'astringence et l'amertume sont généralement considérées comme des facteurs négatifs réduisant l'acceptation et l'appréciation des produits à base de baies par les consommateurs. Cependant, l'astringence et l'amertume peuvent donner des goûts complexes et équilibrés à certains types de boissons, comme le café, le thé, la bière et le vin (Geertsen et *al.*, 2016). Un certain degré de complexité dans le goût peut également améliorer l'acceptation des jus de fruits par les consommateurs.

# **Partie II**

## **Etude expérimentales**

# **Chapitre IV**

## **Matériels et méthodes**

### IV.1 L'objectif

Ce travail de recherche vise à :

- ✓ Caractérisations biochimiques des métabolismes secondaires des feuilles d'argousier.
- ✓ Réaliser les analyses quantitatives et qualitatives.

### IV.2 Matériels nécessaires

- L'étuve
- Broyeurs
- Tamis
- Dessiccateur
- Spatule
- Balance
- Pince
- Vase de tare
- Creuset
- Four à moufle
- Cartouches
- Rota-vapeur
- Soxhlet
- Spectrophotomètre
- Agitateur magnétique
- Barreau magnétique
- Bécher
- Entonnoir
- Erlenmeyer
- Micropipette
- Balance de précision
- Réfrigérateur
- PH mètre
- Tubes à essais
- Eprouvette graduée

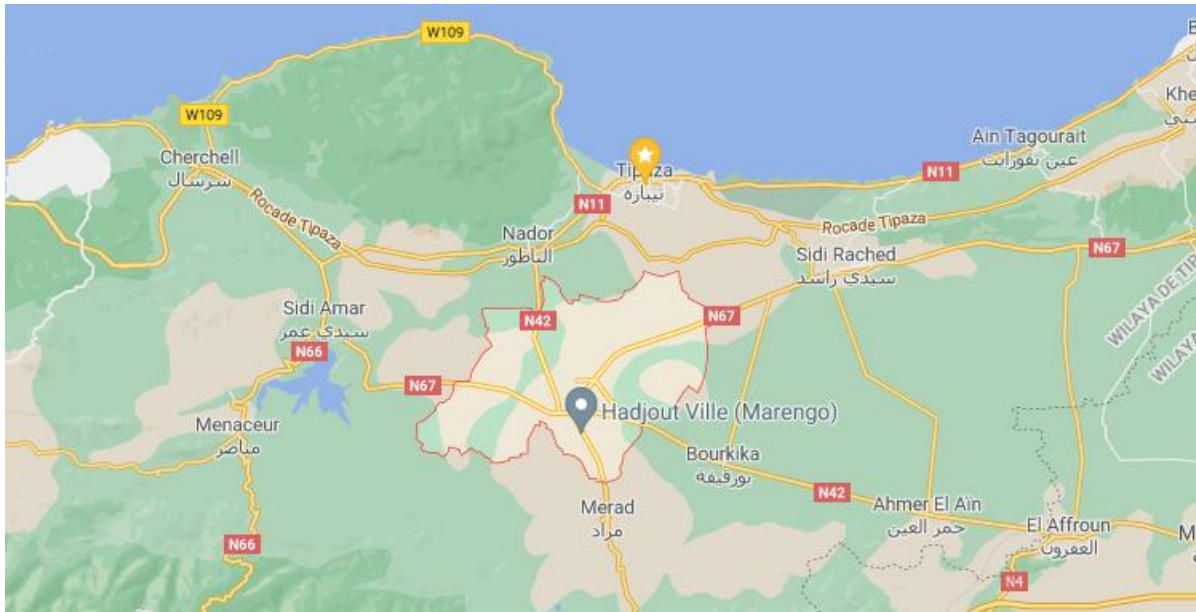
- Spatule
- Vortex
- Plaque chauffante
- Tube EDTA

### IV.3 Produits nécessaires

- Hexane (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>)
- L'éthanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)
- Bleu brillant de coomassie G-250
- BSA (bovin sérum albumine)
- Acide phosphorique (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)
- Peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Tampon phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)
- Ferricyanure de potassium K<sub>4</sub> [Fe(CN)<sub>6</sub>]
- TCA (acide trichloracétique)
- Chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>)
- L'hydroxyde de sodium (Na OH)
- Chloroforme (CHCl<sub>3</sub>)
- Acide sulfurique concentré (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Acides chlorhydrique(HCl)
- Méthanol (CH<sub>3</sub>OH)
- Acides acétique glaciale (CH<sub>3</sub>COOH)
- IC<sub>50</sub> (Concentration inhibitrice demi-maximale)

### IV.4 Localisation de station d'échantillonnage

Le travail sur terrain consiste à choisir des emplacements (station) aussi typique que possible. Ce choix est orienté par la présence de l'espèce qui a fait l'objet de notre étude. De ce fait, une station située à 12 km au sud de Tipaza (Hadjout).



**Figure.18:** Localisation de station d'échantillonnage (Google maps).

## IV.5 Méthodes

### IV.5.1 Préparation des feuilles

#### ➤ Mode opératoire

Les feuilles d'argousier sont lavées et blanchies pendant 1 min, puis séchées à 100°C dans l'étuve pendant 30 min. Après séchage, les feuilles ont été broyées et passées au tamis afin d'obtenir des particules de 1 mm.



**Figure.19 :** Les étapes de préparation des feuilles.

### IV.5.2 Déterminations du pourcentage d'humidité

#### ➤ Mode opératoire

Environ 2 g de poudre sont séchés par étuvage à 103°C pendant 3 heures, puis refroidis pendant une heure au dessiccateur. La perte de masse observée à la suite de cet étuvage est alors assimilée à la masse d'eau contenue dans le produit.

Le taux d'humidité correspond à la moyenne des résultats des trois essais, exprimé en g d'eau/100 g de poudre. P1 : masse en g du vase de tare. P2 : masse en g du (vase de tare + échantillon) avant séchage. P3 : la masse en g du (vase de tare +échantillon) après séchage (AOAC, 1990).



**Figure.20:** Le refroidissement dans le dessiccateur.

### IV.5.3 Détermination de la teneur en cendres

#### ➤ Mode opératoire

Une pré-incinération des creusets en porcelaines a été effectuée à 300°C pendant 15 minutes. Après refroidissement les creusets ont été pesés vides (P1) puis avec 1 g d'échantillon (P2), l'ensemble a été introduit dans un four à moufle réglé à 750°C pendant 2 h jusqu'à ce que le contenu ait pris une couleur blanche grisâtre, après refroidissement dans le dessiccateur. Une dernière pesée des creusets (P3) a été afin réalisée (Audigier et *al.*, 1980).



**Figure.21:** L'incinération d'échantillon dans un four à moufle.

#### IV.5.4 Détermination de la teneur en lipides

**Principe de l'appareil de Soxhlet :** c'est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide. L'échantillon entre rapidement en contact avec une portion de solvant pur, ce qui aide à déplacer l'équilibre de transfert vers le solvant. De plus, elle ne nécessite pas de filtration après extraction et peut être utilisée quel que soit la matrice végétale.

**Avantage :** Le cycle se répète indéfiniment. On peut ainsi épuiser complètement le solide en quelques cycles sans intervention. Le résultat est équivalent à une série de macérations successives, mais cette technique ne nécessite pas un grand nombre d'opérations.

Ainsi, on a un net gain de temps de manipulation : une fois mis en route, le montage n'a pas besoin d'être manipulé ni même surveillé jusqu'à son démontage. De plus, cette méthode des macérations successives pour une même efficacité d'extraction. L'intérêt est donc également économique.

**Inconvénients :** L'extraction par Soxhlet peut présenter quelques inconvénients :

- ✓ La taille de la cartouche étant limitée ; il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives avec plusieurs cartouches, ce qui peut prendre un temps considérable.
- ✓ L'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques.

➤ **Mode opératoire**

**A.** Environ 5g d'échantillon à analyser sont placés dans une cartouche à extraction. Un ballon préalablement séché dans une étuve, puis refroidi dans un dessiccateur. La cartouche contenant la prise d'essai, est placée dans l'appareil à extraction, puis la quantité nécessaire de solvant est versée dans le ballon.

Le ballon est alors adapté à l'appareil à extraction sur une plaque chauffante et le chauffage est conduit dans des conditions telles que le débit du reflux soit au moins trois gouttes par seconde (ébullition modérée, non tumultueuse) (Dubois et *al.*, 1956).

▪ **Première extraction**

Après une extraction d'une durée de 4 heures puis refroidissement, la cartouche est enlevée de l'appareil à extraction puis placée dans un courant d'air afin d'éliminer la majeure partie du solvant résiduel.

▪ **Deuxième extraction**

Le contenu de la cartouche est broyé, puis replacé dans la cartouche, d'une façon à récupérer toutes les particules résiduelles dans le broyeur. La cartouche est ensuite remise dans l'appareil à extraction. Après une extraction de 2 heures et refroidissement, la cartouche est enlevée de l'appareil à extraction et le solvant est éliminé puis le broyage est répété comme décrit ci-dessus.

▪ **Troisième extraction**

L'échantillon est replacé dans la cartouche, en récupérant sa totalité comme précédemment décrit, puis la cartouche est remise dans l'appareil à extraction. Une troisième extraction est procédée pendant 2 heures, en utilisant le même ballon est.



