

Résumé

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la production des ERO et les capacités antioxydantes de la cellule. Le fer en excès peut être, l'un des mécanismes principaux lié à la genèse de radicaux libres et cause par la suite de très nombreux mécanismes pathologiques. Lorsque les ERO commencent à s'accumuler dans la cellule, elles peuvent être neutralisées par des molécules de défense dites antioxydantes, pour cela l'utilisation des molécules naturelles ayant un pouvoir antioxydant et des propriétés chélatrices de fer pourraient être une approche efficace pour la protection contre la toxicité induite par la surcharge en fer.

Dans cette approche, nous nous sommes attachés à l'évaluation des effets protecteurs de l'huile d'argane (*Argania Spinosa*) vis-à-vis la toxicité induite par la surcharge en fer in vivo sur les souris et in vitro sur *Tetrahymena pyriformis* et par l'hyperoxie in vitro sur les fibroblastes humains *MRC5*. Nous avons choisi cette huile, pour sa composition riche en antioxydants à savoir les polyphénols, les stérols et les tocophérols.

La caractérisation et l'évaluation de l'activité antioxydante ont montré que l'huile d'argane et d'olive contiennent les chlorophylles, les caroténoïdes et les polyphénols à des degrés divers. Ces molécules ont montré des propriétés antioxydantes et chélatrices du fer. Ces effets ont été confirmés par trois tests chimiques que nous avons effectué à savoir FRAP, DPPH et ABTS. D'autre part, nous avons déterminé les paramètres de stress oxydant, des dommages d'ADN, de l'inflammation et de la sénescence cellulaire in vivo sur les souris. Les résultats ont montré que les deux huiles ont modéré le stress oxydatif, les dommages d'ADN, l'inflammation et la sénescence cellulaire. Par ailleurs, l'évaluation de l'huile d'argane et d'olive in vitro sur *Tetrahymena pyriformis* contre la toxicité du fer et les fibroblastes humains *MRC5* contre le stress oxydatif induit par l'hyperoxie a montré que les deux huiles ont permis l'atténuation et la neutralisation du stress oxydatif. En plus, les deux huiles ont un effet réparateur des dommages d'ADN uniquement chez les fibroblastes humains *MRC5*.

L'ensemble des résultats obtenus dans la partie in vivo et in vitro ont permis de conclure que ces huiles ont des effets bénéfiques sur les dommages d'ADN, le stress oxydatif, l'inflammation et la sénescence cellulaire. Ces résultats nous permettent de conseiller la consommation de ces huiles.

Mots clés: huile d'argane, huile d'olive, antioxydants, acides gras, fer, foie, cerveau, reins, *Tetrahymena pyriformis*, *MRC5*, hyperoxie.

N° d'ordre

Habiba BOUCHAB

EVALUATION DES EFFETS PROTECTEURS DE L'HUILE D'ARGANE
CONTRE LR STRESS OXYDATIF IN VIVO ET IN VITRO

2022,
BSE



Université Hassan 1^{er}
Centre d'Études Doctorales en Sciences
et Techniques & Sciences Médicales



Faculté des Sciences et Techniques
Settat

THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention de grade de Docteur en Sciences Biologiques

Formation Doctorale: Biologie, Santé et Environnement

Spécialité: Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Sous le thème

Evaluation des effets protecteurs de l'huile d'argane contre le stress oxydatif *in vivo* et *in vitro*

Présentée par :

Habiba BOUCHAB

Soutenu le: 20/10/2022 à 10 heures

A la Faculté des Sciences et Techniques de Settat devant le jury composé de :

Pr. Maryam BENBACHIR HASSANI	PES	Université Hassan 1 ^{er} , FST Settat	Présidente
Pr. Said HILALI	PES	Université Hassan 1 ^{er} , FST Settat	Rapporteur
Pr. Hassan TAKI	PES	Université Hassan II, FS Ben M'Sick Casablanca	Rapporteur
Pr. Loubna AMAHDAR	PH	Université Hassan 1 ^{er} , ISSS Settat	Rapporteuse
Pr. Bouchra EL KHALFI	PES	Université Hassan II, FS Ain Chock Casablanca	Examinatrice
Pr. Riad EL KEBBAJ	PH	Université Hassan 1 ^{er} , ISSS Settat	Co-encadrant
Pr. Boubker NASSER	PES	Université Hassan 1 ^{er} , FST Settat	Directeur de thèse

Année Universitaire: 2021/2022

AVANT PROPOS

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé dans les laboratoires suivants :

- Laboratoire de Biochimie, Neurosciences, Ressources Naturelles et Environnement à la Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1^{er}, Settat, Maroc, sous la direction du Professeur **Boubker NASSER**.
- Laboratoire des Sciences et Technologies de la Santé à l'institut Supérieur des Sciences de la Santé, Université Hassan 1^{er}, Settat, Maroc, sous la direction du Professeur **Riad EL KEBBAJ**.
- Biosciences Institute, Newcastle University, Campus of Ageing and Vitality, Newcastle upon Tyne, United Kingdom sous la direction de Professeur **Gabriele Christine SARETZKI**.

Les travaux de cette thèse ont reçu le soutien financier du :

- Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur, de la Formation des Cadres et de la Recherche Scientifique (Maroc).
- Centre d'Etudes Doctorales de la Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1^{er}, Settat (Maroc).

DEDICACE

Je dédie ce travail

A mes chers parents

Aucune dédicace ne pourrait être à la hauteur de leurs sacrifices, leur soutien et leurs prières
tout au long de mes études

A mes frères

A mes nièces

Houda, Afnane et Nada

A mes belles-soeurs

A mes cousins

A mes cousines

A mes tantes

A mes oncles

A ma famille

A mes professeurs

A mes amis

REMERCIEMENTS

La thèse est un grand navire que l'on ne pilote jamais seul. J'aimerais remercier toutes les personnes qui m'ont accompagnées durant cette aventure jusqu'à l'arrivée saine et sauve au bord de la mer.

Je tiens à remercier,

Monsieur le Professeur **Boubker NASSER**, le commandant de bord du navire, qui sait diriger leurs unités aussi bien dans les eaux calmes que dans les hautes vagues, il m'a guidé, conseillé tout au long de ce voyage, Je tiens également à le remercier pour les valeurs qu'il m'a enseignées et le soutien qu'il m'a apporté jusqu'à l'aboutissement de ma thèse.

Monsieur le Professeur **Riad EL KEBBAJ**, co-directeur de thèse, qui fut pour moi un encadrant attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur. Je rends hommage à son honnêteté scientifique et morale. Je le remercie également pour les longues heures de travail sur ce manuscrit.

Madame **Gabriele Christine SARETZKI**, professeur à Biosciences Institute, Newcastle University, Campus of Ageing and Vitality, Newcastle upon Tyne, United Kingdom, pour m'avoir accueilli en stage dans son laboratoire et de m'avoir intégré dans son équipe. Je la remercie aussi pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de la période de stage. J'ai apprécié la liberté qu'il m'avait laissé dans l'orientation de ce travail. Je lui suis reconnaissante de son aide, sa rigueur scientifique et les longues heures de travail sur l'article.

Monsieur le Professeur **Abdelkhalid ESSAMADI**, directeur du Laboratoire de Biochimie, Neurosciences, Ressources Naturelles et Environnement (LBNRNE) à l'université Hassan 1^{er} (Settat-Maroc), pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Je vous remercie aussi pour les conseils et les échanges : vous avez toujours été ouverts à la discussion, un grand merci pour votre soutien. Vous m'avez beaucoup aidé administrativement afin de passer mon stage au Royaume-Uni à l'université de Newcastle. Je n'oublierais jamais votre conseil : « *Habiba, Accroches toi bien à Newcastle* ».

Monsieur **Ishaq ABBAS**, docteur à Biosciences Institute, Newcastle University, Campus of Ageing and Vitality, Newcastle upon Tyne, United Kingdom, pour ses assistantes techniques en immunofluorescence (sur les cellules en culture et sur les tissus).

Monsieur **Tangfei WAN**, docteur à Biosciences Institute, Newcastle University, Campus of Ageing and Vitality, Newcastle upon Tyne, United Kingdom, pour ses assistantes techniques en préparation des coupes histologiques et ses conseils.

Monsieur **Glyn NELSSON** pour la formation individuelle en microscopie en fluorescence.

Monsieur **El Mostafa KARYM**, docteur à la faculté des Sciences et Techniques, Settat, Maroc, son aide scientifique, son respect, sa confiance, ses orientations et surtout son amitié. Un grand merci pour les discussions que nous avons eu tout au long de la période du master et de doctorat au laboratoire de Biochimie, Neurosciences, Ressources Naturelles et Environnement.

Je voudrais également remercier tous les membres des trois laboratoires pour leur présence, leur aide, leur humeur et tous les moments passés ensemble aux labos, à l'animalerie, au café. J'ai beaucoup appris grâce à vous. Merci à vous tous. Une mention particulière à ma chère amie belge **Pauline**, je n'oublierai jamais les moments que nous avons passés au laboratoire de Biochimie, Neurosciences, Ressources Naturelles et Environnement ainsi qu'avec ma famille.

Je souhaite présenter mes remerciements aux membres du jury,

Professeur **Maryam HASSANI BENBACHIR**, à la faculté des Sciences et Techniques Settat, d'avoir bien voulu accepter d'être présidente du jury.

Professeur **Hassan TAKI**, à la faculté des Sciences Ben M'sik Casablanca, d'avoir bien voulu accepter de lire et évaluer ce travail.

Professeur **Loubna AMAHDAR**, à l'Institut Supérieur des Sciences de la Santé des sciences Settat, Maroc, d'avoir bien voulu accepter de lire et évaluer ce travail.

Professeur **Said HILALI**, à la faculté des Sciences et Techniques Settat, d'avoir bien voulu accepter de lire et évaluer ce travail.

Professeur **Bouchra EL KHALFI**, à la faculté des Sciences Ain Chock, Casablanca, d'avoir bien voulu accepter de lire et évaluer ce travail.

Professeur **NASSER Boubker** et Professeur **Riad EL KEBBAJ**, de m'avoir accueillis dans leurs équipes et d'avoir supervisés et encadrés ces travaux.

RESUME

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre la production des ERO et les capacités antioxydantes de la cellule. Le fer en excès peut être, l'un des mécanismes principaux lié à la genèse de radicaux libres et cause par la suite de très nombreux mécanismes pathologiques. Lorsque les ERO commencent à s'accumuler dans la cellule, elles peuvent être neutralisées par des molécules de défense dites antioxydantes, pour cela l'utilisation des molécules naturelles ayant un pouvoir antioxydant et des propriétés chélatrices de fer pourraient être une approche efficace pour la protection contre la toxicité induite par la surcharge en fer.

Dans cette approche, nous nous sommes attachés à l'évaluation des effets protecteurs de l'huile d'argane (*Argania Spinosa*) vis-à-vis la toxicité induite par la surcharge en fer *in vivo* sur les souris et *in vitro* sur *Tetrahymena pyriformis* et par l'hyperoxie *in vitro* sur les fibroblastes humains MRC5. Nous avons choisi cette huile, pour sa composition riche en antioxydants à savoir les polyphénols, les stéroïdes et les tocophérols.

La caractérisation et l'évaluation de l'activité antioxydante ont montré que l'huile d'argane et d'olive contiennent les chlorophylles, les caroténoïdes et les polyphénols à des degrés divers. Ces molécules ont montré des propriétés antioxydantes et chélatrices du fer. Ces effets ont été confirmés par trois tests chimiques que nous avons effectué à savoir FRAP, DPPH et ABTS. D'autre part, nous avons déterminé les paramètres de stress oxydant, des dommages d'ADN, de l'inflammation et de la sénescence cellulaire *in vivo* sur les souris. Les résultats ont montré que les deux huiles ont modéré le stress oxydatif, les dommages d'ADN, l'inflammation et la sénescence cellulaire. Par ailleurs, l'évaluation de l'huile d'argane et d'olive *in vitro* sur *Tetrahymena pyriformis* contre la toxicité du fer et les fibroblastes humains MRC5 contre le stress oxydatif induit par l'hyperoxie a montré que les deux huiles ont permis l'atténuation et la neutralisation du stress oxydatif. En plus, les deux huiles ont un effet réparateur des dommages d'ADN uniquement chez les fibroblastes humains MRC5.

L'ensemble des résultats obtenus dans la partie *in vivo* et *in vitro* ont permis de conclure que ces huiles ont des effets bénéfiques sur les dommages d'ADN, le stress oxydatif, l'inflammation et la sénescence cellulaire. Ces résultats nous permettent de conseiller la consommation de ces huiles.

Mots clés : *huile d'argane, huile d'olive, antioxydants, acides gras, fer, foie, cerveau, reins, Tetrahymena pyriformis, MRC5, hyperoxie.*

ABSTRACT

Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of oxygen reactive species and the antioxidant potential of the cell. Excess iron can be, one of the main mechanisms linked to the genesis of free radicals and subsequently causes several pathological mechanisms. When ROS begin to accumulate in the cell, so-called antioxidant defense molecules can neutralize them for this, the use of natural molecules with an antioxidant and iron-chelating properties could be an effective approach to protection against iron toxicity.

In this approach, we focused on the evaluation of the protective effects of argan oil (*Argania spinosa*) on iron-induced toxicity *in vivo* in mice and *in vitro* on *Tetrahymena pyriformis* and by hyperoxia *in vitro* on human fibroblasts MRC5. We rely on argan oil, to respond to our approach, because of its particular composition rich in polyphenols, sterols and tocopherols.

The characterization and evaluation of antioxidant activity has shown that argan and olive oil contain chlorophylls, carotenoids and polyphenols to varying degrees. These molecules promote antioxidant and chelating properties of iron. This effect is confirmed by three chemical tests that we have done: FRAP, DPPH and ABTS.

On the other hand, we determined the parameters of oxidative stress, DNA damage, inflammation and cell senescence *in vivo* in mice. The results showed that both oils moderated oxidative stress, DNA damage, inflammation and cell senescence. In addition, the evaluation of argan and olive oil *in vitro* on *Tetrahymena pyriformis* against iron overload and human fibroblasts MRC5 against oxidative stress induced by hyperoxia showed that both oils allowed the alleviation and neutralization of oxidative stress. In addition, both oils have a repairing effect of DNA damage only in MRC5 human fibroblasts.

All the results obtained *in vivo* and *in vitro* have led to the conclusion that these oils have beneficial effects on DNA damage, oxidative stress, inflammation and cell senescence. These results allow us to advise the consumption of these oils.