**Figure.22:** L'appareil de soxhlet.



**Figure.23:** Ballon après le séchage.



**Figure.24:** Ballon après l'extraction.

### **B. Elimination du solvant et pesée de l'extrait**

Par distillation sur rota-vapeur, la majeure partie du solvant contenu dans le ballon est éliminé. Les dernières traces de solvant sont chassées en chauffant le ballon durant environ 30 à 60 min dans l'étuve réglée à 60°C à la pression atmosphérique. Après refroidissement du ballon dans le dessiccateur à la température ambiante, la masse finale du ballon  $m_f$  est pesée.



**Figure. 25:** Le liquide obtenu après l'extraction.



**Figure. 26:** Rota-vapeur.

## IV.5.5 Les analyses quantitatives et qualitatives de l'extrait des feuilles d'argousier

### IV.5.5.1 Les analyses quantitatives

#### IV.5.5.1.1 Estimation des protéines foliaires (méthode de Lowry)

##### A. Préparation de tampon phosphate (pH=7,4)

-Solution de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (monosodique) : 0.89 g de sodium phosphate monosodique dans 100 ml d'eau distillée.

-Solution de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (disodique) : 0.78g de sodium phosphate disodique dans 100 ml d'eau distillée.

-Prendre un bécher et verser environ 10 ml de solution de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (monosodique) et 10 ml de solution de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (disodique).

-Mettre le bécher sur un agitateur magnétique.

-Utiliser un pH mètre précis.

-Ajouter goutte à goutte la solution de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (disodique) jusqu'à l'obtention du pH désiré (pH=7.4).



**Figure. 27:** Préparation de tampon phosphate.

##### B. Préparation des réactifs

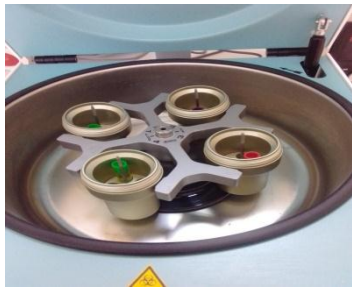
**Réactif 01 :** Pesée 2 g de carbonate de sodium, 0.4 chlorure de sodium et ajoutée ensuite 1 g de tartrate Na-K, et complétée avec l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

**Réactif 02 :** Dissoudre 0.5 g de sulfate de cuivre dans 100 ml d'eau distillée.

**Réactif 03 :** Mélangée la solution A (50 ml) avec la solution B (1 ml).

**Réactif 04 :** Diluée Le réactif phénolique de folin avec l'eau distillée (ratio 1 : 1).

Une fois les réactifs préparée, pesée 0.5 g des feuilles fraîches sont homogénéisées dans 5 ml de tampon phosphate (pH=7.5). L'homogénat est ensuite centrifugé pendant 10 min à 3000 rpm.



Centrifugation des extraits



La formation du surnageant

500  $\mu$ l de surnageant a été prélevé dans un tube à essai, puis a été mélangée avec 2.5 ml de réactif 3 et 250  $\mu$ l de réactif phénolique de folin après avoir été agité pendant 10 min, après 30 min d'incubation, l'absorbance de l'échantillon a été mesurée à 650 nm et la teneur en protéines a été déterminée (Waterborg, 2009).

#### IV.5.5.1.2 Dosage des protéines totales (méthode de Bradford)

**Principe :** la méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de coomassie G-250 après liaison avec les acides aminés basiques et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines.

##### ➤ Mode opératoire

A. Préparer une solution mère de BSA (1 mg/ml), à partir de cette solution préparer une série de dilution de concentration (solutions filles) en suivant le tableau si dessous :

**Tableau. 07** : réalisation de la courbe d'étalonnage de la BSA à 595 nm.

N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>BSA <math>\mu</math>l</b>	0	10	20	30	40	50	60	70	80
<b>L'eau Distillée <math>\mu</math>l</b>	100	90	80	70	60	50	40	30	20
<b>Bradford MI</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5

**B. Préparation de l'extrait sec pour les dosages des protéines totales**

Protocole à suivre pour la préparation de l'extrait sec désigné au dosage des protéines (Nassiri-Asl et *al.*, 2009).

10g de poudre d'échantillon (les feuilles d'argousier)

+

70 ml d'éthanol

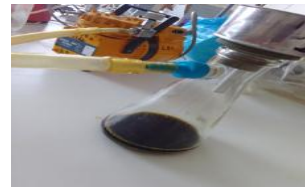
+

30 ml d'eau distillée

Laisser agiter pendant 24 heures



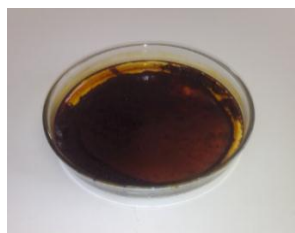
Procéder à la macération de l'échantillon



Filtrer l'échantillon d'un produit obtenu



Evaporer le produit obtenu



Obtention de l'extrait sec

### C. Préparation de solution de Bradford

Pesée 100 mg de bleu brillant de coomassie G-250 et dissoudre dans 50ml d'éthanol 95% (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH). Ensuite, ajoutée soigneusement sous agitation 100 ml d'acide phosphorique à 85% (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Complétée avec l'eau distillée jusqu'à un volume totale de 1l, puis Filtrée la solution obtenue et conservée à 4°C.

**Pour les mesures :** 100 µl d'extrait (0.1g d'extrait d'échantillon + 10 ml méthanol) sont mélangée avec 5 ml de solution Bradford et incubés pendant 5 minutes. Lire l'absorbance à 595 nm. La concentration en protéines totale est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage réaliser précédemment (Bradford, 1976).

#### IV.5.5.1.3 Test de piégeage du radical peroxyde d'hydrogène

##### ➤ Mode opératoire

Une solution de peroxyde d'hydrogène (200 mM) a été préparée dans un tampon phosphate (50 mM, ph=7.4). 100 µl d'échantillon (0.1-0.5 mg/ml) sont mélangés avec 400 µl de tampon phosphate 50 Mm (pH=7.4). Puis ajouter 600 µl de solution de peroxyde d'hydrogène et vortexer les tubes contenue d'échantillon. Noter l'absorbance de la solution à 230 nm après 10 min contre un blanc de PBS (Sahreen et *al.*, 2010).



**Figure. 28:** Homogénéisation de l'échantillon.



**Figure. 29:** Lecteur de l'absorbance par spectrophotomètre.

### IV.5.5.2 Les analyses qualitatives

#### IV.5.5.2.1 Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un moyen indispensable pour mettre en évidence la présence des molécules naturelles bioactives présente dans une espèce donnée. Toutefois, ce screening phytochimique ne renseigne point sur la nature des molécules bioactives. Bien entendu, les tests de caractérisation phytochimiques présentent des imprécisions car ils sont basés en partie sur l'analyse qualitative. Le principe est soit basé soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit la formation de complexe colorés en utilisant des réactions de coloration.

#### I.4.5.2.1.1 Caractérisation des métabolites secondaires

##### ➤ Evaluation des phénols

10 mg d'échantillon a été mis en suspension dans 1 ml d'éthanol, puis on ajoute 2 ml d'eau distillée et quelques gouttes de chlorure ferrique (10%). Le développement d'une couleur bleue ou verte confirmer la présence de phénols (Harborne et *al.*, 1973).

##### ➤ Evaluation des flavonoïdes

1 mg d'échantillon a été mélangée avec 1 ml d'hydroxyde de sodium 2N (1 g/10 ml). L'apparition d'une couleur jaune permet de confirmer la présence de flavonoïdes (Harborne, 1973).

##### ➤ Evaluation des coumarines

1 mg/ ml d'échantillon a été mélangée avec 1 ml d'hydroxyde de sodium à 10%. L'apparition d'une couleur jaune dans le tube à essai est la preuve de la présence de coumarines dans l'échantillon (Harborne, 1973).

##### ➤ Evaluation des saponines

2 mg d'échantillon a été mis en suspension dans 2 ml d'eau distillée et secoué vigoureusement. La formation d'une mousse de près de 1 à 2 cm permet de confirmer

la présence de saponines dans l'échantillon (Harborne, 1973).

➤ **Evaluation des tannins**

1 mg d'échantillon a été mélangé avec 2 ml de chlorure ferrique à 5%. Le signe de confirmation des tannins est le développement d'une couleur bleu foncé ou noir verdâtre. Confirme la présence des tannins dans l'échantillon (Harborne, 1973).

➤ **Evaluation des terpénoïdes**

0.5 mg d'échantillon a été mélangé avec 2 ml de chloroforme et 2 ml d'acide sulfurique concentré. L'apparition d'une couche de couleur rouge-brune au milieu confirme la présence des terpénoïdes (Harborne, 1973)

➤ **Evaluation d'antraquinone**

Le développement d'une couleur rouge a été considéré comme une indication de la présence d'antraquinone après mélange de 1 mg d'échantillon est mélangée avec 2 ml d'acide chlorhydrique dilué à 2%. Le développement d'une couleur rouge est confirmé la présence d'antraquinone (Harborne, 1973).

➤ **Evaluation d'anthocyanine et de la bétacyanine**

1 mg d'échantillon a été porté à ébullition pendant 10 min dans 2 ml d'hydroxyde de sodium 1N (0.5 g /5 ml). La formation d'une couleur verte bleutée est le signe de la présence d'anthocyane, alors que la formation d'une couleur jaune est le signe de la présence de la bétacyanine (Trease et Evans, 1989).

➤ **Evaluation des glycosides cardiaques**

Une aliquote de 5 ml d'extrait (50 mg/5ml dans le méthanol) a été mélangée avec 2 ml d'acides acétique glaciale, puis on ajoute une goutte de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) et 1 ml du  $H_2SO_4$  concentré. La formation d'un anneau brun à l'interface a confirmé la présence de glycosides cardiaques.

➤ **Evaluation phlobatannins**

80 mg de l'extrait a été mis on ébullition dans 1% HCl. La formation d'un précipité rouge permet de confirmer la présence indique des phlobatannins.

# **Chapitre V**

## **Résultats et discussion**

### V.1 Déterminations du pourcentage d'humidité

Après application de la formule ci-dessus, P1, P2, P3.

$$P2-P3 \longrightarrow P2-P1$$

$$X \longrightarrow 100$$

$$P2-P3$$

$$TH\% = \frac{\quad}{P2-P1} * 100$$

$$P2-P1$$

Taux en humidité:

$$P1 = 30.28g$$

$$P2 = 32.28g$$

$$P3 = 32.17g \quad TH\% = 5.5\%$$

D'après les résultats obtenus par cette expérience, on obtient que la teneur en humidité de 2g de poudre des feuilles d'argousier était de 5,5%, alors les feuilles d'argousier contiennent une faible quantité d'eau.

### V.2 Détermination de la teneur en cendres

$$P2-p3 \longrightarrow P2-P1$$

$$X \longrightarrow 100$$

$$P2-P3$$

$$MM\% = \frac{\quad}{P2-P1} * 100$$

$$P2-P1$$

$$P1 = 19 g$$

$$P2 = 20.3 g$$

$$P3 = 19.61 g \quad MM\% = 53.07 \%$$

D'après les résultats obtenus par l'évaluation de la teneur en cendre, qui désigne la partie minérale solide d'un échantillon, on obtient que la teneur en matière organique de 1 g de poudre des feuilles d'argousier était de 53.07%.

### **V.3 Détermination de la teneur en lipides**

Durant notre expérimentation, la teneur en huile exprimé en pourcentage de masse du produit est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en huile(\%)} = \frac{(\text{mf}-\text{mi})}{\text{me}} * 100$$

me : masse initiale de l'échantillon à analyser.

mi : masse de ballon vide.

mf : masse finale du ballon.

#### **Extraction 01**

$$\text{me} = 5\text{g}$$

$$\text{mi} = 96.40\text{g.}$$

$$\text{mf} = 98.44\text{g.}$$

$$\text{Teneur en huile} = 40.8\%$$

#### **Extraction 02**

$$\text{me} = 4.30\text{g.}$$

$$\text{mi} = 96.40\text{g.}$$

$$\text{mf} = 97.44\text{g.}$$

$$\text{Teneur en huile} = 24.18\%$$

**Extraction 03**

me = 3.98g.

mi = 96.44g.

mf = 96.98g.

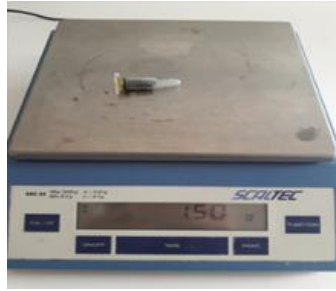
**Teneur en huile = 13.56%**

**Tableau 08 :** La masse d'huile obtenue dans les trois extractions.

	<b>La masse du tube vide</b>	<b>La masse du tube avec l'extrait lipidique</b>	<b>La masse de l'huile obtenue</b>
<b>Extraction n°1</b>	1.96 g	1.50 g	0.54 g
<b>Extraction n°2</b>	0.80 g	1.43 g	0.63 g
<b>Extraction n°3</b>	0.94 g	1.55 g	0.61 g

Résultat finale de la masse de l'huile obtenu dans les 3 extractions est : 1,78

D'après les résultats obtenus par les trois extractions selon la méthode de soxhlet utilisant l'hexane. Après 3 heures d'extraction ils ont rapporté des rendements entre 13.56% - 40.8%. L'huile obtenue à partir des feuilles d'argousier séchée est de couleur verdâtre.



**Figure. 30 :** L'huile obtenue après l'extraction.

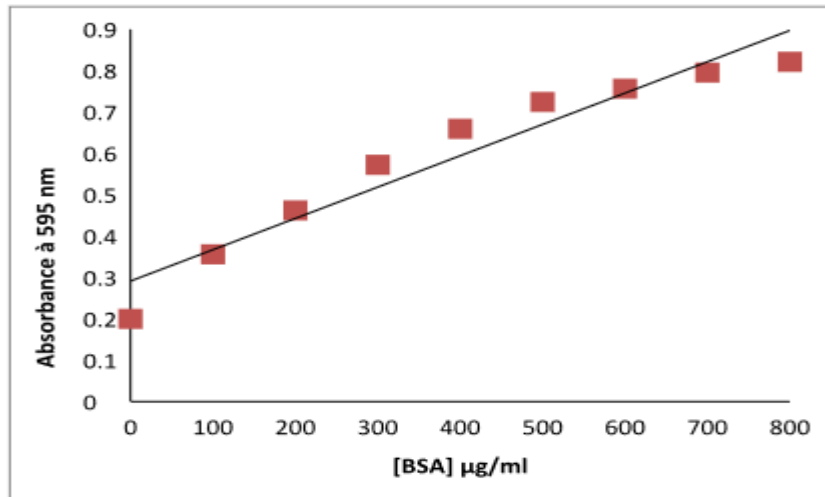
## **V.4 Les analyses quantitatives et qualitatives des feuilles d'argousier**

### **V.4.1 Les analyses quantitatives**

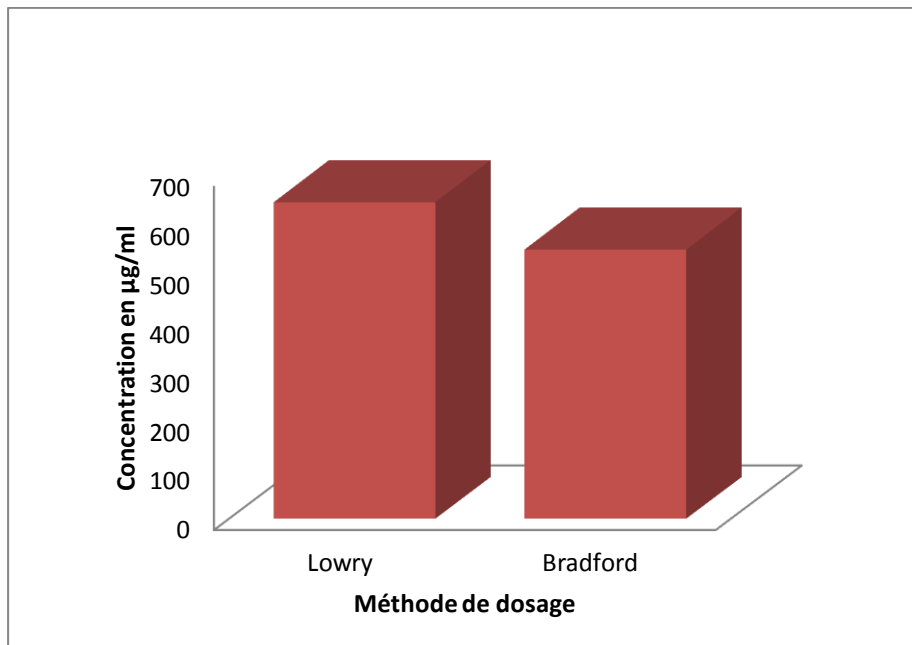
#### **V.4.1.1 Détermination de la teneur en protéines (méthodes de Bradford et lowry)**

Ruzin et *al.*, (2004) ont rapporté la présence d'une variation entre les résultats protéiques obtenus par les deux méthodes Lowry et Bradford, et cela par le fait que le réactif qui est utilisé dans l'analyse de Bradford a réagi seulement avec des protéines plus de 13 KDa en grande partie, tandis que le réactif de Lowry a réagi avec des protéines et peptides de toutes tailles. Ces différentes constatations concordent avec les résultats déduits dans ce présent travail, l'analyse de l'histogramme en figure 32 exprime une quantité élevée en protéines des feuilles d'argousier ( $645\mu\text{g/ml}$ ) qui sont dosés selon la méthode de Lowry, les protéines réagissent avec le réactif de folin pour donner des complexes colorés, selon la composition en acides aminés des protéines à doser.

L'analyse spectrophotométrique de l'extrait d'échantillon a montré la présence des protéines dans les feuilles d'argousier, la concentration des protéines a été obtenue par la méthode de Bradford par une estimation graphique de BSA (figure 31). La concentration des protéines de l'extrait d'échantillon s'est avérée être de  $549\mu\text{g/ml}$ . C'est une valeur moins faible que la concentration obtenue par la méthode de Lowry.