Keywords: *Argan oil, olive oil antioxidants, fatty acids, iron, liver, brain, kidney, Tetrahymena pyriformis, MRC5, hyperoxia.*

ملخص

التأكسد الاجهادي هو حالة عدم التوازن في نظام العوامل المؤكسدة والعوامل المضادة للتأكسد على مستوى الخلية
زيادة

نسبة الحديد الكبيرة يمكن ان تكون أحد الاليات الرئيسية المرتبطة بظهور الشوارد الحرة ويتسبب فيما بعد بظهور
العديد من الحالات المرضية عند تراكمها داخل الخلية.

ويمكن تحييدها بما يسمى بالجزئيات الدفاعية المضادة للأكسدة ومن أجل ذلك، يمكن أن يكون استخدام الجزئيات
الطبيعية ذات القدرة المضادة للأكسدة وخصائص تحمية الحديد نهجاً فعالاً للحماية من سمية الحديد.

وفي هذا النهج، ركزنا على تقييم التأثيرات الوقائية لزيت الأركان في الجسم الحي على الفار والتجارب المختبرية
على خلايا حقيقية النوى بعد السمية الناجمة عن الحديد زيادة على هذا قمنا بتجارب مختبرية على خلايا ليفية بشرية مشتقة
الرنوي بعد فرط التاكسج. من النسيج

وقد تم اختيار هذا الزيت لأن الكثير من الاهتمام أُعطي مؤخراً لزيت الأركان بفضل تركيبته الكيميائية الخاصة الغنية
بمضادات الاكسدة مثل البوليفينول الستيرول والتوكوفيرول

اظهر تقييم النشاط المضاد للأكسدة لزيت الارغان وزيت الزيتون يحتويان على الكلوروفيلات الكاروتينات
والبوليفينول بدرجات متفاوتة

ونشير نتائج التحليل الكيميائي النباتي إلى أن زيت الأركان يحتوي على أيضاات ثانوية ذات تأثير مضاد للأكسدة.
وتظهر النتائج أن زيت الأركان قادر على عكس التأثيرات الضارة للحديد: تحفيز الإجهاد التأكسدي على مستوى الأعضاء
الثلاثة للفار (الكبد والقلب والكلى) والكائنات أحادية الخلية، وتحفيز الالتهاب وتلف الحمض النووي. بينت هذه الدراسة ان
زيت الأركان قادر على التخفيض من تلف الحمض النووي بعد فرط الاكسدة عند الخلايا الليفية

الكلمات المفتاح: زيت الاركان، زيت الزيتون، مضادات الاكسدة، فرط التاكسج، الاحماض الدهنية، الحديد، الكبد،
الدماغ، الكلي.

TABLES DES MATIERES

AVANT PROPOS

DEDICACE

REMERCIEMENTS

RESUME

ABSTRACT

ملخص

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TRAVAUX SCIENTIFIQUES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE 1

BIBLIOGRAPHIE..... 4

I.	Huile d'argane	5
1.	Généralités sur l'arganier	5
1.1	Aspect historique de l'arganier	5
1.2	Répartition géographique	5
1.3	Aspect botanique.....	6
1.4	Importances et rôles de l'arganier	7
1.4.1	Intérêt écologique	8
1.4.2	Intérêt économique.....	8
2.	L'huile d'argane.....	8
2.1	Extraction de l'huile d'argane.....	9
2.2	Composition de l'huile d'argane.....	10
2.2.1	Fraction glycéridique	11
2.2.2	Fraction insaponifiable	12
2.3	Intérêts thérapeutiques.....	15
2.3.1	Prévention des maladies cardiovasculaires.....	15
2.3.2	Prévention contre le cancer	16
2.3.3	Prévention contre l'inflammation	16
2.3.4	Prévention contre le diabète	17
2.3.5	Prévention contre les maladies neurodégénératives.....	17
2.3.6	Dermocosmétique	18
2.3.7	Effet sur le métabolisme lipidique.....	19
2.3.8	Prévention contre le statut oxydant.....	19
II.	Stress oxydant	19
1.	Production des ERO.....	20
2.	Les propriétés des principaux ERO.....	21

2.1	Anion superoxyde.....	21
2.2	Radical hydroxyle.....	22
2.2.1	Réaction de Fenton.....	22
2.2.2	Réaction d'Haber Weiss.....	22
3.	Les conséquences du stress oxydant	22
3.1	La peroxydation lipidique	22
3.2	Oxydation des protéines	24
3.3	Domages de l'ADN.....	25
4.	Les défenses antioxydantes	26
4.1	Systèmes de défense enzymatiques.....	26
4.1.1	Superoxyde dismutase.....	26
4.1.2	Catalase.....	27
4.1.3	Glutathion peroxydase	27
4.2	Systèmes de défense non-enzymatiques	28
4.2.1	Glutathion.....	28
4.2.2	Acide ascorbique	28
4.2.3	Tocophérols	28
5.	Les voies de signalisation	29
III.	Fer	31
1.	Introduction	31
2.	Rôle biologique du fer.....	32
2.1	Les hémoprotéines	32
2.1.1	Les transporteurs d'oxygène	32
2.1.2	Activateurs d'oxygène moléculaire	33
2.1.3	Protéines de transport d'électrons.....	33
2.2	Les protéines fer-soufre	33
2.3	Les protéines non héminique et non fer-soufre.....	33
2.3.1	Enzymes mononucléaires à fer non héminique :	33
2.3.2	Enzymes dinucléaires à fer non héminique :.....	33
2.3.3	Protéines de stockage, du transport et du métabolisme du fer :.....	34
3.	Homéostasie du fer	34
3.1	Formes biologiques du fer alimentaire	34
3.2	Absorption intestinale et libération du fer.....	35
3.3	Absorption cellulaire du fer	36
3.4	Destination cellulaire du fer	37
3.5	Stockage cellulaire du fer	38
3.6	Libération cellulaire du fer	39

3.7	Recyclage du fer par le processus d'érythrophagocytose.....	39
4.	Chélateurs du fer.....	40
4.1	Déféroxamine	40
4.2	Défériprone	41
4.3	Déférasirox	41
5.	Toxicité du fer	41
5.1	Fer et stress oxydant	41
5.2	Fer et inflammation.....	42
5.3	Fer et sénescence cellulaire	43
6.	Pathologies liées à la surcharge en fer.....	43
6.1	Maladies hépatiques	43
6.2	Maladies neurodégénératives.....	44
6.3	Maladies rénales.....	44
	OBJECTIFS ET APPROCHES.....	46
	MATERIEL ET METHODES.....	49
I.	Matériels d'études	50
.1	Les huiles.....	50
1.1	Origine des huiles	50
1.2	Procédé de la production des huiles	50
1.2.1	Huile d'argane.....	50
1.2.2	Huile d'olive	51
1.3	Stockage des huiles	51
.2	Les souris.....	51
3.	Les lignées cellulaires	51
3.1	Tetrahymena pyriformis.....	51
3.2	Fibroblastes pulmonaires humains MRC5.....	51
II.	Etude des huiles	52
.1	Analyse des huiles.....	52
2.	Détermination de la teneur en pigments.....	53
3.	Extraction des polyphénols totaux.....	54
4.	Dosage des polyphénols.....	54
5.	Mesure de l'activité antioxydante des huiles	55
5.1	Test FRAP	55
5.2	Test DPPH	55
5.3	Test ABTS.....	55
III.	Traitements.....	56
1.	Etude <i>in vivo</i> sur les souris	56
1.1	Conditions d'élevage	56

1.2	Traitement.....	56
1.2.1	Préparation aqueuse de la solution du fer	56
1.2.2	Préparation de l'alimentation enrichie par les huiles	56
1.2.3	Conditions de traitement des souris	56
1.3	Sacrifice	57
1.4	Suivi durant le traitement	58
1.4.1	Suivi de la masse corporelle et la masse relative des organes.....	58
1.4.2	Etat général.....	58
1.5	Evaluation de stress oxydant.....	58
1.5.1	Préparation de l'homogénat.....	58
1.5.2	Evaluation du stress oxydant :.....	59
1.6	Evaluation de l'intégrité de l'ADN	62
1.6.1	Préparation des coupes histologiques.....	62
1.7	Evaluation de l'inflammation et du vieillissement	64
1.7.1	Extraction d'ARN.....	64
1.7.2	Dosage d'ARN	65
1.7.3	RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction.....	65
1.7.4	qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction.....	65
1.7.5	Evaluation de l'inflammation et de la sénescence cellulaire.....	66
2.	Etude <i>in vitro</i> sur le protozoaire <i>Tetrahymena pyriformis</i>	67
2.1	Culture cellulaire	67
2.2	Traitements	67
2.2.1	Traitement et détermination de l'IC50 du fer	67
2.2.2	Traitement par les huiles	68
2.2.3	Evaluation du stress oxydant.....	68
3.	Etude <i>in vitro</i> sur les fibroblastes pulmonaires humains MRC5	69
3.1	Culture cellulaire	69
3.2	Traitement.....	69
3.3	Evaluation de l'intégrité de l'ADN	69
3.3.1	Immunofluorescence.....	69
3.3.2	Comptage des foyers de dommages d'ADN	70
3.3.3	Mesure des peroxydes intracellulaires.....	70
3.3.4	Analyse morphologique.....	71
IV.	Analyse statistique	71
	RESULTATS.....	72
I.	Screening phytochimique de l'huile d'argane.....	73
1.	Chlorophylles et caroténoïdes	73
2.	Polyphénols.....	74

3.	Activité antioxydante des huiles	75
3.1	FRAP.....	76
3.2	DPPH.....	77
3.3	ABTS.....	77
II.	Etude <i>in vivo</i>	79
.1	Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'évolution de la masse corporelle des souris	79
.2	Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'évolution de la masse relative des organes des souris	80
3.	Evaluation de l'effet de fer et de l'huile d'argane au niveau du foie des souris.....	81
3.1	Evaluation de l'effet de fer et de l'huile d'argane sur le stress oxydant.....	81
3.1.1	Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'activité des enzymes de stress	82
3.1.2	Effet du fer et de l'huile d'argane sur les marqueurs du stress	83
3.2	Evaluation des dommages d'ADN (γ H2A.X)	84
3.3	Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'expression du marqueur du stress oxydatif mn SOD	86
3.4	Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'expression des marqueurs de l'inflammation COX-2, IL-6, TNF α et IL-1 β	87
3.5	Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'expression des marqueurs de la sénescence cellulaire.....	88
4.	Evaluation de l'effet du fer et de l'huile d'argane au niveau des reins des souris ...	90
4.1	Evaluation de l'effet de l'huile d'argane sur le stress oxydatif induit par le fer....	90
4.1.1	Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'activité des enzymes de stress oxydatif	90
4.1.2	Effet du fer et de l'huile d'argane sur les marqueurs du stress oxydatif	91
5.	Evaluation de l'effet du fer et de l'huile d'argane au niveau du cerveau des souris	93
5.1	Evaluation de l'effet de l'huile d'argane sur le stress oxydatif induit par le fer....	93
5.1.1	Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'activité des enzymes de stress oxydatif	93
5.1.2	Effet du fer et de l'huile d'argane sur les marqueurs du stress oxydatif	95
III.	Etude <i>in vitro</i> sur le protozoaire <i>Tetrahymena pyriformis</i>	100
1.	Caractérisation de la toxicité du fer	100
2.	Evaluation de l'effet de l'huile d'argane sur le stress oxydatif induit par le fer	101
2.1	Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'activité des enzymes de stress oxydatif	102
2.2	Effet du fer et de l'huile d'argane sur les marqueurs de stress oxydatif	102
IV.	Etude <i>in vitro</i> sur les fibroblastes embryonnaires humains MRC5	104
1.	Evaluation de l'intégrité de l'ADN chez les cellules MRC5 cultivées sous des conditions d'hyperoxie	104
2.	Evaluation de la morphologie cellulaire des MRC5 sous la microscopie à contraste de phase	106
3.	Effet de l'huile d'argane sur le piégeage des peroxydes intracellulaires.....	107

DISCUSSION.....	110
I. Caractérisation de l'huile d'argane	111
II. Evaluation de l'effet de l'huile d'argane <i>in vivo</i>	114
III. Evaluation de l'effet de l'huile d'argane <i>in vitro</i> chez <i>Tetrahymena pyriformis</i>	123
IV. Evaluation de l'effet de l'huile d'argane <i>in vitro</i> chez les fibroblastes humains MRC5 125	
CONCLUSION.....	128
PERSPECTIVES	132
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	134
WEBOGRAPHIE	173

**LISTE DES TRAVAUX
SCIENTIFIQUES**

Articles publiés et communications présentées à des Congrès Nationaux et Internationaux :

Articles :

Article 1

Habiba Bouchab, Abbas Ishaq, Riad El Kebbaj, Boubker Nasser, Gabriele Saretzki. Protective Effect of argane Oil on DNA Damage *in vivo* and *in vitro*. Biomarkers. April 2021 26 (5): 425-433.

Article 2

Habiba Bouchab, Riad El Kebbaj, Ilham Badreddine, Abdelkhalid Essamadi, Khadija Moustaid, Pierre Andreoletti, Mustapha Cherkaoui-Malki, Boubker Nasser. Protective and antioxidant effect of argane oil on oxidative stress induced by iron in *Tetrahymena pyriformis* (**article soumis**).

Article 3

Habiba Bouchab, Riad El Kebbaj, Abdelkhalid Essamadi, Pierre Andreoletti, Mustapha Cherkaoui-Malki, Boubker Nasser. Antioxidant effects of argane oil on iron induced oxidative stress in the liver, kidney and brain of mice (**article en cours de préparation**).

Autres articles:

Article 4

Anne Vejux, Dehbia Abed-Vieillard, Khadija Hajji, Amira Zarrouk, John J. Mackrill, Shuhbrima Ghosh, Thomas Nury, Aline Yammine, Mohamed Zaibi, Wafa Mihoubi, **Habiba Bouchab**, Boubker Nasser, Yaël Grosjean, Gérard Lizard. 7-ketocholesterol and 7 β -hydroxycholesterol: in vitro and animal models used to characterize their activities and to identify molecules preventing their toxicity. Biochemical Pharmacology. March 2020;173: 113648.

Article 5

Soukaina Essadek, **Habiba Bouchab**, Riad El Kebbaj, Catherine Gondcaille, Soufiane El Kamouni, Stéphane Savary, Joseph Vamecq, Abdelkhalid Essamadi, Mustapha Cherkaoui-Malki, Boubker Nasser, Pierre Andreoletti. Effects of a short-term LPS challenge on mouse brain and liver peroxisomal antioxidant and β -oxidative functions: protective action of argan oil. Pharmaceuticals. April 2022; 15(4):465.