**Figure. 31:** Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines.

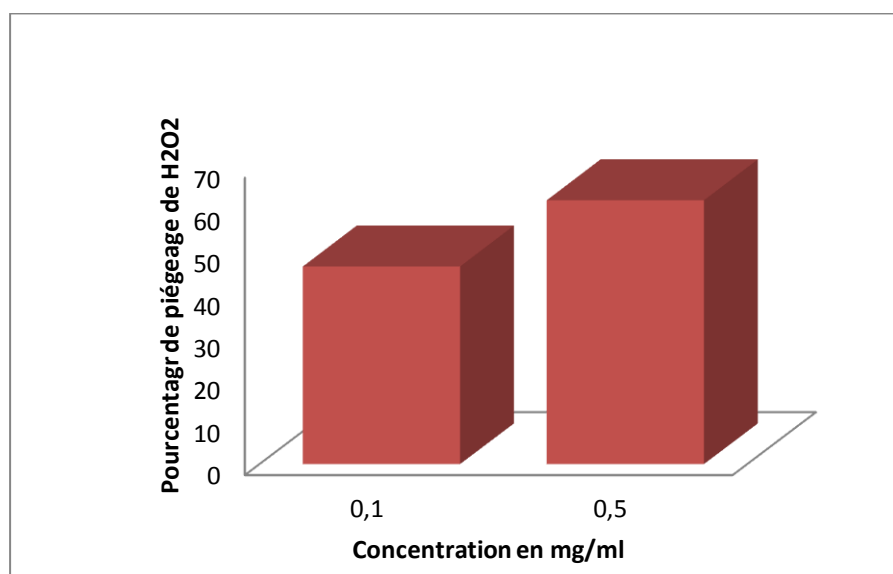


**Figure. 32:** Histogramme illustrant le dosage des protéines selon les deux méthodes : Lowry et Bradford.

#### V.4.1.2 Test de piégeage du radical peroxyde d'hydrogène

L'activité de piégeage du radical peroxyde d'hydrogène dans l'organisme de  $H_2O_2$  est rapidement des composés en hexogène et en eau, ce qui peut produire des radicaux hydroxyles (-OH) qui peuvent initier la peroxydation des lipides (Cheng, 1989). Par conséquent la capacité des extraits de plante à éliminer le peroxyde d'hydrogène a également été déterminée afin de savoir si les échantillons en le même modèle d'activité que la capacité de réduction des radicaux OH.

L'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène de la plupart des extraits des plantes était généralement faible, sauf pour quelqu'un. Parmi les extraits des plantes, l'extrait des feuilles d'argousier a présenté une activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène relativement faible ( $46.5 \pm 0.1$  et  $62.06 \pm 0.5$  mg/ml).



**Figure. 33:** Histogramme illustrant L'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène.

### V.4.2 Analyse qualitative

#### ➤ Screening phytochimique

Des tests phytochimique ont été appliqués sur les différents extraits aqueux et hydro alcoolique par différentes méthodes (décoction, infusion et macération).

Un test phytochimique permet l'identification des différentes familles de métabolites secondaires existants dans la partie étudiée de la plante (les alcaloïdes, les flavonoïdes,...etc.) Par des réactions de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille.

**Tableau 09** : Les résultats de screening phytochimique effectués sur les feuilles d'argousier sont mentionnés dans le tableau suivant.

Métabolites	Réactifs ou méthodes	Résultats
Secondaires		
phénols	Chlorure ferrique	+++
flavonoïdes	Hydroxyde de sodium	++
coumarines	Hydroxyde de sodium	+
saponines	Indice de mousse	+++
tannins	Chlorure ferrique	-
Terpénoïdes	Chloroforme /acide sulfurique	++
Anthraquinone	Acide chlorhydrique	-
Anthocyanine	Hydroxyde de sodium	-
glycosides	Acide acétique glaciale/ Chlorure ferrique/ acide sulfurique concentré	+++

Phlobatannins	Acide chlorhydrique	++
---------------	---------------------	----

+++Fortement positive ; ++Moyennement positive ; + Faiblement positive ; - Absent.

Screening phytochimique de l'argousier révèle une présence très remarquable des métabolites secondaires à savoir, les phénols, les saponines, les glycosides et une moyenne présence des flavonoïdes, phlobatannins, terpénoïdes ainsi que les huiles essentielles et une faible présence de coumarines et absence des tannins, l'antraquinone et l'anthocyanine. Ces résultat suggèrent que les feuilles de cet espèce est une source de molécules biologiquement actives tel que les phénols, les saponines et les glycosides.



Test de flavonoïdes



Test de phénols



Test des coumarines



Test des saponines



Test des tannins



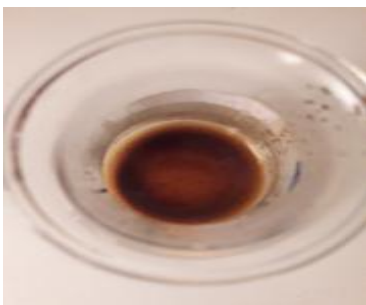
Test des terpénoïdes



Test d'antraquinone



Test d'anthocyanine



Test des glycosides



Test des phlobatannins

### V.5 Discussion

L'argousier est une plante dioïque appartenant à la famille des Elaeagnaceae; qui est malheureusement complètement abandonnée dans notre pays. D'ailleurs peu de travaux sont consacrés à cette espèce. Pourtant cette plante est très riche en composés bioactifs naturels doués d'activités biologiques et thérapeutiques. Dans ce contexte, et dans le but de mieux connaître et de valoriser cette plante, nous sommes fixés comme objectif principale de valoriser l'argousier à travers l'extraction et la caractérisation biochimique des composés bioactifs des feuilles d'argousier et ce dans le but d'évaluer leurs valeurs nutritives et leurs multiples usages.

D'après les résultats de la première expérience, nous avons constaté que la teneur en humidité de deux gramme de poudre de feuilles d'argousier était de 5.5%. Ainsi, le taux en matière sèche est estimé à 94.5%, la matière sèche est ce que l'on obtient lorsqu'on retire l'eau d'un produit. À partir de là, les feuilles d'argousier contiennent une faible quantité d'eau, car elles contiennent d'autres éléments tels que les glucides, protéines, lipides et composés phénoliques.

L'évaluation de la teneur en cendres qui désigne la partie minérale solide d'un échantillon, révèle un taux estimé à 46.93%, alors que la teneur en matière organique des feuilles d'argousier est estimée à 53.07%. L'incinération permet d'évaporer l'eau et de concentrer les sels minéraux qui se trouvent dans la sève continue dans les feuilles. Nos résultats concernant les teneurs en cendres sont supérieurs à ceux trouvés par Jaroszewska et Biel, (2017). En effet, les valeurs trouvées se situent entre 3.72 et 4.29%. de même les fortes teneurs en cendres trouvées dans les feuilles d'argousier ne sont pas comparable aux teneurs indiquées par Tkacz, (2019) et réalisées sur 5 variétés d'argousier d'origine romain qui sont comprises entre 0.31 et 0.43%. Nous pouvons expliquer cette variabilité entre les résultats des différentes variétés d'argousier par le fait que la teneur en minéraux dépend de plusieurs facteurs, tels que les caractéristiques génétiques, le climat, la nature de sol, la maturité de la plante et le moment de la récolte. Les faibles teneurs en cendres signifient que les feuilles sont propres à la consommation humaine (Tkacz et *al.*, 2019).

En plus des composés cités en haut, les feuilles d'argousier renferment aussi les lipides. L'extraction des huiles des feuilles d'argousier par la méthode conventionnelle d'extraction

par solvant a donné une huile dont les teneurs sont comprises entre 13.56 et 40.8%. L'huile obtenue à partir des feuilles d'argousier séchées a une odeur très caractéristique et prononcée, de couleur verdâtre. Il est à noter que le séchage des feuilles a facilité l'extraction des lipides contenus dans les feuilles d'argousier. Nos résultats sont largement supérieurs à ceux indiqués par Biel et *al.*, (2017). La présence des lipides dans les feuilles est une source d'acide gras essentiel tel que l'acide linoléique et linoléique. En effet, les teneurs en matières grasses de cette étude sont de l'ordre 6.1% (Biel et Jaroszevska, 2017). De même, Jaroszevska et Biel, (2017) ont trouvé des teneurs moyennes en lipides dans les feuilles de 5.6% de deux variétés d'argousier. Il ressort donc que les feuilles d'argousier sont une source non négligeable de lipides et donc d'acides gras. En effet, la littérature relate la richesse de l'argousier en oméga 3, oméga 6 et exceptionnellement oméga 7 dont les effets bénéfiques sont déjà connus. D'autres études sont nécessaires afin de caractériser les différents acides gras présents dans les feuilles. A titre d'exemple, une analyse chromatographique sur phase gazeuse pour la caractérisation des acides gras, une analyse lipidomique pour la caractérisation des lipides constituant les feuilles d'argousier sont nécessaires.

L'analyse des résultats trouvés, bien que préliminaires, puisqu'il manque le taux des glucides ainsi que la quantification des composés secondaires, démontrent clairement que cette plante, et plus précisément ses feuilles, est très riche en métabolites primaires tels que les lipides, dont les acides gras saturés et polyinsaturés, minéraux. La méthode conventionnelle d'extraction par solvant s'avère intéressante, car le coût est réduit et se réalise en peu de temps. D'autres méthodes sont disponibles tels que l'extraction par micro-ondes, extraction assistée par les enzymes, ou encore l'extraction par pression. La composition chimique de l'huile d'argousier varie selon les conditions de croissance, la localité et la variété (Munkhbayar et *al.*, 2014). La teneur en huile des feuilles (23.8-38.2 %) a été déterminée par extraction au Soxhlet avec comme résultats sensoriels une couleur verdâtre et une odeur prononcée qui fait rappeler l'odeur de la colle ou de la peinture (Manicha et Sharma, 2011).

Par ailleurs, les feuilles d'argousier sont très riches en composés bioactifs et nutritifs et en métabolites primaires. En effet, les feuilles d'argousier renferment une quantité considérable de protéines, des acides aminés tels que la lysine, méthionine et cystéine, acide folique, la catéchine, les stérols estérifiés, les triterpénols et les isoprénols (Sharma et *al.*, 2018).

La détermination de la teneur en protéines a été obtenue par deux méthodes Lowry et Bradford, Lu Tzong-shi et *al.*, (2010) ont également expliqué la différence dans les résultats des deux méthodes, par le fait que Bradford est sensible lorsque les teneurs sont assez faibles,

par contre les quantités sont trop élevées les deux méthodes donnent les même résultats. Redmile-Gordone et *al.*, (2013) ont trouvé pareillement une variation entre les résultats de dosage des protéines par les deux méthodes, ce qui est due au fait que la méthode de Bradford est la plus sensible en raison de la présence des polyphénols dans l'échantillon à analyser, par contre la méthode de Lowry est la plus précise.

Ces différentes constatations concordent avec les résultats déduits dans ce présent travail, la comparaison des deux méthodes permet d'observer que la concentration de la teneur en protéines obtenu par la méthode de Lowry (645 µg/ml) est plus élevée à ce que nous avons trouvé par la méthode de Bradford (549 µg/ml). Nos résultats sont différents à ceux indiqués par Lu, (1992) avant trouvés des teneurs moyenne en protéines dans les feuilles d'argousier comprises entre 16.2 g et 17.2 g de protéines des feuilles séchées. De même, Biswas et *al.*, 2010 ont trouvé également des quantités significatives de protéines dans les feuilles d'argousier, estimées à 20,7%. Les protéines sont l'un des composants chimiques importants des feuilles d'argousier qui ont une valeur dans l'alimentation animale et peuvent être utilisées comme source de protéines non conventionnelles pour l'alimentation humaine (Pirie, 1986).

En plus de la caractérisation biochimique des composés bioactifs de l'argousier, nous avons réalisé le test de l'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits obtenus des feuilles d'argousier afin d'évaluer leur activité antioxydante. Nos résultats indiquent une activités d'inhibition du peroxyde d'hydrogène qui est comprise entre  $46.5 \pm 0.1$  et  $62.06 \pm 0.5$  µl/mg. Nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus par Harza et *al.*, (2010), qui ont rapporté une activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène supérieure par les extraits des feuilles d'argousier qui est de l'ordre de  $75.77 \pm 0.08$  µl/mg. Ces résultats suggèrent la présence de molécules anti radicalaires permettant de transformer les espèces réactives générées par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indispensable pour la défense antioxydante au niveau cellulaire.

Le screening phytochimique de l'argousier révèle une présence très remarquable des métabolites secondaires à savoir, les phénols, les saponines, les glycosides et une présence moyenne en flavonoïdes, phlobatannins, terpénoïdes ainsi que les huiles essentielles et une faible présence de coumarines et absence des tannins, d'antraquinone et d'anthocyanine. Ces résultats suggèrent que les feuilles de cet espèce est une source de molécules biologiquement actives tel que les phénols, les saponines et les glycosides. Nos résultats concernant les métabolites secondaires sont différents de ceux trouvés par Valicek et Havelka, 2008. Les feuilles contiennent une quantité remarquable de substances bioactives, principalement phénoliques. Elles contiennent en moyenne 3.8% de saccharides, 0.2% de protopectine, 1%

des acides organiques, 170 mg/100 g de catéchine, polyphénols, lycopène caroténoïde, bioflavonoïdes, coumarines, et de tannins 8%. Dans une autre expérience, il a été démontré que les feuilles d'argousier contenaient plus de dix fois plus de polyphénols et plus de quatre fois plus de flavonoïdes totaux que celles du pissenlit. Les feuilles d'argousier présentaient également une plus grande concentration de caroténoïdes (8%) par rapport aux feuilles de pissenlit. La présence de diverses substances biologiquement actives dans les matières premières végétales, dont les composés polyphénoliques, influence considérablement leurs propriétés antioxydantes. Les fruits de l'argousier sont une source très importante de ces composés, avec une moyenne de 38,0 mg 100 g<sup>-1</sup> DM de flavonoïdes et des caroténoïdes totaux dans la gamme de 53,0 à 97,0 mg 100 g<sup>-1</sup> DM (Chu et *al.*, 2003). De même que les résultats présentés, certaines publications (Upadhyay et *al.*, 2011) confirment que les feuilles de la plante sont également une riche source de composés ayant des propriétés anti-inflammatoires et antibactériennes. Enfin, les feuilles d'argousier subissent un regain d'intérêt comme le justifie les études récentes portant sur l'activité antioxydante de celles-ci. Les feuilles d'argousier ont ainsi été montrées comme antioxydantes sur différents modèles *in vitro* en corrélation avec la présence de composés phénolique tels que des dérivés flavonoïques ou des dérivés d'acides phénoliques.

# **Conclusion**

### Conclusion

Ce mémoire a permis de montrer que l'argousier (*hippophae rhamnoides L.*) est une plante riche en molécules très diverses et qui pourrait offrir de nombreuses propriétés et utilisations dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et nutraceutiques.

L'étude bibliographique montre que l'argousier est une plante riche en molécules très diverses qui couvrent une large gamme de propriétés physico-chimiques. Dès lors, l'argousier présente un intérêt particulier, comme plante modèle, pour mettre en œuvre des méthodologies d'extraction, de fractionnement, d'analyse et d'identification de nouveaux produits naturels d'origine végétale.

L'étude des composés majeurs des feuilles nous a montrés, dans un premier temps, que le taux d'humidité est faible, il est de l'ordre de 5.5%. Le taux des minéraux par contre est trop élevé, il s'élève à 53.07%. Celui de la matière organique est estimé à 46.93%. Les teneurs sont comprises entre 13.56% et 40.8%.

Par la suite, nous avons réalisé des dosages des composés protéiques des feuilles d'argousier par deux méthodes (Bradford et Lowry) dans le but de faire une comparaison et de suivre l'évolution de la concentration protéique. La comparaison des deux méthodes montre que la concentration de la teneur en protéines obtenue par la méthode de Lowry (645 µg/ml) est légèrement plus élevée à celle que nous avons trouvée par la méthode de Bradford (549 µg/ml). Peu importe la méthode utilisée, nos résultats montrent clairement une richesse des feuilles d'argousier en protéine et suscite sa valorisation dans le secteur nutraceutique et comme produit naturel de santé. Cet intérêt pour valoriser les feuilles de l'argousier est aussi confirmé avec la présence des huiles des feuilles d'argousier offrent des teneurs estimées à 13.56%.

Les analyses quantitatives des extraits des feuilles d'argousier ont mis en évidence la présence des métabolites secondaires tels que : les phénols, saponines, glycosides, flavonoïdes, terpénoïdes, phlobatannins, ainsi que les anthocyanines.

L'activité de piégeage du peroxyde d'hydrogène des extraits étudiés et qui reflète les capacités antioxydantes des feuilles d'argousier est aussi importante avec des valeurs comprises entre  $46.5 \pm 0.1$  et  $62.06 \pm 0.5$  µl/mg. Ceci n'est qu'une preuve des potentialités thérapeutiques, pharmaceutiques et cosmétiques de cette espèce.

### **Perspective**

A la lumière des résultats trouvés, il serait judicieux de valoriser cette plante dans notre pays.

En raison des conditions actuelles, certaines expériences ne sont pas complètement terminées et sont restées en suspens, ce travail peut être amélioré, en y ajoutant quelques Paramètres tels que la méthode de réduction du radical libre DPPH et le test de pouvoir réducteur FRAP pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait des feuilles d'argousier. La LC-MS serait d'une grande utilité car elle permettra de séparer et d'identifier les différentes entités chimiques présentes dans les feuilles d'argousier telles que les composés phénoliques et les saponines extraits des feuilles D'argousier.

Enfin, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les activités biologiques, des tests *in vitro* sur des modèles cellulaires et *in vivo* sur des modèles animaux sont indispensables.