Article 6

El Mostafa Karym, **Habiba Bouchab**, Abdelkhalid Essamadi, Gérard Lizard, Boubker Nasser. Protective and antioxidant effect of Cactus on oxidative stress induced by iron in *Tetrahymena pyriformis* (article en cours de correction).

Congrès internationaux**Communication orale 1**

Bouchab Habiba, Ishaq Abbas, El Kebbaj Riad, Nasser Boubker, Saretzki Gabriele. Antioxidant and anti-inflammatory effects of argane oil. Colloque international : L'arganier germera-t-il dans l'avenir ? L'arganeraie marocaine entre exploitation, valorisation et préservation. Le 21-22 Décembre 2021 à Université Internationale d'Agadir, UNIVERSIAPOLIS.

Communication orale 2

Bouchab Habiba, Ishaq Abbas, El Kebbaj Riad, Nasser Boubker, Saretzki Gabriele. The anti-DNA damage property of Argan oil *in vivo*. 6^{ème} édition du Congrès International de l'Arganier (CIA). Le 10-13 Mai 2022 à Agadir.

Communication affichée 1

Karym El-Mostafa, **Bouchab Habiba**, Badreddine Asma, Thomas Nury, Abdelkhalid Essamadi, Khadija Moustaid, Pierre Andreoletti, Mustapha Cherkaoui-Malki, Gérard Lizard, & Boubker Nasser. The Protective Effect of Opuntia Ficus Indica Seeds against the Cytotoxicity Induced by Iron Overload: Chemical Analyses and In Vitro Studies in the Protozoan Tetrahymena Pyriformis. NutRedOx COST Action CA16112 & Postgraduate Training Network "NutriOx". 27-29 September at University of Strasbourg (2017).

Communication affichée 2

Bouchab Habiba, Badreddine Ilham, Saih Fatimazahra, El Kebbaj Riad, Essamadi Abdelkhalid, Moustaid Khadija, Andreoletti Pierre, Cherkaoui-Malki Mustapha. Nasser Boubker. Protective effects of argane oil on oxidative stress induced by iron in *Tetrahymena pyriformis*. WGs Meeting of the NutRedOx COST Action CA16112. March 2-3 Belgrade (2020).

Congrès nationaux**Communication affichée 1**

Bouchab Habiba, Hilmi Soufiane, Elmaaiden Zouhra, El kebbaj Riad, Essamadi Abdelkhalid, Nasser Boubker. Evaluation de l'effet protecteur de l'huile d'argane sur la toxicité du fer chez les cellules de *Tetrahymena pyriformis*. 7^{ème} Congrès International de Toxicologie à Rabat. 11-13 Octobre au centre anti poison et de pharmacovigilance de Rabat (2018), Maroc.

Communication affichée 2

El Maaiden Ezzouhra, El Kharrassi Youssef, Moustaid Khadija, **Bouchab Habiba**, Essamadi Abdel Khalid, Nasser Boubker. Evaluation des effets protecteurs d'extraits de Ziziphus sur la toxicité induite par le fer chez *Tetrahymena pyriformis*. 7^{ème} Congrès International de Toxicologie à Rabat. 11-13 Octobre 2018 au centre anti poison et de pharmacovigilance de Rabat, Maroc.

Communication affichée 3

Bouchab Habiba, El Maaiden Zouhra, El Kebbaj Riad, Moustaid Khadija, Essamadi Abdelkhalid, Nasser Boubker. Evaluation de l'activité antioxydante de l'huile d'argane. La 2^{ème} journée internationale en génie des procédés au service du développement durable 2JGPS2D, 29-Novembre à la faculté des sciences et techniques de Settat (2018).

Communication affichée 4

Bouchab Habiba, El Kebbaj Riad, Essamadi Abdelkhalid, Moustaid Khadija, Nasser Boubker. Evaluation des caractéristiques physico-chimiques et de l'activité antioxydante de l'huile d'Argane de la région d'Agadir. 5^{ème} Edition du congrès international de l'arganier. 7-11 Décembre à Agadir (2019).

Communications orales**Communication orale 1**

El Maaiden Ezzouhra, El Kharrassi Youssef, Moustaid Khadija **Bouchab Habiba**, Essamadi Abdel Khalid, Boubker Nasser. Total phenolic content, radical scavenging activity and lipid peroxidation inhibition of the essential oil and various extracts from 25 Aromatic and Medicinal Plants. ICGB (1st International Congress of Green Biotechnology for Sustainable Agriculture). 1-3 November à la faculté polydisciplinaire de Taroudant (2018).

Communication orale 2

Bouchab Habiba, Ishaq Abbas, El Kebbaj Riad, Nasser Boubker, Saretzki Gabriele. Antioxidant and anti-inflammatory effects of argane oil. La 8^{ème} Edition de la Journée Doctorant. Jeudi 08 Juillet 2021 à la Faculté des Sciences et Techniques de Settat.

Communication orale 3

Bouchab Habiba, Essadek Soukaina, El Kebbaj Riad, Essamadi Abdelhalid, Nasser Boubker. Antioxidant effects of Argan oil on iron induced oxidative stress in the liver. Le 16 Juin 2022 à Université Hassan Premier, Faculté des Sciences et Techniques Settat.

Communication orale 4

Rabbaa Soufian, **Bouchab Habiba**, Nasser Boubker, Cherkaoui Malki Mustapha, Andreoletti Pierre, El Kebbaj Riad. Involvement of the peroxisome, inflammation and oxidative stress in the effects of natural products derived from Argan oil on food intake. Le 16 Juin 2022 à Université Hassan Premier, Faculté des Sciences et Techniques Settat.

Communication orale 5

Lalla Asmaa Katir Masnaoui, **Bouchab Habiba**, El Kebbaj Riad, Hadriya Fatine, Nasser Boubker, Essamadi Abdelhalid. Assessment of oxidative stress in pregnant women in Settat province. Le 16 Juin 2022 à Université Hassan Premier, Faculté des Sciences et Techniques Settat.

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Aire de la répartition de l'arganier au Maroc.	6
Figure 2: a: aspect général de l'arganier, b: fleur de l'arganier, c: fruit de l'arganier	7
Figure 3: Les différentes espèces réactives de l'oxygène.	21
Figure 4: Génération du radical hydroxyle par la réaction de Fenton et d'Haber Weiss.	22
Figure 5: Mécanismes en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés.	23
Figure 6: Quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés.	24
Figure 7: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire.	25
Figure 8: Les ERO et les systèmes de défense antioxydants.	29
Figure 9: Signalisation antioxydante du facteur lié à l'érythroïde nucléaire (Nrf2).	31
Figure 10: Caractéristiques chimiques du fer.	32
Figure 11: Absorption intestinale et libération du fer.	36
Figure 12: Absorption cellulaire du fer.	37
Figure 13: Destination du pool du fer labile.	37
Figure 14: Destination cellulaire du fer.	38
Figure 15: Libération du fer au niveau des hépatocytes et des macrophages.	39
Figure 16: Schéma général de l'extraction des polyphénols totaux et des antioxydants à partir de l'huile d'argane et d'olive.	54
Figure 17: Protocole expérimental du traitement des souris avec le fer et l'huile d'argane et d'olive.	57
Figure 18: La réaction de la peroxydation lipidique.	61
Figure 19: Mesure de la teneur en chlorophylles et caroténoïdes dans l'huile d'argane et d'olive.	74
Figure 20: Mesure de la teneur en polyphénols totaux dans l'huile d'argane et d'olive. L'acide gallique a été utilisé comme standard. La teneur en polyphénols a été représentée en mg d'équivalent d'acide gallique par kg de l'huile (GAE/kg d'huile). Les données représentent la moyenne \pm écartype de trois essais différents.	75
Figure 21: Mesure du pouvoir réducteur du fer par le test FRAP dans l'huile d'argane et d'olive.	76
Figure 22: Mesure de l'activité de piégeage des radicaux libres par le test DPPH dans l'huile d'argane et d'olive.	77
Figure 23: Mesure de l'activité de piégeage des radicaux libres par le test ABTS dans l'huile d'argane et d'olive.	78
Figure 24: Effet du fer associé ou non à l'huile d'argane et d'olive sur la variation de la masse corporelle des souris.	80
Figure 25: Effet du fer associé ou non à l'huile d'argane et d'olive sur la variation de la masse relative des organes des souris.	81
Figure 26: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes du foie des souris suite à la toxicité induite par le fer.	83
Figure 27: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes du foie de souris suite à la toxicité induite par le fer.	84
Figure 28: Mesure des dommages d'ADN au niveau du foie des souris.	85
Figure 29: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur l'expression relative des ARNm du marqueur du stress oxydatif mnSOD suite à la toxicité induite par le fer au niveau du foie des souris.	86
Figure 30: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur l'expression relative des ARNm des marqueurs de l'inflammation suite à la toxicité induite par le fer au niveau du foie des souris.	87
Figure 31: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur l'expression relative des ARN des marqueurs de la sénescence p16 et p21 suite à la toxicité induite par le fer au niveau du foie des souris.	89
Figure 32: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes des reins de souris suite à la toxicité induite par le fer au niveau des reins des souris.	91
Figure 33: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes des reins de souris suite à la toxicité induite par le fer.	92
Figure 34: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes de cerveau de souris suite à la toxicité induite par le fer au niveau de cerveau des souris.	94
Figure 35: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes de cerveau de souris suite à la toxicité induite par le fer au niveau de cerveau des souris.	95
Figure 36: Effet de l'huile d'argane et d'olive et du fer sur la croissance de <i>Tetrahymena pyriformis</i>	101
Figure 37: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes de <i>Tetrahymena pyriformis</i> suite à la toxicité induite par le fer.	102
Figure 38: Effet de l'huile d'argane et d'olive et du fer sur les capacités antioxydantes de <i>Tetrahymena pyriformis</i> suite à la toxicité induite par le fer.	103

Figure 39: Mesure des dommages d'ADN chez les fibroblastes humains cultivés sous les conditions d'hyperoxie. 105

Figure 40: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les fibroblastes humains cultivés sous des conditions d'hyperoxie. 106

Figure 41: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur le piégeage des peroxydes intracellulaires chez les fibroblastes humains cultivés sous les conditions d'hyperoxie. 107

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1: Classification botanique de l'arganier.</i>	7
<i>Tableau 2: Pourcentage d'acides gras dans l'huile d'argane.</i>	11
<i>Tableau 3: Pourcentage des triglycérides dans l'huile d'argane.</i>	12
<i>Tableau 4: Pourcentage des tocophérols dans l'huile d'argane et l'huile d'olive.</i>	13
<i>Tableau 5: Quantité de stérols en milligramme par 1Kg d'huile d'argane.</i>	14
<i>Tableau 6: Quantité des composés phénoliques en milligramme par 1 Kg d'huile d'argane. Le tableau représente une comparaison du pourcentage des composés phénoliques entre l'huile d'argane et l'huile d'olive. D'après (Issaoui & Delgado, 2019; Marfil et al., 2011).</i>	15
<i>Tableau 7: Valeurs de certains nutriments les plus courants comme source du fer.</i>	35
<i>Tableau 8: La composition de l'huile d'argane et l'huile d'olive en acides gras.</i>	52
<i>Tableau 9: Caractéristiques physicochimiques de l'huile d'argane et d'olive.</i>	53
<i>Tableau 10: Les conditions de traitement des souris en présence ou en absence du sulfate du fer avec une alimentation enrichie en huiles (huile d'argane ou d'olive).</i>	57
<i>Tableau 11: Le protocole de dosage des protéines selon la méthode de Lowry.</i>	59
<i>Tableau 12: Séquence du gène de référence utilisé dans la qPCR.</i>	66
<i>Tableau 13: Séquences des différentes amorces utilisées pour la qPCR.</i>	67
<i>Tableau 14: Tableau récapitulatif de l'effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes du foie, des reins et du cerveau chez les souris suite à la toxicité induite par le fer.</i>	98
<i>Tableau 15: Tableau récapitulatif de l'effet de l'huile d'argane et d'olive sur l'expression génique du marqueur du stress oxydatif (mnSOD), des marqueurs de l'inflammation (IL-6, COX-2, TNFα et IL-1β) et des marqueurs de la sénescence cellulaire (p16 et p21) au niveau du foie de souris suite à la toxicité induite par le fer.</i>	99

LISTE DES ABREVIATIONS

%/ Pourcentage.....	11
•OH: Radical hydroxyle.....	20
° C: Degrè celsius.....	65
µl: Microlitre.....	54
ADN: Acide désoxyribonucléique.....	30
AG: Acide gras.....	11
AGPI: Acide gras polyinsaturés.....	23
BSA: Sérum albumine bovine.....	59
CAT: Catalase.....	27
COX-2: Cyclooxygénase.....	66
Dcyt B: Duodenal cytochrome B.....	35
DHR 123: Dihydrorhodamine 123.....	70
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.....	69
DMT1: Divalent metal transporter.....	35
ERA: Espèces récatives de l'azote.....	19
ERO: Espèces récatives de l'oxygène.....	19
FPN: Ferroportine.....	35
g: Gramme.....	57
GPx: Glutathion peroxydase.....	26
GSH: Glutathion réduit.....	20
H ₂ O ₂ : Peroxyde d'hydrogène.....	19
HA: Huile d'argane.....	11
HCP1: Heme carrier protein 1.....	35
HDL: High Density Lipoprotein.....	19
HO: Huile d'olive.....	11
HO1: Hème oxygénase.....	35
IL-1β: Interleukin-1B.....	42
IL-6: Interleukin-6.....	42
LDL: Low Density Lipoprotein.....	17
LIP: Pool du fer labile.....	36
LPS: Lipopolysaccharide.....	16
mg: Milligramme.....	58
mmol: Millimoles.....	55
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.....	21
NF-κB: Facteur nucléaire KB.....	42
nm: Nanomètre.....	55
ODCO: Office du développement de la coopération.....	8
ROO• : Radical peroxyde.....	23
SOD: Superoxyde dismutase.....	20
SVF: Sérum de veau foetal.....	69
<i>T. pyriformis</i> : <i>Tetrahymena pyriformis</i>	51
Tf: Transferrine.....	36
TNFα: Facteur de nécrose tumorale.....	66
UNESCO: Organisation des Nations Unies de l'Education, de la Science et de la Culture.....	8
UV: Ultraviolets.....	17
XO: Xantine oxydase.....	21

INTRODUCTION GENERALE

L'alimentation figure parmi les facteurs susceptibles de jouer un rôle clé dans le développement ou la diminution du risque des maladies. L'huile d'argane est riche en acides gras mono et polyinsaturés et en antioxydants. Cette composition lui confère pour la santé humaine des propriétés bénéfiques se traduisant par des effets préventifs et antioxydants contre les dommages cellulaires. Dans ce contexte, beaucoup d'intérêts ont été donnés dernièrement à l'huile d'argane en raison de sa composition chimique particulière. L'huile d'argane est obtenue à partir d'*Argania Spinosa* qui appartient à la famille des Sapotacées. Elle contient des composés antioxydants tels que les tocophérols, les phytostérols (notamment schotténol et spinastérol) et les polyphénols. De plus, l'huile d'argane contient des concentrations voisines en acide linoléique (C18:2n-6) (35%) et en acide oléique (C18:1n-9) (45%), contrairement à l'huile d'olive qui est riche en acide oléique C18:1n-9 (75%) et contient seulement 6% de l'acide linoléique C18:2n-6, conduisant à un degré d'insaturation plus élevé de l'AO (120,4) contre l'OO (108,3). Les études récentes ont révélé des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, hépatoprotectrices, hypoglycémiantes et hypolipémiantes. Actuellement, l'intérêt pour l'huile d'argane et pour ses effets physiologiques s'est considérablement développé, ce qui a eu pour résultat, de faire passer le statut de cette huile d'un produit alimentaire diététique à celui d'un produit très connu pour ces qualités protectrices et antioxydantes.