**Références**  
**bibliographies**

- **Akkermans, A.D.L., W. Roelofsen, J. Blom, K. Hussdanell, and R. Harkink.** 1983. Uti-lization of carbon and nitrogen compounds by Frankia in synthetic media and in rootnodules of *Alnus glutinosa*, *Hippophae rhamnoides*, and *Datisca cannabina*. *Can.J. Bot.* 61:2793–2800.
- **Andersson, M. E. Olsson, E. Johansson, K. Rumpunen,** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009): 250-258.
- **Andersson, S.C., Olsson, M.E., Johansson, E. and Rumpunen, K.** (2008) Carotenoids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries during ripening and use of pheophytin a as a maturity marker. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1): 250-258.
- **Andreeva, I.N., E.E. Fedorova, V.B. Il'yasova, and A.A. Tibilov.** 1982. Ultra-structure of nitrogen-fixing and winter in gnodules in one-year seedlings of sea buck-thorn and oleaster *Hippophae rhamnoides*, *Elaeagnus argentea*. *Soviet Plant Physiol. (USA)* 29:109–116.
- **AOAC** (1990) *Méthodes officielles d'analyse*. 15e édition, Association of Official Analytical Chemist, Washington DC.
- **Arimboor, R., Kumar, K.S. and Arumughan, C.** (2008) Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1): 31-38.
- **Audigier, Y., Mazarguil, H., Gout, R., & Cros, J.** (1980). Relations structure-activité des analogues de l'encéphaline au niveau des récepteurs opiacés et encéphaliques : corrélation avec l'analgésie. *Journal européen de pharmacologie* , 63 (1), 35-46.
- **Bailey, L.H. and E.Z. Bailey.** 1978. *Hortus Third*, A concise dictionary of plants culti-vated in the United States and Canada. MacMillan Pub. Co.
- **Bal, V. Meda, S. N. Naik, S. Satya,** *Food Research International* 44 (2011): 1718-1727.
- **Barkat A Khan, Akhtar N, Mahmood T** 2010: A comprehensive review of a magic plant, *Hippophae rhamnoides*. *Pharmacogn J* 2: 65-68 sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seed oil. *Phytomedicine* 14: 770-777.
- **Bartish, I.V., Jeppsson, N., Nybom, H. and Swenson, U.** (2002) Phylogeny of *Hippophae* (Elaeagnaceae) inferred from parsimony analysis of chloroplast DNA and morphology. *Systematic Botany*, 27(1): 41-54.

- **Basu M, Prasad R, Jayamurthy P, Pal K, Arumghan C, Sawheney RC** (2007): Anti-antherogenic effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seed oil. *Phytomedicine* 14: 770-777.
- **Bawa, F. Khanum, B. Singh, Natural Product Radiance** 1(4) (2002):8-14.
- **Benson, D.R. and Silvester, W.B.** (1993) Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 57(2): 293-319.
- **Bernath, J. and D. Foldesi.** 1992. Sea buck-thorn (*Hippophae rhamnoides* L.): A prom-ising new medicinal and food crop. *J. Herbs, Spices Medicinal Plants* 1:27–35.
- **Beveridge, T., Harrison, J.E., & Drover, J.** (2002). Processing effects on the composition of sea buckthorn juice from *Hippophaë rhamnoides* L. cv. Indian Summer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (1):113-116.
- **Beveridge, T.S.C. Li, B.O. Oomah, A. Smith, J. Agric Food Chem** 47(9) (1999) :3480-3488.
- **Bhardwaj, Ch. Varshneya, K. Kaistha, T. Tandon, Journal of Medicinal Plants Research** 9, 35 (2015): 929-932.
- **Bieniek A., Kawecki Z., Szalkiewicz M.** 2007. Polonowanie kilku odmian rokitnika zwyczajnego (*Hippophae rhamnoides* L.) w warunkach ciepłych. *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu CCCLXXXIII* (41), seria., *Ogrodnictwo*:275-278.
- **Biswas A., Bharti V. K., Acharya, Pawar D. D., Singh S. B.** 2010. Sea buckthorn: new feed opportunity for poultry in cold arid Ladakh region of India. *World's Poultry Sci J* : 707-714.
- **Bond, G.** 1983. Taxonomy and distribution of non-legume nitrogen-fixing systems, p.55–87. In: J.C. Gordon and C.I. Wheeler(eds.). *Biological nitrogen fixation in forest ecosystems: Foundations and applications*. Martinus Nijhoff, Dr. W. Junk Publishers, The Hague.
- **Bounous, G., & Zanini, E.** (1988). The variability of some components and biometric characteristics of fruits of six tree and shrub species. *Horticulture Abstract*,60, 4153.
- **Bradford, M.** (1976) *Anal. Biochem.*72, 248-256.
- **Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander, Nutrition and Health** 5 (2009).
- **Bruneton, J.** (2008) *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Lavoisier Technique & Documentation, 3<sup>ème</sup>éd. Paris, pp. 1120.

- **Cakir, A.**(2004) Essential oil and fatty acid composition of the fruits of *Hippophae rhamnoides* L. (sea buckthorn) and *Myrtus communis* L. from Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(9), 809-816.
- **Cao, W. J. Qu, Y. X. Deng, Z. C. Zhang, W. Niu, Y. F. Pan, Zhong Yao Cai** 26, 10 (2003) 735-737.
- **Cenkowski, S., Yakimishen, R., Przybylski, R., & Muir, W.E.** (2006). Quality of extracted sea buckthorn seed and pulp oil. *Canadian Biosystems Engineering*, 48, 3.9-3.16.
- **Chauhan, A.S., Negi, P.S. and Ramteke, R.S.**(2007) Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) seeds. *Fitoterapia*, 78(7-8), 590-592.
- **Chauhan, P.S. Negi, R.S. Ramteke, Fitoterapia** 78 (2007) 590-592.
- **Cheng S-J, Je K.** (1989) Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese Green Tea. *Carcinogenesis*. 10(6):1003–8.
- **Chirila, E. Oancea, I. A.** (2014), Oancea, Ovidius University Annals of Chemistry 25(2):5-80.
- **Chirinos, I. Betalleluz, A. Humána, C. Arbizub, R. Pedreschi, C.** (2010), Campos, *Food Chemistry* 113:1243-1251.
- **Christaki E** (2012): *Hippophae rhamnoides* L. (sea buckthorn): A potential source of nutraceuticals. *Food Public Health* 2: 69-72.
- **Chu, Q.C., Qu, W.Q., Peng, Y.Y., Cao, Q.H., and Ye, J.N.** (2003).Determination of flavonoids in *Hippophae rhamnoides* L. and its phytopharmaceuticals by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Chromatographia*, 58: 67–71.[doi:10.1365/s10337-003-0011-0](https://doi.org/10.1365/s10337-003-0011-0).
- **Cireasa,V.** (1986). *Hippophae rhamnoides* L. extension on Rufeni Hill, Iasi district. *Lucrari Stiintifice, Institutul Agronomic“Ion Ionescu de la Brad”*, Horticultura30:75–77. (*Hort. Abstr.* 58:6535).
- **Craaq, 2008** ( la culture de l’argousier) : 19-25.
- **Das Buch vom Wurzen”, Leipzig, Verlag fur die Frau,** 1989.
- **Davidson, C.D., R.J. Enns, and S. Gobin.**1994. Landscape plants at Morden Arboretum. Agriculture & Agri-Food Canada,Morden, Manitoba, Canada.

- **Dhyani, D., Maikhuri, R. K., Rao, K. S., Kumar, L., Purohit, V. K., Sundriyal, M., et al.** (2007). Basic nutritional attributes of *Hippophaë rhamnoides* (sea buckthorn) populations from Uttarakhand Himalaya, India. *Current Science*, 92(8), 1148–1152.
- **Dubois, M., Gilles, KA, Hamilton, JK, Rebers, PT et Smith, F.** (1956). Méthode colorimétrique pour la détermination des sucres et des substances apparentées. *Chimie analytique*, 28 (3), 350-356.
- **Eccleston C., Baoru Y., Tahvonen R., Kallio H., Rimbach G. H., Minihane A. M.** (2002). Effect of an antioxidant-rich juice (sea buckthorn) on risk factors for coronary hearth disease in humans. *J Nutr Biochem*. 13: 346-3 54.
- **Eliseev, I.P. and V.A. Fefelov.** (1977). Mate-rial for studying *Hippophae rhamnoides* in kabardino-Balkaria. *Trudy Gor'kovskogo Selskokhozyaistvennogo Instituta* 105:3–7.
- **Fan, J., Ding, X. and Gu, W.** (2007) Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. *Food Chemistry*, 102(1), 168-177.
- **Geetha, S., Sai Ram, M., Singh, V., Ilavazhagan, G. and Sawhney, R.C.** (2002) Anti-oxidant and immunomodulatory properties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*)-an in vitro study. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 373-378.
- **Google Maps.** Tipaza:  
(<https://www.google.dz/maps/place/Tipaza/@36.5971537,2.3386567,12z/data=3m14b1m53m41s0x12857ff16161de067f:0xe0ef283e09b4c8d98m23d36.59072234d2.443428hl=fr>).
- **Greetsen, J., B. H. Allesen-Holm, D.V. Byrn, and D. Giacolone.** (2016) Consumer-led development of noval sea bucthorn- based beverages. *Journal of sensory Studies* 31 (3): 245-55.
- **Guan T. T. Y., Cenkowski S., Hydamaka A.** (2005). Effect of drying on the nutraceutical quality of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *Sinensis*) leaves. *J Food Sci*. 70: E514-E518.
- **Guignard, J.-L.** (2006) *Biochimie végétale*. Dunod, 2ème éd., Paris, pp. 274.
- **Gupta, A.K. Gupta, Z. Ahmed and Anil Kumar, Emerging Trends in Research & Technologies** 4 (2014) 393-401.
- **Harborne JB.** (1973) *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. London, New York: Chapman and Hall Ltd : 49–188.