Les réactions redox sont au cœur des processus fondamentaux de la vie car elles jouent un large éventail des processus biochimiques. Le maintien d'un équilibre cellulaire redox est réalisé par des facteurs tels que les antioxydants qui neutralisent les espèces réactives d'oxygène (ERO). Les ERO comme l'anion superoxyde, les radicaux hydroxyles et le peroxyde d'hydrogène se forment dans des cellules vivantes à la suite du métabolisme cellulaire normal. Les ERO au niveau physiologique sont considérées comme des signaux régulant divers processus physiologiques et jouant un rôle dans l'homéostasie et le maintien de la prolifération cellulaire. En revanche, à un niveau élevé, ils induisent le stress oxydatif entraînant des dommages oxydatifs.

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la production des espèces réactives de l'oxygène et les antioxydants. Le stress oxydatif reflète un déséquilibre entre la manifestation

systémique de la réactivité des espèces d'oxygène et la capacité d'un système biologique à neutraliser le corps des intermédiaires réactifs ou réparer les dommages.

Nombreux chélateurs du fer ont été synthétisés chimiquement pour traiter diverses maladies liées à la surcharge en fer. Cependant, des effets secondaires indésirables ont été observés pendant le traitement qui a incité les scientifiques à identifier de nouvelles molécules naturelles d'origine végétale avec une activité antioxydante et/ou chélatrice du fer sans effet secondaire. Les effets bénéfiques des antioxydants contre les effets délétères des ERO induits par le stress oxydatif ont été bien établis.

En outre, aucune étude sur l'effet protecteur de l'huile d'argane contre la toxicité du fer n'a été mise en évidence. Il est donc possible d'envisager une alimentation contrôlée ou fonctionnelle avec l'huile d'argane ou certains de ces composés afin de prévenir et/ou traiter certaines maladies liées à la surcharge du fer.

Le présent travail de thèse a consisté à évaluer l'efficacité d'une stratégie protectrice visant à utiliser l'huile d'argane et l'huile d'olive contre la toxicité du fer. Les travaux de thèse sont articulés selon quatre volets.

- La première partie a consisté à un screening phytochimique de l'huile d'argane et d'olive, la caractérisation des deux huiles et l'étude de leur activité antioxydante.
- La deuxième partie a consisté à étudier l'huile d'argane et d'olive *in vivo* sur les souris afin d'évaluer l'effet antioxydant, l'effet anti-dommages d'ADN, l'effet anti-inflammatoire ainsi que l'effet anti-sénescence des huiles contre la toxicité du fer.
- La troisième partie a consisté à étudier l'huile d'argane et d'olive *in vitro* sur le protozoaire *Tetrahymena pyriformis* afin d'évaluer leur effet antioxydant contre la toxicité du fer.
- La quatrième partie a consisté à étudier l'huile d'argane et d'olive *in vitro* sur les fibroblastes humains MRC5, afin d'évaluer leur effet antioxydant et anti-dommages d'ADN contre les conditions d'hyperoxie.

Le manuscrit de cette thèse est articulé essentiellement en 4 grandes parties :

Après une introduction, la première partie de ce manuscrit débute par Etude Bibliographique qui est débutée par un rappel bibliographique sous forme de synthèse de différentes études scientifiques concernant la composition de l'huile d'argane et ses vertus thérapeutiques. Ainsi qu'une présentation détaillée sur le stress oxydant et ses effets sur la santé

humaine. La fin de cette partie présente le métabolisme du fer et son rôle biologique ainsi que le mécanisme général de sa toxicité.

- Matériel et Méthodes décrivent les méthodologies utilisées pour les différentes études réalisées.
- Résultats obtenus dans les quatre chapitres (caractérisation de l'huile d'argane et d'olive, étude *in vivo* sur les souris, étude *in vitro* sur *Tetrahymena pyriformis* et les fibroblastes humains MRC5).
- Finalement, Discussion au regard des données expérimentales disponibles dans la littérature.

BIBLIOGRAPHIE

I. Huile d'argane

1. Généralités sur l'arganier

1.1 *Aspect historique de l'arganier*

L'histoire de l'arganier remonte à l'ère tertiaire, période où existait une connexion entre les îles Canaries et la côte marocaine. Il se répandra dans la plupart des régions marocaines. Cet arbre a été auparavant connu au Maroc car les Phéniciens à Essaouira ont au moins connu ou utilisé l'huile de l'arganier. Grâce aux 2 grands géographes arabes (Al-Bekri (XI^e siècle) et Chérif Al-Idrissi (XII^e siècle)) qui ont étudié la région du Maghreb, les premières données sur l'arganier ont été fournies. L'une des plus anciennes mentions de l'arganier et du mode d'obtention artisanal de l'huile est celle du médecin andalous Dya Aldin Ibn Al Baytar (XII^e siècle) dans son ouvrage « Traité des simples ». En 1838, Linné a baptisé l'arganier sous le nom de « *Sideroxylon spinosum* » (bois de fer) et le classa dans le genre *Sideroxylus* (Adlouni, 2010). En 2021, le 10 Mai a été proclamé par l'assemblée générale des Nations Unis Journée International de l'Arganier (Nations Unis, 2021).

1.2 *Répartition géographique*

L'arganier, *Argania spinosa* (L.) Skeels, est une espèce endémique du Maroc appartenant à la famille tropicale des Sapotacées (Guillaume et al., 2019). Il est très répandu, dans les zones arides et semi-arides au milieu du Maroc et couvre environ 870 000 hectares (ha), représentant maintenant environ 17% de la superficie forestière marocaine qui s'élève à vingt millions d'arbres, poussant essentiellement dans les provinces de : Taroudant, 360 000 ha ; Tiznit, 140 000 ha ; Essaouira, 130 000 ha ; Chtouka Ait-Baha, 90 000 ha ; Agadir, 37 000 ha ; Inzeguane-Ait Melloul, 13 000 ha. Plus précisément, l'arbre s'étend au long du littoral océanique, depuis l'embouchure de l'oued Tensift au nord, jusqu'à l'embouchure de l'oued Drâa au sud. L'arganier se développe aussi dans la plaine du Souss, sur le versant sud du Haut-Atlas occidental et sur les versants septentrionaux et méridionaux de l'Anti Atlas occidental jusqu'à des altitudes de 1 300-1 500 m). Il peut aussi croître dans des vallées du Grou supérieur au sud-est de Rabat et au nord-ouest des Béni-Snassen près d'Oujda (Figure 1) (Khallouki, 2017).

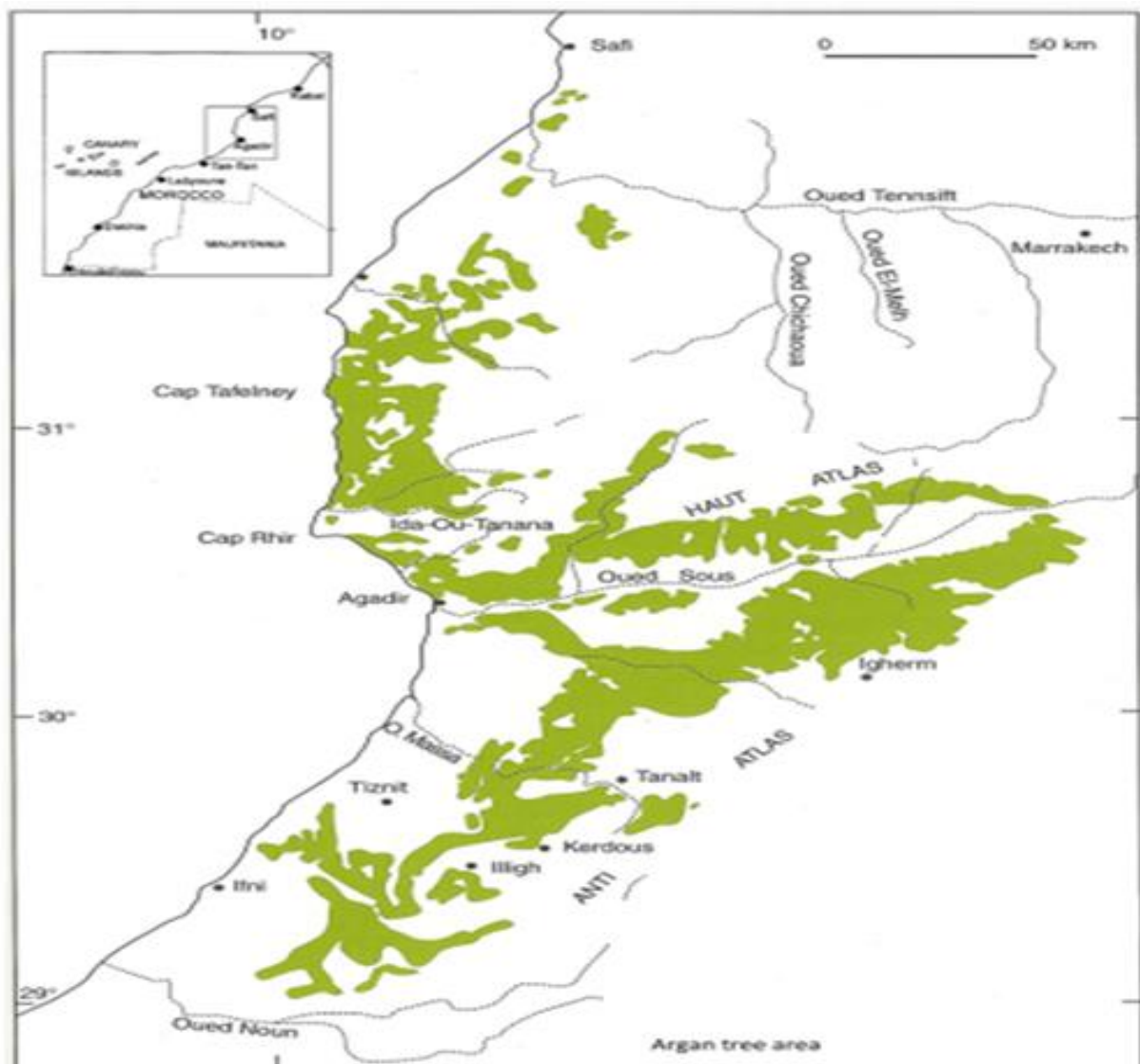


Figure 1: Aire de la répartition de l'arganier au Maroc.

D'après (Msanda, 2021)

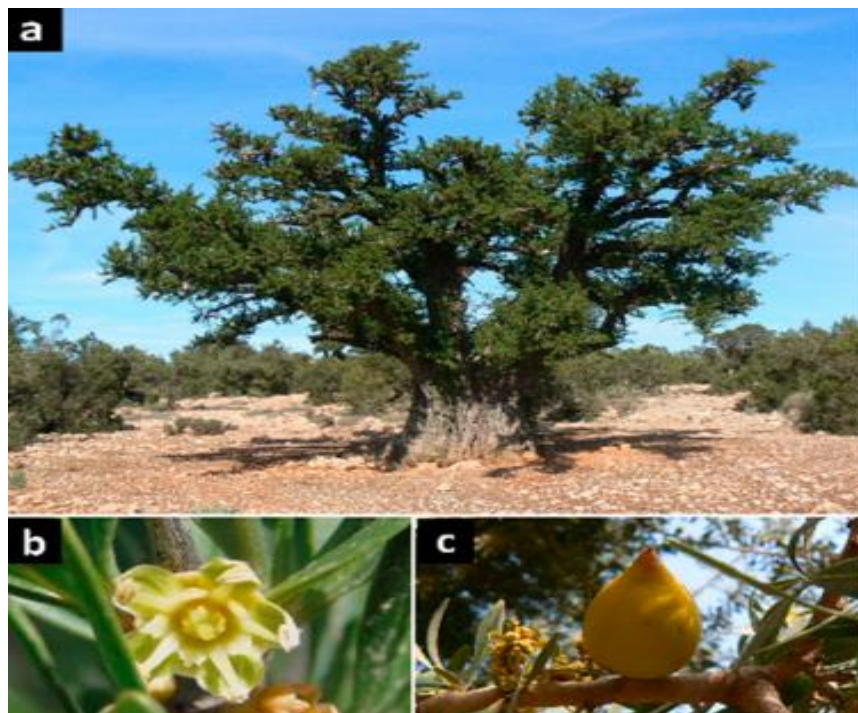
1.3 Aspect botanique

L'arganier [*Argania spinosa* (L.) Skeels (Sapotaceae)] est une espèce endémique du milieu du Maroc appartient au genre *Argania* et à l'espèce *Spinosa* (Tableau 1) (Abbassi et al., 2014). C'est un arbre de grande taille qui possède des rameaux épineux et des feuilles atténuées en un court pétiole. Les fleurs sont jaunâtres et réunies en glomérules (Figure 2). Le fruit est une fausse drupe. Les précipitations annuelles sont comprises entre 250 et 400 mm (bioclimats semi-arides) et entre 250 à 150 mm (bioclimats arides) (Msanda et al., 2005).

Tableau 1: Classification botanique de l'arganier.

D'après (Abbassi et al., 2014)

Nom	<i>Argania Spinosa L (Skeels)</i>
Embranchement	<i>Phanérogames</i>
Sous-Embranchement	<i>Angiospermes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Sous-Classe	<i>Gamopétales</i>
Ordre	<i>Ebénales</i>
Famille	<i>Sapotacées</i>
Genre	<i>Argania</i>
Espèce	<i>Spinosa</i>

**Figure 2: a: aspect général de l'arganier, b: fleur de l'arganier, c: fruit de l'arganier**

D'après (Mechqoq et al., 2021)

1.4 Importances et rôles de l'arganier

L'arganier est une espèce relique de l'âge tertiaire, est extrêmement bien adapté à la sécheresse et à d'autres conditions du milieu du Maroc. Néanmoins, dans des conditions aussi difficiles, les plantes sont très productives et vivant jusqu'à 200 ans (Taous et al., 2020). Grâce à son caractère écologique et socio-

économique, l'Organisation des Nations Unies de l'Éducation, de la Science et de Culture (UNESCO) a déclaré l'arganier comme espèce protégée en 2007 (Venegas et al., 2011).

1.4.1 Intérêt écologique

Les racines de l'arganier se développent en profondeur, aidant à prévenir l'érosion et la désertification du sol, en outre, les arbres ombrent différents types des cultures, et aider à maintenir la fertilité des sols. La flore qui cohabite avec elle est aussi importante. Les arbres adultes peuvent croître à des températures allant jusqu'à 50 °C, peuvent évoluer dans la plupart des types de sol, mais souffrent si le sol n'est pas bien drainé. Toutefois, l'arbre ne convient pas à des altitudes très élevées ou à une salinité élevée (Lucarini et al., 2020; Sebaa & Harche, 2014). Cent espèces de plantes poussant près de l'arganier ont été recensées. Par conséquent, la disparition de l'arganier entraîne inévitablement la disparition de nombreuses autres espèces, entraînant une réduction de l'héritage génétique de l'arbre lui-même ainsi que d'autres espèces animales et végétales (Khallouki, 2017).

1.4.2 Intérêt économique

L'arganier est d'un grand intérêt économique car c'est un arbre polyvalent. Chaque partie de l'arbre est utilisable et constitue une source de revenus ou de nourriture pour l'utilisateur : le bois est utilisé comme combustible, les feuilles et les fruits constituent un fourrage, et l'huile extraite de la graine est utilisée dans la nutrition humaine et la médecine traditionnelle (Lucarini et al., 2020). Environ 1,3 million de personnes vivent dans les zones rurales où les systèmes sylvopastoraux traditionnels sont basés sur l'arganier (Chakhchar et al., 2018).

2. L'huile d'argane

Sur le plan économique, la partie la plus rentable de l'arganier c'est son huile extraite à partir de fruits oléagineux. Récemment, le prix de l'huile d'argane a presque quadruplé pour atteindre plus de 300 dirhams pour un litre (30\$) sur les marchés locaux et plus de 3000 dirhams (300\$) par litre dans le marché d'exportation en plein essor (Msanda et al., 2021). Plusieurs études ont montré que d'ici 2027, ce marché enregistrera une croissance annuelle de 10,8% tonnes d'huile entièrement extraite par des femmes. En fait, selon l'office du développement de la coopération (ODCO) situé au Maroc, il y a plus de 400 coopératives d'huile d'argane, dont 93 ont été créés par des femmes et fournissent un revenu régulier pour plus que 7000 producteurs (Msanda et al., 2021). La production totale d'huile d'argane varie de 3000 à 4000

tonnes par an et représente au maximum 1,6% de l'huile alimentaire consommée au Maroc (Taous et al., 2020).

2.1 Extraction de l'huile d'argane

L'huile d'argane est extraite en plusieurs étapes. Avant l'extraction, les graines d'argane peuvent être torréfiées, fournissant une huile comestible avec une couleur dorée et une saveur de noix unique. Par ailleurs, lorsque les graines non torréfiées sont pressées pour en extraire l'huile cosmétique (Mechqoq et al., 2021).

La méthode d'extraction traditionnelle est réalisée avec un moulin à main. Brièvement, Les noix ont été cassées à l'aide de deux pierres, l'une sert comme marteau et l'autre comme support, séchés à l'air dans des récipients d'argile, les amandons sont torréfiés afin de réduire l'eau contenue des graines pour les presser. Pour ce type d'extraction, le processus de torréfaction est crucial. Les graines torréfiées sont broyées donnant une pâte brunâtre, mélangé avec de l'eau chaude pour plusieurs minutes. Ensuite, la pâte est pressée à la main, donnant une huile claire avec un goût de noisette. Cette technique a les inconvénients d'être très lente, en fait, elle dure 10h pour obtenir un litre d'huile avec un rendement d'extraction de 29% par rapport à la quantité initiale des fruits et un temps de stockage limité à quelques semaines (Khallouki et al., 2017; Mechqoq et al., 2021).

L'introduction de la presse mécanique à froid a amélioré le processus d'extraction de l'huile. Dans cette technique, la mouture et le malaxage traditionnel de l'huile sont remplacés par le pressage mécanique assurant une bonne conservation et une bonne reproductibilité (Charrouf, 2002). Dans ce processus, des machines appelées dépulpeuse-gratteuse assurent le dépulpage des fruits, les torréfacteurs à gaz assurent la torréfaction et des machines de presse assurent la pression de la pâte pour l'obtention de l'huile (Charrouf & Guillaume, 2008). Le désir d'obtenir une huile de haute qualité est une raison de l'utilisation de systèmes mécaniques. Comparativement à la méthode traditionnelle, les avantages de l'extraction mécanique de l'huile comprennent l'utilisation simple, la réalisation rapide du processus, la courte durée du processus, l'utilisation de petites quantités de matières premières et le faible coût (Cakaloglu et al., 2018). Finalement, 2 h sont nécessaires pour obtenir un litre d'une huile de haute qualité avec un rendement de 55% (Mechqoq et al., 2021).

L'huile d'argane peut également être obtenue par extraction au solvant. Les graines sont généralement extraites avec un solvant d'hydrocarbure apolaire, comme le cyclohexane, l'éther

de pétrole, le chloroforme ou le dichlorométhane, dans un dispositif d'extraction en acier inoxydable. L'extraction peut être effectuée à l'aide d'un appareil d'extraction au solvant assisté ou d'un simple extracteur soxhlet. La méthode d'extraction au solvant permet d'obtenir un rendement allant de 50 à 57 %, juste après un ou deux cycles d'extraction. En général, l'huile d'argane extraite avec ce procédé est exclusivement destinée à des usages cosmétiques (**Mechqoq et al., 2021**). Les avantages de l'extraction au solvant sont : un coût réduit, une utilisation simple de l'équipement, l'absence de filtration de l'huile obtenue et un rendement élevé. Cependant, les inconvénients sont la toxicité du solvant et l'application de la haute température (**Cakaloglu et al., 2018**).

La composition chimique des huiles extraites avec la méthode traditionnelle, presse mécanique et soxhlet a été comparée. En effet, les concentrations d'acides gras des échantillons des 3 méthodes d'extraction ont montré que les huiles étaient similaires avec des valeurs allant de 18 à 20 % d'acides gras saturés, 45 à 47 % des acides gras monoinsaturés et 32 à 35 % des acides gras polyinsaturés. Les huiles extraites par la méthode de Soxhlet ont montré une teneur en tocophérols élevée avec 1158,5 mg/kg contrairement à l'extraction par presse traditionnelle et mécanique avec des valeurs inférieures à 870 mg/kg. Par conséquent, l'huile extraite par la méthode de soxhlet était plus stable par rapport aux autres, en raison de la teneur plus élevée en antioxydants principalement les tocophérols et les phospholipides (**Haloui et al., 2015**).

2.2 Composition de l'huile d'argane

L'huile d'argane a une composition particulière, elle est caractérisée par des taux élevés d'acides linoléique et oléique. De plus, elle est riche en polyphénols et en tocophérols présentant une activité antioxydante. L'huile d'argane contient aussi d'autres composés mineurs tels que les caroténoïdes, les squalènes, les stérols et les xanthophylles. Ces composés pourraient contribuer à la valeur nutritionnelle de l'huile d'argane, à ses propriétés bénéfiques pour la santé, ainsi qu'à ses caractéristiques organoleptiques et diététiques et à sa conservation (**Cherki, 2006; Khallouki et al., 2003; Marfil et al., 2008**). La différenciation des huiles en fonction de leur composition ainsi que sur leurs activités antioxydantes est une tâche complexe puisque ces critères dépendent de plusieurs paramètres tels que conditions de croissance, origine géographique, conditions de stockage, processus de maturation, génotype d'arbre et niveau de maturité (**Guillaume et al., 2019**).

L'huile d'argane est constituée essentiellement de la fraction glycéridique (99%) et la fraction insaponifiable (1%) (**Guillaume et al., 2019**).

2.2.1 Fraction glycéridique

Cette fraction glycéridique saponifiable d'*Argania spinosa* est sous forme des triglycérides.

a. Acides gras

Les acides gras (AG) sont des acides carboxyliques à longues chaînes aliphatiques qui peuvent être linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé (Mohan et al., 2015). L'analyse des AG de l'huile d'argane montre une prédominance de 80% des acides gras insaturés (acide oléique et acide linoléique) qui ont la particularité d'être en proportions équilibrées dans l'huile d'argane par rapport à l'huile d'olive qui présente une dominance de l'acide oléique (76,89%) et linoléique (6,13%). Semblablement, les deux huiles montrent une modeste quantité des acides gras saturés (acides stéarique et palmitique) et monoinsaturés (acide palmitoléique) (Tableau 2) (Combe & Rossignol-Castera, 2010; El Kharrassi et al., 2018).

Tableau 2: Pourcentage d'acides gras dans l'huile d'argane.

Le tableau représente une comparaison du pourcentage des acides gras entre l'huile d'argane et l'huile d'olive. D'après (El Kebbaj et al., 2013; El Kharrassi et al., 2018).

Acide (%)	Huile d'argane	Huile d'olive
Palmitique (C16:0)	11,80	11,66
Palmitoléique (C16:1)	0,18	0,89
Stéarique (C18:0)	6	3,02
Oléique (C18:1 n-9)	45,90	76,89
Linoléique (C18:3 n-3)	34,10	6,13

b. Triglycérides

Ce sont des composés lipidiques formés d'une molécule de glycérol estérifiée par trois molécules d'acides gras pas toujours identiques (Combe & Rossignol-Castera, 2010). Cette fraction représente 99% de la totalité de l'huile. Les triglycérides les plus abondants dans l'HA et l'HO sont composés d'un acide linoléique et deux résidus oléiques (OOL). L'HA et l'HO contiennent 19,5% et 15,69% de ces triglycérides respectivement (Tableau 3). Par contre, POO sont les triglycérides les plus trouvés dans l'huile d'olive (19,66%). Les quatre autres triglycérides les plus abondants dans les deux huiles incluent au moins un résidu oléique dans

leur composition. Dans l'huile d'argane, ils sont composés de trois résidus oléiques (OOO), de deux résidus linoléiques et d'un résidu oléique (OLL), un résidu oléique, palmitique et linoléique (POL), deux résidus oléiques et un palmitique (OOP). Les triglycérides incorporant également un résidu oléique comprennent un acide saturé (palmitique ou stéarique) (Guillaume et al., 2019; Kiritsakis et al., 2002; Tsimidou et al., 2020).

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

Le tableau représente une comparaison du pourcentage des triglycérides entre l'huile d'argane et l'huile d'olive. D'après (Guillaume et al., 2019; Kiritsakis et al., 2002; Tsimidou et al., 2020).

Triglycérides	Huile d'argane	Huile d'olive
O,O,L	19,5	15,69
O,L,L	13,6	3,85
P,O,L	13,6	5,5
O,O,O	12,8	31,72
P,O,O	11,5	19,66
S,O,O	3,4	3,72
S,O,L	3,0	1,73

O : Oléique ; L : Linoléique ; P : Palmitique ; S : Stéarique.

2.2.2 Fraction insaponifiable

La fraction insaponifiable représente à peu près 1 % de l'huile d'argane. La fraction de cette huile contient les tocophérols, les stérols, les caroténoïdes et les phénols (Guillaume et al., 2019).

a. Tocophérols

Les tocophérols sont des antioxydants naturels, rencontrés dans les huiles végétales sous quatre formes (α , β , γ et δ) permettant une bonne conservation de l'huile (Adlouni, 2010). L'huile d'argane et l'huile d'olive contiennent principalement 3 formes de tocophérols (El Kharrassi et al., 2018). L' γ tocophérol et l' α tocophérol s'agissent des formes les plus abondantes dans l'HA (90%) et l'HO (88,%) respectivement (Tableau 4) (El Kharrassi et al.,

2018). L'huile d'argane contient 700 mg/kg de tocophérols totaux contre seulement 320 mg/kg dans l'huile d'olive.

Tableau 4: Pourcentage des tocophérols dans l'huile d'argane et l'huile d'olive.

Le tableau représente une comparaison du pourcentage des tocophérols entre l'huile d'argane et l'huile d'olive. d'après (El Kharrassi et al., 2018).

Tocophérols (%)	Huile d'argane	Huile d'olive
α -tocophérol (vitamine E)	5,86	88,01
β -tocophérol	0,12	7,57
γ -tocophérol	89,98	4,42

b. Stérols

Les stérols ou phytostérols, sont des alcools stéroïdes, membres de la famille des terpènes. Les phytostérols sont constitués d'un assemblage tétracyclique comprenant un groupement hydroxyle en position 3 du premier cycle et une chaîne latérale. Les phytostérols ont une structure chimique similaire au cholestérol (Verleyen, 2003).

La fraction stérolique est composée principalement de spinastérol, du schotténol et lupéol avec 64,40 ; 849 et 15,60 mg/Kg e l'huile respectivement. Ces trois composés ne sont pas détectés dans l'huile d'olive. Par ailleurs, l'huile d'argane contient 10 fois plus de β -amyryne comparativement à l'huile d'olive (Tableau 5) (Badreddine et al., 2017). Ces substances ont des propriétés thérapeutiques utilisées dans la protection dermatologique, la désinfection, la cicatrisation et la lutte contre l'inflammation. Elles sont aussi anti hyperglycémiques et hypotenseurs parmi d'autres effets physiologiques (Adlouni, 2010; Badreddine et al., 2017).

Tableau 5: Quantité de stérols en milligramme par 1Kg d'huile d'argane.

Le tableau représente une comparaison du taux des stérols entre l'huile d'argane et l'huile d'olive. D'après (Badreddine et al., 2017).