- **Harju, K., & Ronkainen, P.** (1984). Netals in the Finnish liquirs. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A,178, 393–396.
- **Harza, B., Sarkar, R., Biswas, S, et Mandal, N**(2010). Etude comparative des propriétés de piégeage des espèces antioxydante et réactives de l’oxygène dans les extraits de fruits de Terminalia chebula, Terminalia belerica et Emblica officinalis. BMC Médecine complémentaire et alternative, 10(1), 1-15.
- **Heinze, M. and H.J. Fiedler** 1981. Experimental planting of potash waste dumps. I.Communication: Pot experiments with trees and shrubs under various water and nutrient conditions. Archiv fur Acker- und Pflanzenbau und Bodenkunde 25:315–322.
- **Hurkova, J. Rubert, M. Stranska-Zachariasova, J. Hajslova,** (2016). Food Analytical Methods: 1-11.
- **Jaroszewska, A ; & Biel, w.** (2017) chimical composition and antioxydant activity of leaves of mycorrhized sea buckthorn Hippophaë rhamnoides L. (.Chilean journal of agriculturél research, 77(2), 155-162.
- **Kallio, K., Yang, B. R., Tahvonon, R., & Hakala, M.** (1999). Composition of sea buckthorn berries of various origins.Proceeding of International Symposium on Sea Buckthorn (Hippophaë rhamnoides L.), Beijing, China.
- **Kim, H.K. Han, S.S. Choi, Proceedings of the Nutrition Society 69** (2010):481.
- **Kim, J.-S., Kwon, Y.-S., Sa, Y.-J. and Kim, M.-J.**(2011) Isolation and identification of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides) phenolics with antioxidant activity and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(1), 138-144.
- **Kim, M. H. Wang, H. I. Rhee.** (2004), Carbohydrate Research 339:715-717
- **Kluczynski, B.** 1979. Suitability of selected tree and shrub species for the reclamation of ash wastes from power stations. Arbore-tum Kornickie 24:217–282.
- **Krejcarová, E. Straková, P. Suchý, I. Herzig, K. Karásková, Acta Vet. Brno 84** (2015) 257-268.
- **Krinsky, J. Landrum, R. Bone,** (2003), Annual Review of Nutrition 23: 171-201.
- **Kumar MSY, Tirpude RJ, Maheshwari DT, Bansal A, Misra K** (2013): Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.) leaves in vitro. Food Chem 141: 3443-3450.
- **Kumar R., Kumar G. P., Chaurasia O. P., Singh S. B.** 2011. Phytochemical and pharmacological profile of Sea buckthorn oil: a review. Res J Med Plant. 5: 491-499.

- **Kumaran A.** (2006). Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus Aromaticus*. *Food Chem.* 97(1):109–14.
- **Laurie Bergeron** (2015). L'ABC de l'argousier.
- **Lee, H. R. Cho, K. G. Lee,** (2012) *Food Engineering Progress* 16(2) :129-133.
- **Leskinen H. M., Suomela J.P., Yang B., Kallio H. P.** (2010). Regioisomer compositions of vaccenic and oleic acid containing triacylglycerols in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) pulp oils: influence of origin and weather conditions. *J Agric Food Chem.* 58: 537–545.
- **Li TSC, Beveridge THJ** (2003): Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): Production and utilization. National Research Council of Canada, Ottawa. pp. 101-106.
- **Li, H. Liu, IARC Scientific Publications 105** (1991): 568-570.
- **Li, T.S.C., Beveridge, T.H.J. and Drover, J.C.G.** (2007) Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chemistry*, 101(4), 1633-1639.
- **Lipowski J., Marszałek., Skapska., Jasineskau.**(2012).Charakterystyka owoców wybranych odmian rokitnika pospolitego (*Hippophae rhamnoides* L.) uprawianych w Polsce. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.* 56(7/8): 18–22.
- **Liszka, D. Najgebauer-Lejko, T. Grega.** (2014) *Proceedings of Żywność a Bezpieczeństwo Zdrowotne*, Kraków :54.
- **Lu, R.** (1992). Sea Buckthorn: A multipurpose plant species for fragile mountains. *Int. Centre for Integrated Mountain Development*, Katmandu, Nepal. 62 p.
- **Ma, Z., Cui, Y., & Feng, G.** (1989). Studies on the fruit character and biochemical compositions of some forms within Chinese sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* subsp. *Sine.*
- **Macheix, J.-J., Fleuriet, A. and Jay-Allemand, C.** (2005) Les composés phénoliques végétaux, un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*, Lausanne, pp. 192.
- **Manisha Kaushal et P C Sharma.** (2011). Propriété nutritionnelle et antimicrobienne de l'argousier (*Hippophae* sp.) huile de graines. *Journal of Scientific and Industrial Research*. Vol 70. 1033-1036.
- **Marszałek, J. Lipowski, S. Skapska.** (2014) *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny* 3:12-14.

- **Massagetov, P.S.** (1946) Alkaloids in plants of the family of Elaeagnaceae. Zhurnal Obshchei Khimii 16, 775-776.
- **Michel T, Destandau E, Le Floch G, Lucchesi ME, Elfakir C** (2012): Antimicrobial, antioxidant and phytochemical investigations of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaf, stem, root and seed. Food Chem 131: 754-760
- **Mpondo, M.E., Dibong, D., Flora, C., Priso, R. and Ngoye, A.** (2012). Les plantes à phénols utilisées par les populations. Journal of Animal & Plant Sciences, Vol.15, Issue 1:2083-2098.
- **Munkhbayar, J. Ariuntungalag, G. Delgersuuri, D. Badamkhand.** (2014). Technologie enzymatique pour l'extraction de l'huile d'argousier et son analyse biochimique. Mongolian Journal of chemistry, 15 (41), 62-65.
- **Myakushko, V.E., V.M. Kosenko, and A.S. Bedritskii.** (1986). *Hippophae rhamnoides* instands of gulley and ravine systems. Lesnoe Khozyaistvo 10: 30–34.
- **Nassiri-Asl M, Zamansoltani F, Abbasi E, Daneshi MM, Zangivand AA.** (2009). Effects of *Urtica dioica* extract on lipid profile in hypercholesterolemic rats. J Chin Integr Med. 7 : 428-433.
- **Niesteruk, H. Lewandowska, Ż. Golub, R. Świslocka, W.** (2013) Lewandowski, Kosmos 62(7): 571-581.
- **Pacholek, M. Sielicka, A. Doleba, M. Kaluźny, M. Błaszowska, M. Kołak,** (2014) , Zeszyty Nauko we Akademii Morskiej w Gdyni 86: 230-236
- **Pasich, B., Juszko-Jasinska, M., Palisch, M., Pilch, M. and Rompel, H.** (1984) Harmaline and Harman of *Hippophaë rhamnoides* L. from the industrial region of upper Silesia Herba Polonica, 30, 3-4.
- **Pilat B.** (2014). Owoce rokitnika (*Hippophae rhamnoides* L.) jako źródło substancji biologicznie czynnych. Praca doktorska. Olsztyn.
- **Pilat, R. Zadernowski,** (2015), Proceedings of Nutraceutyki w zdrowiu i chorobie. Chemoprewencyjne i kardioprotekcyjne właściwości warzyw, owoców i soków, Kraków.
- **Pirie, N. W.** (1986). Leaf proteins after forty years. Bioassay 5:174–175.
- **Pluta S.** (2014). Rokitnik-gatunek uprawiany w świecie i przyszłościowo w Polsce. Materiały z X Międzynarodowej Konferencji Sadowniczej pt. Aktualności w produkcji owoców jagodowych i pestkowych. Kraśnik 31.01–1.02.2014.

- **Püssa, R. Pällin, P. Raud sepp, R. Soidla, M. Rei,** (2008), *Food Chemistry* 107(2): 714-721.
- **Pytkowska, J.** (2008) *Arct, SÖFW-Journal Wydanie Polskie* 1(2): 24-37.
- **Raffo, A., Paoletti, F. and Antonelli, M.** (2004), Changes in sugar, organic acid, flavonol and carotenoid composition during ripening of berries of three sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) cultivars. *European Food Research and Technology*, 219(4), 360-368.
- **Redmile-Gordon, M. A., Armenise, E., White, R. P., Hirsch, P. R., & Goulding, K. W. T.** (2013). A comparison of two colorimetric assays, based upon Lowry and Bradford techniques, to estimate total protein in soil extracts. *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 166-173.
- **Rongsen, L.** (2005). Biochemical characteristics of sea buckthorn (*Hippophaë* L.). In *Sea buckthorn (Hippophaë L.): A Multipurpose Wonder Plant*, Vol. 2 (V. Singh, Editor –in-Chief, 2005), p. 98-107, Daya Publishing House, New Delhi, India.
- **Rösch, D., Bergmann, M., Knorr, D. and Kroh, L.W.** (2003) Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of sea buckthorn juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4233-4239.
- **Rösch, D., Mügge, C., Fogliano, V. and Kroh,L.W.**(2004) Antioxidant oligomeric pro anthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(22), 6712-6718.
- **Rousi, A ;** (1971). The genus *hippophae* L ; a taxonomic study. *Annals botanica Fennici* 8,177-227
- **Ruzin, A .,Visoly- Fisher, I., Cohen, S. R., & Cahen, D.** (2004). How polycrystalline devices can out perform single- crystal ones: thin film CdTe/CdS solar cells. *Advanced Materials*, 16(11), 879-883.
- **Sahreen S,** Khan M, Khan R. Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa Opaca* fruits. *Food Chem.* 2010;122(4):1205–11.
- **Schroeder, W.R.** (1988). Planting and establishment of shelterbelts in humid severe-winter regions. *Agr. Ecosystems Environ.* 22/23:441–463.
- **Schroeder, W.R.** (1990). Shelterbelt planting in the Canadian prairies, p. 35–43. In: *Protective plantation technology*. Publishing House of Northeast Forestry Univ., Harbin, China.