Stérols (mg/Kg)	Huile d'argane	Huile d'olive
Schotténol	849	ND
Spinastérol	64,40	ND
$\Delta 7$ avénastérol	85,80	12,30
Campestérol	ND	75,60
β -amyrine	211	20,10
Lupéol	15,60	ND
24-méthylènecholesterol	ND	10,90
$\Delta 5$ avénastérol	ND	203

c. Pigments caroténoïdes

Les caroténoïdes correspondent à des pigments ayant une activité antioxydante et présentant une couleur à l'huile d'argane (El Monfalouti et al., 2012). Les caroténoïdes et plus particulièrement le β -carotène sont des précurseurs de la vitamine A présents dans l'huile d'argane. (Rao & Rao, 2007). Aussi, ces pigments caroténoïdes (xanthophylles) contribuent à la coloration rougeâtre de l'huile d'argane (500 mg/kg) (Rahmani, 2005).

d. Composés phénoliques

La classe des phénols, présente dans l'huile d'argane, regroupe des composés phénoliques simples (Tableau 6) (Rueda et al., 2016). De manière générale, les phénols sont présents en faible quantité dans l'huile d'argane (792 mg/kg), comparativement à l'huile d'olive (983 mg/ kg) (Khallouki et al., 2003). L'huile d'argane montre une teneur très importante de trois principaux composés phénoliques (Acides vanillique, syringique et férulique) par rapport à l'huile d'olive. L'acide férulique est un antioxydant ayant plusieurs fonctions physiologiques (anti-inflammatoire, antioxydante, anticancéreuse et antidiabétique) (Zduńska et al., 2018). Le tyrosol constitue le composé phénolique le plus abondant dans l'huile d'olive avec 11,3 mg/kg contre 2,14 mg/kg dans l'huile d'argane (Issaoui & Delgado, 2019). En raison de leur nature chimique, ces composés ont des propriétés antioxydantes (Marfil et al., 2011)

Tableau 6: Quantité des composés phénoliques en milligramme par 1 Kg d'huile d'argane.

Le tableau représente une comparaison du pourcentage des composés phénoliques entre l'huile d'argane et l'huile d'olive. D'après (Issaoui & Delgado, 2019; Marfil et al., 2011).

Composés phénoliques (mg/Kg)	Huile d'argane	Huile d'olive
Acide vanillique	1,19	0,6
Acide syringique	3,05	0,2
Acide férulique	3,43	0,2
Tyrosol	2,14	11,3

2.3 Intérêts thérapeutiques

L'utilisation traditionnelle de l'huile d'argane est à l'origine culinaire, mais elle est utilisée en médecine traditionnelle à diverses fins (Lucarini et al., 2020). La qualité des acides gras contenus dans l'huile d'argane et l'abondance des composés antioxydants contenus dans la fraction insaponifiable, suggère une utilisation putative de cette huile dans la prévention nutritionnelle de certaines pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'inflammation et les maladies neurodégénératives (Khallouki et al., 2017).

2.3.1 Prévention des maladies cardiovasculaires

L'huile d'argane comme huile végétale comestible contenant les antioxydants et les acides gras insaturés peut être utilisée comme modèle d'investigation pour la prévention des maladies cardiovasculaires. Le rôle biologique de l'HA a été confirmé dans diverses études sur l'homme et le rat. En effet, l'analyse chimique de l'HA a montré une teneur en antioxydants (les polyphénols, les stérols, les caroténoïdes et les tocophérols) et en acides gras insaturés (acide linoléique et acide oléique) (El Kharrassi et al., 2018). Dans le monde, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de décès. L'huile d'argane pourrait être utilisée dans la prévention des maladies cardiovasculaires en agissant sur les principaux facteurs de l'apparition des maladies cardiovasculaires tels que la glycémie, l'hyperlipémie et l'hypertension artérielle (Derouiche et al., 2013; Haimeur et al., 2013; Berrougui et al., 2004). En effet, la consommation de l'huile d'argane est capable de réduire les taux de cholestérol LDL et des triglycérides (Haimeur et al., 2019). Parallèlement, l'HA augmente le taux cholestérol HDL plasmatique (Haimeur et al., 2013; Ould Mohamedou et al., 2011). De

plus, les antioxydants contenus dans l'HA, tels que les stérols, peuvent être impliqués dans son effet hypocholestérolémiant. En effet, la structure de ces composés est similaire au cholestérol humain et par conséquent, l'apport en stérols réduit l'absorption du cholestérol (**Ostlund et al., 2002**). L'ensemble de ces données renforcent et confirment l'effet protecteur de l'huile d'argane des maladies cardiovasculaires.

2.3.2 Prévention contre le cancer

L'apport nutritionnel a une grande influence sur certains types de cancers (**Bennani et al., 2007**). Plusieurs auteurs ont montré que les composés mineurs de l'huile d'argane à citer les stérols (spécifiquement le schotténol et le spinastérol), les polyphénols et les tocophérols possèdent des effets antiprolifératifs sur les cellules cancéreuses humaines (le sein, l'ovaire, le côlon et le foie) (**Bennani et al., 2007; Jeon et al., 2005; Drissi et al., 2004**). Cependant, aucune étude approfondie sur l'effet protecteur de l'huile d'argane contre le cancer n'a été réalisée pour avoir une idée exhaustive sur le mécanisme préventif et/ou thérapeutique de l'huile d'argane. En conclusion, l'étude de l'effet de l'huile d'argane sur le cancer de la prostate (**Bennani et al., 2009**) a permis de démontrer les effets cytotoxiques, antiprolifératifs et pro-apoptotiques de nombreux composés de cette huile. Ces résultats confirment par ailleurs l'usage de l'huile d'argane en médecine traditionnelle marocaine pour soigner les maladies de prostate.

2.3.3 Prévention contre l'inflammation

L'huile d'argane peut moduler les réponses immunitaires grâce à sa composition particulière riche en acides gras et en antioxydants naturels. Les acides gras contenus dans l'HA influencent la production des cytokines. En effet, elle diminue les niveaux d'expression des gènes marqueurs de l'inflammation (IL-6 et TNF α) au niveau du foie des souris prétraitées par le lipopolysaccharide (LPS) (**El Kamouni et al., 2017; El Kebbaj, 2012**). Cet effet protecteur pourrait être lié à l'expression et l'activation du PPAR α par des acides gras polyinsaturés (**El Kebbaj et al., 2015**) ainsi que l'inhibition de NF-kB (**Desvergne et Wahli, 1999**) qui est suivi de l'inhibition de plusieurs processus inflammatoires (**Poynter and Daynes, 1998**). Par ailleurs, les tocophérols peuvent aussi avoir une activité anti-inflammatoire (**Lucarini et al., 2020**). En effet, l'application topique du dérivé de γ tocophérol (γ -TDMG : γ -tocopherol-N, N-dimethylglycinate hydrochloride) peut être efficace pour prévenir et réduire l'inflammation

induite par les ultraviolets (UV) chez les humains (Yoshida et al., 2006). Cela confirme l'effet anti-inflammatoire de l'HA (Lin et al., 2017; Vamecq et al., 2018).

2.3.4 Prévention contre le diabète

D'après la littérature, la consommation de l'huile d'argane peut avoir un potentiel antidiabétique (Barkaoui et al., 2017; Bouyahya et al., 2021; Mechqoq et al., 2021). Au Maroc, quatre études ont étudié l'effet antidiabétique *in vivo* d'*Argania spinosa* (Bellahcen et al., 2013, 2012; Berrougui et al., 2003; Bnouham et al., 2008). L'huile d'argane a montré un effet antidiabétique puissant sur des rats diabétiques par sa capacité à prévenir la perte de masse corporelle et à induire une réduction significative du glucose dans le sang ainsi qu'une augmentation significative du niveau de glycogène hépatique (Bellahcen et al., 2012). En utilisant des rats diabétiques, une étude a révélé que cette huile a induit une amélioration significative de la masse corporelle et une réduction de la glycémie et de la quantité de glucose absorbée (Bnouham et al., 2008). Dans une autre étude, il a été montré que l'huile d'argane diminuait le glucose plasmatique en augmentant significativement le taux de glucose hépatique (Bellahcen et al., 2013). Un autre mécanisme de l'effet antidiabétique de l'huile d'argane a été étudié en utilisant des rats obèses-hyperglycémiques-hyperlipidémiques. Les auteurs ont conclu que cet effet était associé à une réduction significative des lipoprotéines sanguines, du cholestérol total, des lipoprotéines (LDL), des triglycérides et de la masse corporelle (Berrougui et al., 2003).

2.3.5 Prévention contre les maladies neurodégénératives

Actuellement, en ce qui concerne le développement de maladies neurodégénératives (notamment Alzheimer et démence), des effets bénéfiques et néfastes ont été attribués aux oméga-3 et aux acides gras trans, respectivement (Canhada et al., 2018; Zarrouk et al., 2015). Les polyphénols semblent prometteurs pour lutter contre la neurodégénérescence liée au vieillissement (Di Meo et al., 2020). Il est également supposé que l'apport alimentaire de phytostérols pourrait être bénéfique pour prévenir la maladie d'Alzheimer (Shuang et al., 2016). En outre, la vitamine E et ses composants actifs tocophérols ont été signalés pour influencer différents mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer, par exemple, agrégation β -amyloïde (A β), neurotoxicité, stress oxydatif, et les processus inflammatoires (ELMostafi et al., 2020). Par conséquent, la consommation régulière d'une huile contenant les acides gras, les phytostérols, les polyphénols et les tocophérols, qui peuvent passer la barrière hémato-encéphalique pourrait contribuer à prévenir la neurodégénérescence.

De nombreux composés présents dans l'HA, y compris les phytostérols, les polyphénols et les tocophérols sont en mesure de prévenir les dysfonctionnements des cellules nerveuses qui entraîne une neurodégénérescence (Cilla et al., 2017). En plus, l'HA est capable d'induire la prolifération des peroxyosomes, par conséquent, il peut être utilisé comme traitement pour les patients atteints d'adrénoleucodystrophie pseudo-néonatale (El Kebbaj et al., 2013). Comme les études *in vitro* sont insuffisantes pour proposer une hypothèse appropriée, il est nécessaire d'effectuer des études *in vivo* pour la compréhension du mécanisme d'action de l'HA dans un système nerveux complet.

2.3.6 Dermocosmétique

Les huiles sont une source riche en acides gras, surtout en acides gras insaturés, et ils sont une matière première cosmétique importante. En raison de leurs propriétés d'huilage, adoucissantes, lissantes et hydratantes. Elles sont incluses dans le groupe émollient. Récemment, les huiles vierges sont les plus populaires. Ils ont la même teneur que les graines de plantes oléagineuses. Les recettes des produits de soins doivent inclure des huiles végétales à haute teneur en acides : linoléique et linoléique car ils diminuent l'apparence des points noirs (Goik et al., 2019). L'huile d'argane est utilisée comme huile cosmétique ou comme composant de la dermocosmétique. L'huile d'argane enrichie avec des additifs antioxydants a plus de potentiel cosmétique (Guillaume & Charrouf, 2011). De nombreux cosmétiques et détergents pour la peau, trouvés sur le marché, peuvent être à base d'huile d'argane (Burlando et al., 2010). Par conséquent, elle est utilisée dans les soins de la peau, les soins du visage, le massage, pour froter les ongles, pour le soin des cheveux (Delsin & Maia Campos, 2015), l'huilage et pour protéger les cheveux (Ainane et al., 2016 ; Faria et al., 2013). Après 60 jours de consommation et/ou d'application de l'huile d'argane par les femmes après la ménopause, une augmentation de l'élasticité cutanée est observée (Boucetta et al., 2015). L'huile d'argane est indiquée dans la prévention de la déshydratation de la peau et traitement des rides, elle peut également protéger la peau contre les rayonnements UV-B et peut être utilisée dans le traitement des boutons de peau et de la varicelle. L'huile d'argane est utilisée depuis des siècles au Maroc comme huile cosmétique pour maintenir un teint clair parce qu'il a un effet inhibiteur sur la biosynthèse de mélanine, qui peut être attribuée à l'action des tocophérols. Grâce à cela, elle peut être utilisée contre les troubles d'hyperpigmentation (Goik et al., 2019 ; Villareal et al., 2013).

2.3.7 Effet sur le métabolisme lipidique

Les acides gras polyinsaturés peuvent être des activateurs de PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), un récepteur nucléaire qui gère le métabolisme des lipides et l'oxydation des acides gras (Desvergne & Wahli, 1999). La dysrégulation du métabolisme lipidique est révélée par l'augmentation des triglycérides et des acides gras libres dans le plasma et la réduction des lipoprotéines sérique de haute densité (HDL sérique) (Khovidhunkit et al., 2004). En effet, l'huile d'argane présente une prédominance des acides gras polyinsaturés (35% d'acide linoléique) (Kebbaj et al., 2013). En effet, il a été bien démontré que l'acide linoléique abaisse le taux du cholestérol sanguin et de cholestérol LDL (Calder, 2015). Il a été démontré que l'HA augmente l'expression de l'ARNm de PPAR α chez des souris alimentées par l'huile d'argane (El Kebbaj et al., 2015). En revanche un régime enrichi en huile d'argane empêche l'effet hyperlipidémique associé à LPS par l'induction d'expressions des récepteurs nucléaires hépatiques, PPAR α , Récepteur relié aux œstrogènes (ERR) α et leur coactivateur PPAR γ et PGC-1 α avec une régulation ascendante de leurs gènes cibles mitochondriaux et peroxysomaux impliqués dans la FAOx (Vamecq et al., 2018). Cela montre l'effet bénéfique de l'huile d'argane sur le métabolisme lipidique.

2.3.8 Prévention contre le statut oxydant

En plus de la fraction saponifiable, l'huile d'argane contient une fraction insaponifiable riche en composés mineurs à savoir les tocophérols, les phytostérols (schotténol et spinastérol) et les polyphénols (Badreddine et al., 2020 ; El Kharrassi et al., 2018). Ces composés possèdent une activité antioxydante (Badreddine et al., 2020). Cet effet antioxydant a été démontré par plusieurs études. En effet, l'HA est capable de normaliser l'activité enzymatique des enzymes de stress et des marqueurs de stress oxydant après attaque radicalaire par des agents stressants à savoir le LPS et le H₂O₂ (Cadi et al., 2013; El Kamouni et al., 2017). Cela montre l'effet bénéfique de l'huile d'argane contre le stress oxydant.

II. Stress oxydant

Le stress oxydatif décrit un état dans lequel le corps réagit à divers stimulus nuisibles et produit des quantités excessives des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERA). Le stress oxydatif reflète un déséquilibre entre la manifestation systémique de la réactivité des espèces d'oxygène et la capacité d'un système biologique à détoxifier le corps des intermédiaires réactifs ou réparer les dommages. Cela conduit à

l'accumulation des ERO et des ERA dans les cellules, causant la toxicité cellulaire et finalement menant aux lésions tissulaires (**Duan et al., 2016**). Les ERO sont produites principalement par la chaîne de transport d'électrons mitochondriale pendant les processus métaboliques normaux, défini comme les ERO mitochondriales. La formation des ERO dans la mitochondrie provient du transport d'un électron d'un donneur redox à l'oxygène moléculaire (O_2) (**Zhang et al., 2020**).

1. Production des ERO

Dans l'organisme, les ERO sont produites soit par voie enzymatique ou non enzymatique (**Gandhi & Abramov, 2012**). La NADPH oxydase et la xanthine oxydase constituent les principales enzymes de la production des ERO. Toutefois, la source principale se situe dans la mitochondrie au niveau de la chaîne respiratoire. La grande partie de l'oxygène que nous respirons subit une réduction par le cytochrome oxydase, présents dans le complexe IV de la chaîne de transport des électrons située dans la membrane interne mitochondriale. Toutefois, cette chaîne de transport peut laisser fuir une certaine proportion d'électrons qui vont réduire l'oxygène, conduisant à la formation du radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (**Gardès-Albert et al., 2003**). Ce radical est éliminé par des enzymes appelées superoxyde dismutase (SOD) qui catalysent sa disparition par dismutation. L'eau oxygénée (ou peroxyde d'hydrogène, H_2O_2) ainsi formée est régulée par des enzymes telles que la catalase (présente dans les peroxysomes) et la glutathion peroxydase (essentiellement localisées dans le cytosol). La catalase accélère la réaction de dismutation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau, tandis que la glutathion peroxydase accélère la réaction d'oxydation du glutathion (GSH) par l'eau oxygénée. La majeure partie de la toxicité de l'eau oxygénée provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle $\cdot OH$ en présence de cations métalliques tels que Fe^{2+} , au cours de la réaction dite de Fenton (**Pisoschi & Pop, 2015**). Le radical hydroxyle est particulièrement délétère vis-à-vis des matériaux biologiques. D'un point de vue formel, la réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner successivement sur O_2 , en conduisant aux intermédiaires respectifs $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et $\cdot OH$. Ces intermédiaires sont appelés ERO ou encore espèces activées de l'oxygène, car ils ont une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui leur a donné naissance (**Figure 3**) (**Gardès-Albert et al., 2003; Kowaltowski et al., 2009**).

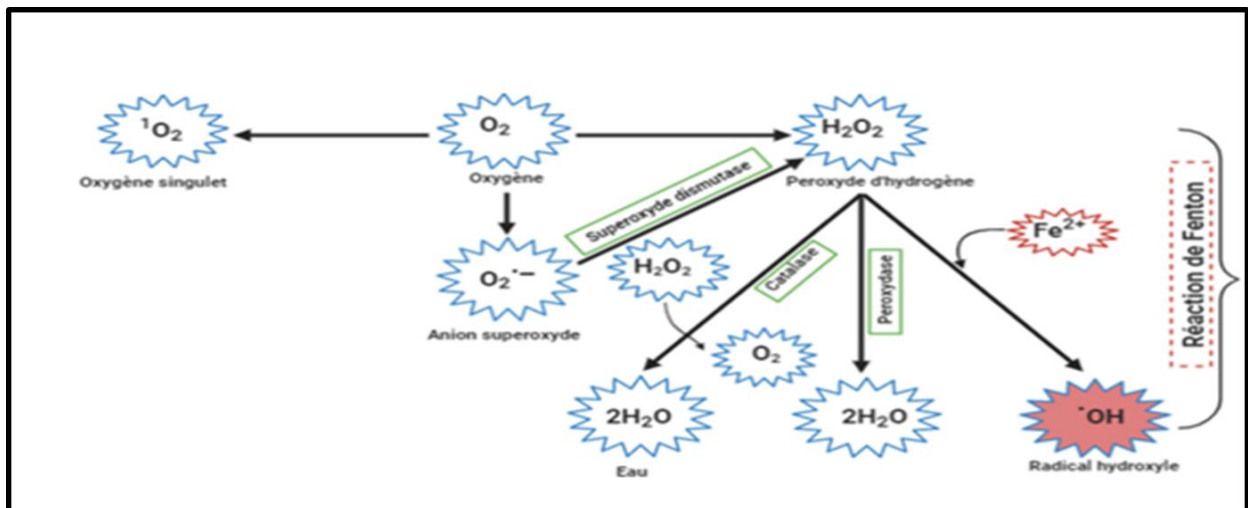


Figure 3: Les différentes espèces réactives de l'oxygène.

2. Les propriétés des principaux ERO

Les radicaux libres sont des molécules qui contiennent au moins un électron de valence non apparié, ce qui les rend hautement réactives et de courte durée. Parmi tous les radicaux libres, l'hydroxyle radical ($\cdot OH$), et l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) sont les exemples les plus connus. Ils dérivent de l'oxygène moléculaire dans des conditions réductrices; toutefois, en raison de leur réactivité, ces radicaux libres peuvent avoir un effet délétère sur les fonctions cellulaires normales lorsqu'ils sont présents en concentrations élevées (Ahmad et al., 2017).

2.1 Anion superoxyde

La réduction univalente de l'oxygène entraîne la formation de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cette réaction peut se produire dans la chaîne de transport des électrons mitochondriaux. D'un autre côté, les enzymes telles que les oxydes de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et la xanthine oxydase (XO) peuvent également agir comme médiateur de cette réaction. Ces anions de superoxyde peuvent alors être convertis en espèces non radicales, en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène pur (1O_2), avec des enzymes oxydatives comme la superoxyde dismutase (SOD) (Ahmad et al., 2017).

2.2 Radical hydroxyle

Le radical hydroxyle peut être généré par deux principales réactions :

2.2.1 Réaction de Fenton

L'interaction entre le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les métaux de transition réduits comme le cuivre et le fer entraîne une réaction de Fenton, qui conduit à la formation du radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$) (Figure 4) (Ahmad et al., 2017).

2.2.2 Réaction d'Haber Weiss

La réaction de Haber-Weiss est un autre exemple de réaction redox. Dans cette réaction, l'anion de superoxyde interagit avec le peroxyde d'hydrogène en présence d'un ion métallique (comme catalyseur) pour produire un radical hydroxyle. La première étape (réaction 1) consiste à réduire le fer ferrique en fer ferreux ; suivi de la deuxième étape (réaction 2), la réaction de Fenton. Avec cette dernière, ces deux réactions sont importantes pour générer les radicaux hydroxyles (réaction nette) hautement réactifs (Figure 4) (Ahmad et al., 2017) .

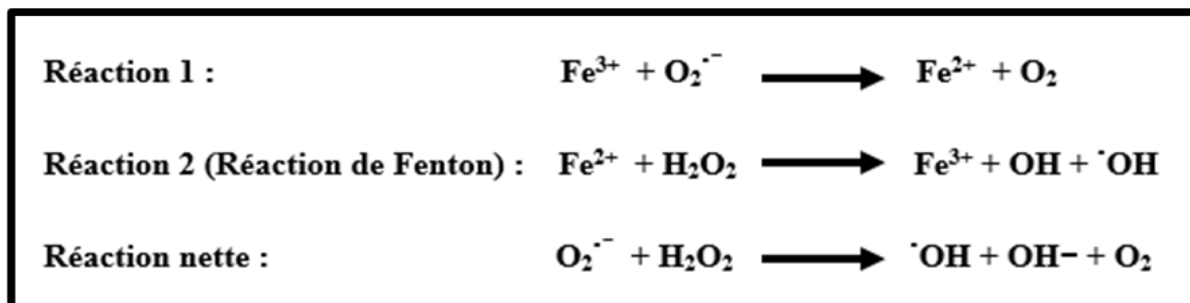


Figure 4: Génération du radical hydroxyle par la réaction de Fenton et d'Haber Weiss.

3. Les conséquences du stress oxydant

3.1 La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est un processus complexe connu pour se produire dans les plantes et les animaux. Il implique la formation et la propagation des radicaux lipidiques, l'absorption d'oxygène, le réarrangement des liaisons doubles dans les lipides insaturés et la destruction éventuelle des lipides membranaires, avec la production d'une variété de produits de dégradation (Repetto et al., 2012). La peroxydation des phospholipides dans les membranes

lipidiques peut engendrer une diminution de la fluidité et de la perméabilité de la membrane et une inactivation des récepteurs, ce qui entraîne le déclenchement de l'apoptose (Luo et al., 2020). Les acides gras polyinsaturés (AGPI), en particulier avec un nombre élevé de doubles liaisons, comme l'acide arachidonique, sont très sensibles aux ERO. Tel que le radical hydroxyle qui est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI) : ce qui représente la phase d'initiation. Le radical lipidique réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde ($\text{ROO}\cdot$), suffisamment réactif pour arracher un H^+ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction (Repetto et al., 2012). Parmi les produits de ces réactions on trouve, le malondialdéhyde et le 4-hydroxy-2-nonénal (4-HNE) qui sont deux aldéhydes largement étudiés (Figure 5) (Luo et al., 2020).

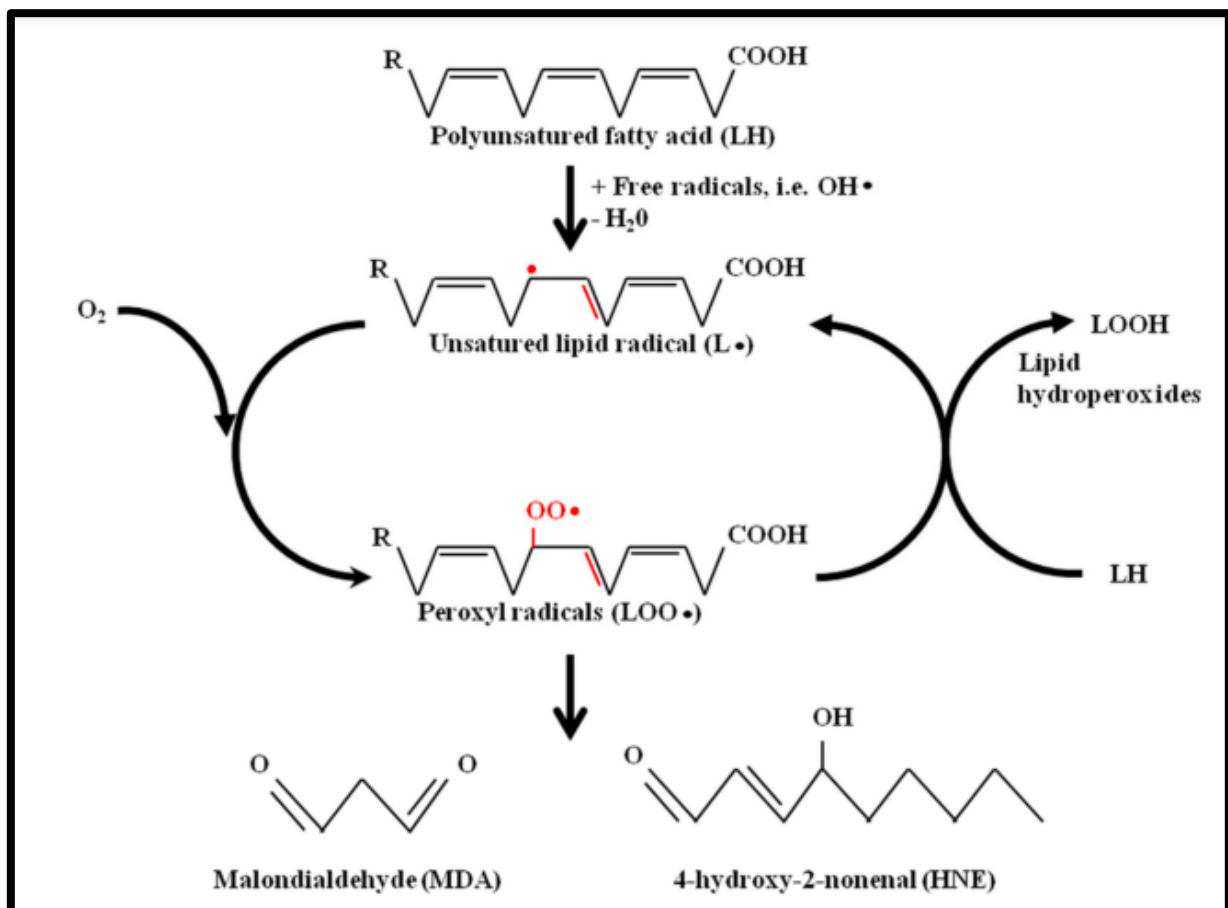


Figure 5: Mécanismes en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés.

d'après (Barrera et al., 2018)

3.2 Oxydation des protéines

L'oxydation des protéines peut entraîner un changement dans ses structures tridimensionnelles, la modification des propriétés physiologiques telles que les activités des enzymes et les réseaux de transduction de signal qui sont liés à la régulation et la fonction des cellules. Les dérivés du carbonyle sont un grand groupe de produits finaux de l'oxydation des protéines qui ont été considérés comme les biomarqueurs les plus utilisés de cette oxydation (Luo et al., 2020). La toxicité des ERO s'exerce également sur les protéines du fait qu'ils sont capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines en altérant également leur fonction ; les plus sensibles à leur action sont les acides aminés d'une part, aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical $\bullet\text{OH}$ s'additionne, modifiant la conformation de la protéine et d'autre part, contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Après attaque radicalaire, quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des protéines sont produites (Figure 6) (Favier, 2003).