- **Schroeder, W.R., & Yao, Y.** (1995). Sea buckthorn: a promising multipurpose crop for Saskatchewan. Praire Farm Rehabilitation Administration, Agriculture and Agri-Food Canada. 10 p.
- **Schwartz, E. Frank, D. Gierhart, P. Simpson, R. Frumento.** (2016) Journal of Cosmetic Dermatology 25(4): 13-20.
- **Sharma A, shukla PK, Bhattacharyya A, Kumar U, Roy D, Yadav B, Prakash A.**(2018) efect of dietary suplimentation of sea buckthorn and Jgiloe leaf meal on the body weight gain, feed conversion ratio, biochemical attribeutes and meat composition of turkey poult, veterinary world, 11(1) : 93-98.
- **Sharma, U.K., Sharma, K., Sharma, N., Sharma, A., Singh, H.P. and Sinha, A.K.**(2007) Microwave-assisted efficient extraction of different parts of Hippophae rhamnoides forthe comparative evaluation of antioxidant activity and quantification of its phenolic constituents by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(2), 374-379.
- **Shyrko, T. S., Radzyuk, A. F.** (1989). Quality of sea buckthorn varieties in Byelorussian conditions., CAB Abstracts, 1992.
- **Singh, V., Moersel, Th.,** (2005). Development and commercialization of sea buckthorn: a German experience. In: Singh, V. (Ed.), Sea buckthorn (Hippophae L.): A Multipurpose Wonder Plant, vol. 2. Daya Publishing House, New Delhi, India, pp.576–584.
- **Skalijl.P.** (2007).Obliepicha. Wydawnictwo: Izdatelistwo Niola-PressXU M., S. SUN,CUiJ. 2001.The medicinal research on sea buckthorn. Proc. Int. Workshop Sea buckthorn.New Delhi, India. Feb. 18–21, 2001.
- **Sun, Z.** 1995. Exploitation and utilization of Sea Buckthorn (H. rhamnoides L.) in China. North West Univ. Publication, Shi An, China.
- **Suryakumar G., Gupta A.** (2011). Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.). J Ethnopharmac. 138: 268-278
- **Synge, P.M.** (1974). Dictionary of gardening:A practical and scientific encyclopaedia of horticulture. 2nd ed. Clarendon Press, Ox-ford.
- **Szaikiewicz, Zadernowskir.** (2006), Rokitnik, Możliwości produkcji i wykorzystania owoców.Hasło Ogrodnicze, 2: 60–63.
- **Terpou, A. I. Gialleli, L. A. Bosnea, M. Kanellaki, A. A. Koutinas, G. R.** (2016) , Castro, LWT-Food Science and Technology: 1-9.

- **The Angiosperm Phylogeny Group.** (2009), An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105-121.
- **Thomas Michel.** (2011). Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier ( *Hippophae rhamnoides*).
- **Tian, C., Nan, P., Chen, J. and Zhong, Y.** (2004) Volatile composition of Chinese *Hippophae rhamnoides* and its chemotaxonomic implications. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(4), 431-441.
- **Ting, H.-C., Hsu, Y.-W., Tsai, C.-F., Lu, F.-J., Chou, M.-C. and Chen, W.K.**(2011), The in vitro and in vivo antioxidant properties of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 125(2), 652-659.
- **Tkacz, Wojdylo, Turkiewicz, Bobak, & Nowicka.** (2019). Anty oxydant and anty enzymatic activities of sea buckthorn *hippophae rhamnoides* L. (fruits modulated by chemical components. *Antyoxydants*, 8(12) : 618.
- **Tolkachev, O., Abizov, E., Abizova, E. and Mal'tsev, S.** (2008), Phytochemical study of the bark of some plants of the Elaeagnaceae family as a natural source of  $\beta$ -carbolineindole alkaloids. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42(11), 630-632.
- **Tong, J., Zhang, C., Zhao, Z., Yang, Y., & Tian, K.** (1989). The determination of the physical-chemical constants and sixteen mineral elements in sea buckthorn raw juice. *Proceedings of international symposium on sea buckthorn (H. rhamnoides L.)*, Xian, China, Oct 19-23, 1989 (pp. 32-137).
- **Trease G, Evans** (1989). *W. Pharmacognosy*. 11th edn. Brailliar Tiridel Can. Ibadan: Macmillan publishers. Ltd : 10-5.
- **Upadhyay, N.K., Kumar, R., Mandotra, S.K., Meena, R.N., Siddiqui, M.S., Sawhney, R.C. and Gupta, A.**(2009). Safety and healing efficacy of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil on burn wounds in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1146-1153.
- **Valíček P, Havelka EV** (2008). *Hippophae rhamnoides* (in Czech). Start Benešov. ISBN 978-80-86231-44-0, 86 p.
- **Valíček P, Havelka EV** (2008). *Hippophae rhamnoides* (in Czech). Start Benešov. ISBN 978-80-86231-44-0, 86 p.

- **Wahlberg, K. and N. Jeppsson.** (1990). Development of cultivars and growing techniques for sea buckthorn, black choke-berry, *Lonicera*, and *Sorbus*. Sveriges Lantbruks universitet. Verksamhets berättelse Balsgaard (Sweden) 1990; 1988–1989:80–93.
- **Wang B., Lin L., Ni. Q., Su C. L.** (2011). *Hippophae rhamnoides* Linn. For treatment of diabetes mellitus: A review. *J Med Plants Res.* 5: 2599-2607.
- **Waterborg, GH** (2009). La méthode lowry pour la quantification des protéines. Dans le manuel de protocole protéique. Humana Pres, Totowa, New Jersey. 7-10.
- **Wilkowska, E. Pogorzelski, W. Ambroziak,** (2009), *Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny* 4 :7-8.
- **Yang B, Kallio H** (2002). Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophae*) lipids. *Trends Food Sci Tech* 13: 160-167.
- **Yang, A. Bonfigli, V. Pagani, T. Isohanni, Å. van Knorring, A. Jutila, V. P. Judin,** (2009). *Journal of Applied Cosmetology* 27(1): 13-25.
- **Yang, B.** (2009). Sugars, acids, ethyl  $\beta$ -D-glucopyranose and a methyl inositol in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) berries. *Food Chemistry*, 112(1), 89-97.
- **Yang, B. and Kallio, H.** (2002). Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophaë*) lipids. *Trends in Food Science & Technology*, 13(5), 160-167.
- **Yang, B., & Kallio, H.** (2002). Composition and physiological effects of Sea Buckthorn (*Hippophaë*) lipids. *Trends in Food Science and Technology*, 13 (5): 160-167.
- **Yang, B., Linko, A.-M., Adlercreutz, H. and Kallio, H.** (2006). Secoisolariciresinol and matairesinol of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* L.) berries of different subspecies and harvesting times. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8065-8070.
- **Yang, Z.-G., Li, H.-R., Wang, L.-Y., Li, Y.-H., Lu, S.-G., Wen, X.-F., Wang, J., Daikonya, A. and Kitanaka, S.** (2007). Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical-scavenging activities. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 55(1), 15-18.
- **Yasukawa, K., Kitanaka, S., Kawata, K. and Goto, K.** (2009). Anti-tumor promoters phenolics and triterpenoid from *Hippophae rhamnoides*. *Fitoterapia*, 80(3), 164-167.

- **Yi, H., Wu, L. and Jiang, L.** (2007). Genotoxicity of arsenic evaluated by Allium-root micronucleus assay. *Science of the Environment*, 383, P232-236.
- **Yogendra Kumar, R.J. Tirpude, D.T. Maheshwari, A. Bansal, K. Misra,** *Food Chemistry* **141** (2013) 3443-3450.
- **Zeb A** 2006: Anticarcinogenic potential of lipids from Hippophae – Evidence from the recent literature. *Asian Pac J Cancer P* 7: 32-34.
- **Zeb, A.** (2004). Chemical and nutritional constituents of sea buckthorn juice. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3 (2): 99–106.
- **Zheng, J., Kallio, H., Linderborg, K. and Yang, B.** (2011), Sugars, sugar alcohols, fruit acids, and ascorbic acid in wild Chinese sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides* ssp. *sinensis*) with special reference to influence of latitude and altitude. *Food Research International*, 44, 2018-2026.
- **Zhong, X. Zhang, R. Shu.** (1989), Proceeding of International Symposium on Sea buchthorn (*Hippophae rhamnoides*), Xian, China, Oct: 19-23.
- **Zu, Y., Li, C., Fu, Y. and Zhao, C.** (2006), Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetinka empferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(3): 714-719.