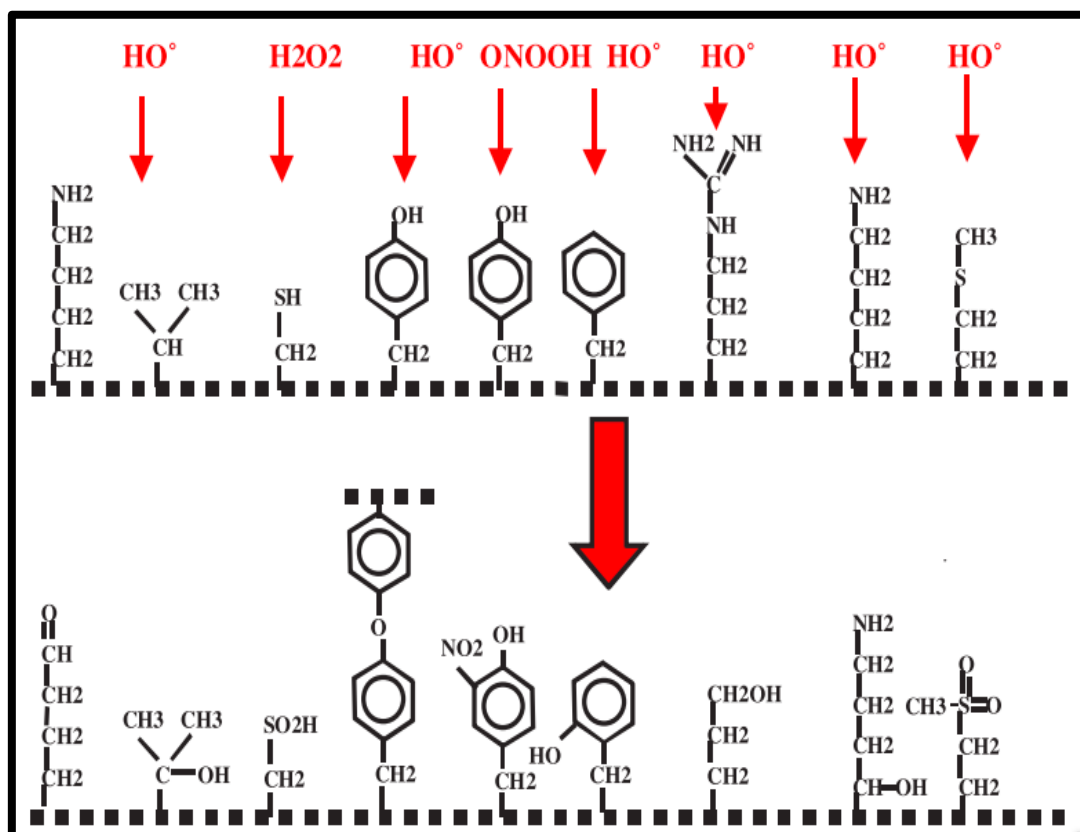


Figure 6: Quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés.

D'après (Favier, 2003)

3.3 Dommages de l'ADN

Les ERO, en particulier les radicaux hydroxyles, peut causer des dommages oxydatifs à l'ADN, ce qui comprend : la mutation de base, la rupture des brins, simples et doubles et la formation d'adduits d'ADN. En général, les radicaux hydroxyles pourraient réagir avec les bases d'ADN et le squelette de sucre-phosphate, conduisant à l'appariement erroné de base et à une mutation plus commune de G à T et C aux bases A. Pendant ce temps, les radicaux hydroxyles pourraient aussi réagir avec le désoxyribose entraînant la perte de bases d'ADN, générant des sites sans base. Les ruptures de brins d'ADN sont des facteurs de risque bien établis d'instabilité du génome, perturbation du cycle cellulaire, ainsi que la mort cellulaire (Luo et al., 2020). L'ADN qu'il soit nucléaire ou mitochondrial, est également une cible majeure des ERO. Les radicaux $O_2^{\cdot-}$ et $\cdot OH$ peuvent interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques en provoquant des lésions à l'ADN. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont réparées entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations et délétions à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (Figure 7) (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

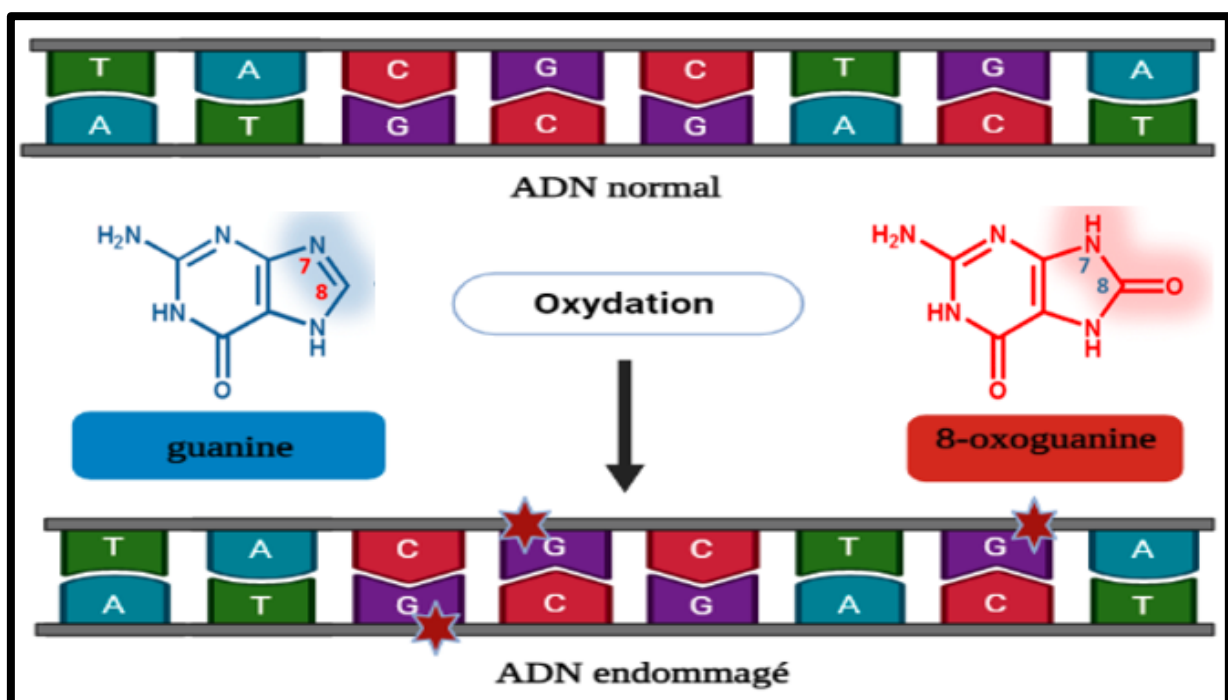


Figure 7: Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire.

4. Les défenses antioxydantes

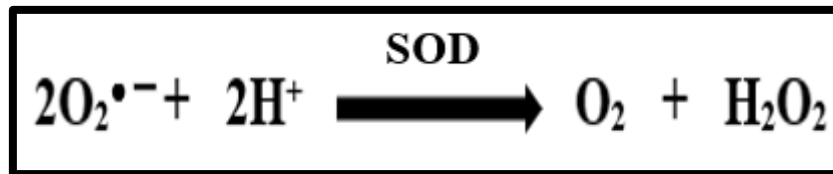
Pour se protéger des effets délétères des ERO, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue deux sources d'antioxydants : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, flavonoïdes, glutathion ou acide lipoïque ; l'autre est endogène et se compose d'enzymes (Superoxyde dismutase SOD, Glutathion peroxydase GPx, Catalase CAT) et de protéines (ferritine, transferrine, céruléoplasmine, albumine). A cela s'ajoutent quelques oligoéléments comme le sélénium, le cuivre et le zinc qui sont des cofacteurs d'enzymes antioxydantes (**Figure 8**) (**Haleng et al., 2007**).

4.1 *Systèmes de défense enzymatiques*

Le système humain possède une batterie d'enzymes qui neutralisent les espèces réactives formées. Les plus importantes sont la CAT, la SOD et la GPx. L'activité de ces derniers constituent la première ligne de défense antioxydante qui joue un rôle clé dans les mécanismes de défense totaux du système biologique (**Ighodaro & Akinloye, 2018**).

4.1.1 **Superoxyde dismutase**

La SOD est une protéine qui agit comme un enzyme antioxydant en convertissant deux anions de superoxyde en peroxyde d'hydrogène et d'oxygène. Elle joue un rôle dans la protection des enzymes et des protéines contre la toxicité de l'oxygène chez les procaryotes et les eucaryotes (**La réaction ci-dessous et Figure 8**) (**Abati et al., 2020**). Les SOD appartiennent à la famille des métalloenzymes. Elles sont classées en différentes familles : Cu-Zn-SOD, Cu-SOD, Mn-SOD et Fe-SOD. Ces enzymes se trouvent à différents endroits, par exemple, Cu-Zn-SOD est principalement présent dans le chloroplaste et le cytosol des cellules eucaryotiques (**Ali et al., 2020**). La Cu-SOD est présente au niveau extracellulaire chez le règne fongique, les mycobactéries et les oomycètes (**Robinett et al., 2018**), tandis que la MnSOD est principalement présente dans la matrice des mitochondries et cytosol de bactéries, et la FeSOD se trouve dans les procaryotes et certaines plantes. Parmi ces enzymes, la Cu-Zn-SOD est connue pour fournir une forte défense contre la toxicité de l'oxygène à l'intérieur de la cellule, et selon les études, il est admis que la Cu-Zn-SOD est un enzyme important pour la vie aérobie et elle est irremplaçable (**Ali et al., 2020**).



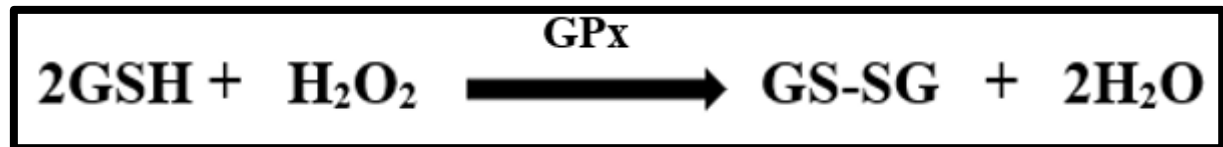
4.1.2 Catalase

La catalase est une protéine qui agit comme un enzyme antioxydant en décomposant le H_2O_2 en H_2O et en O_2 (**La réaction ci-dessous et Figure 8**) (Glorieux & Calderon, 2017). La CAT est présente dans la plupart des cellules, dont elle est présente principalement dans les peroxysomes des cellules des mammifères (Aslani & Ghobadi, 2016). La catalase a été classée en trois groupes en fonction de leur structure et fonction : la catalase typique, la catalase peroxydase et la catalase manganèse. La catalase typique d'un poids moléculaire est de 200-340 kDa est largement trouvée chez les animaux à respiration aérobie. La catalase peroxydase se trouve chez les champignons et les bactéries. Son poids moléculaire varie entre 120 et 340 kDa, son activité est moins efficace par rapport à la catalase typique. En fin, la catalase manganèse se situe exclusivement chez les bactéries qui mesurent entre 170 et 210 kDa. Ce type utilise deux ions manganèses dans son site actif (Glorieux & Calderon, 2017).



4.1.3 Glutathion peroxydase

La GPx est une famille d'enzymes qui utilisent le glutathion réduit (GSH réduit) comme substrat. Elle fournit une deuxième ligne de défense contre le stress oxydatif. Elle est composée de quatre sous-unités identiques (Lubos et al., 2011). La GPx catalyse la réduction de H_2O_2 en H_2O et des alcools correspondants, en utilisant le GSH comme un cofacteur (**La réaction ci-dessous**) (Birben et al., 2012). Elle joue un rôle important dans la protection des acides gras polyinsaturés de la membrane cellulaire, où il fonctionne comme un système de défense antioxydant. La GPx a une plus grande affinité pour le substrat que la CAT et est connue pour réduire les hydroperoxydes d'acides gras (Gathwala & Aggarwal, 2016). La plupart des cellules animales ont la GPx (Sharma et al., 2012) au niveau cytosolique et mitochondriale (Ali et al., 2020). Les GPx jouent également un rôle important dans la détoxification des ROS (Ali et al., 2020).



4.2 Systèmes de défense non-enzymatiques

4.2.1 Glutathion

Le GSH est un tripeptide (cystéine, glycine et glutamine) en concentrations relativement élevées dans de nombreux tissus corporels. On le trouve dans les compartiments cellulaires : le cytosol et les mitochondries. Le glutathion est le principal antioxydant non enzymatique, impliqué dans le piégeage de nombreux ERO tels que H_2O_2 , O_2 et $\bullet\text{OH}$ (**Figure 8**) (**Misak et al., 2018**). Il joue un rôle central dans la réduction du stress oxydatif, le maintien de l'équilibre redox, l'amélioration de la détoxification métabolique et la régulation du système immunitaire. Diverses maladies chroniques liées à l'âge, comme celles liées à la neurodégénérescence, à la dysfonction mitochondriale, et même le cancer, ont été liés au niveau de GSH (**Ali et al., 2020**).

4.2.2 Acide ascorbique

La vitamine C est communément appelée acide ascorbique et elle possède une activité antioxydante en piégeant $\text{O}_2\bullet^-$ et $\text{OH}\bullet$ et réduisant H_2O_2 en H_2O (**Figure 8**). Il s'agit d'un antioxydant hydrosoluble vital présent dans les fluides biologiques et requis pour les fonctions métaboliques normales du corps. C'est un piègeur des radicaux libres très puissant et conserve l'intégrité de la lipoprotéine de faible densité (LDL) et maintient le niveau de vitamine E dans les membranes cellulaires. Il prévient les macromolécules comme l'ADN, les lipides et les protéines des dommages oxydatifs (**Ali et al., 2020**). Il a été démontré que la vitamine C est capable d'empêcher, réduire et prévenir la peroxydation lipidique induite par le H_2O_2 et la formation de 8-hydroxydésoxyguanosine (8-OHdG) dans les acides nucléiques (**Uttara et al., 2009**).

4.2.3 Tocophérols

Les huiles alimentaires sont composées principalement d'acides gras sous forme de triacylglycérols qui génèrent l'énergie pour le corps humain. De plus, elles sont composées des tocophérols et des tocotriénols (**Shahidi & de Camargo, 2016**). Quatre tocophérols naturels sont désignés alpha (α), bêta (β), gamma (γ) et delta (δ) et, parmi ces isoformes, l' α tocophérol étant le plus abondant (**Jiang, 2014**). L' α tocophérol est le premier analogue de la vitamine E.

La vitamine E comprend huit différents analogues (α , β , γ , et δ -tocophérols et α , β , γ et δ -tocotriénols). Les tocophérols sont la forme saturée de la vitamine E, alors que les tocotriénols sont la forme insaturée (Ahsan et al., 2014; Ahsan et al., 2015). La vitamine E est un antioxydant liposoluble efficace trouvé au niveau de la membrane plasmique et qui peut protéger les membranes cellulaires contre la peroxydation lipidique en donnant un atome d'hydrogène au radical (Ali et al., 2020). Bien que l' α tocophérol soit la forme la plus abondante et la plus étudiée, les autres isoformes comme le γ -tocophérol, δ -tocophérol et γ -tocotriénol ont également une activité antioxydante et anti-inflammatoire et jouent un rôle vital dans la physiopathologie d'un nombre de maladies (Figure 8) (Mathur et al., 2015).

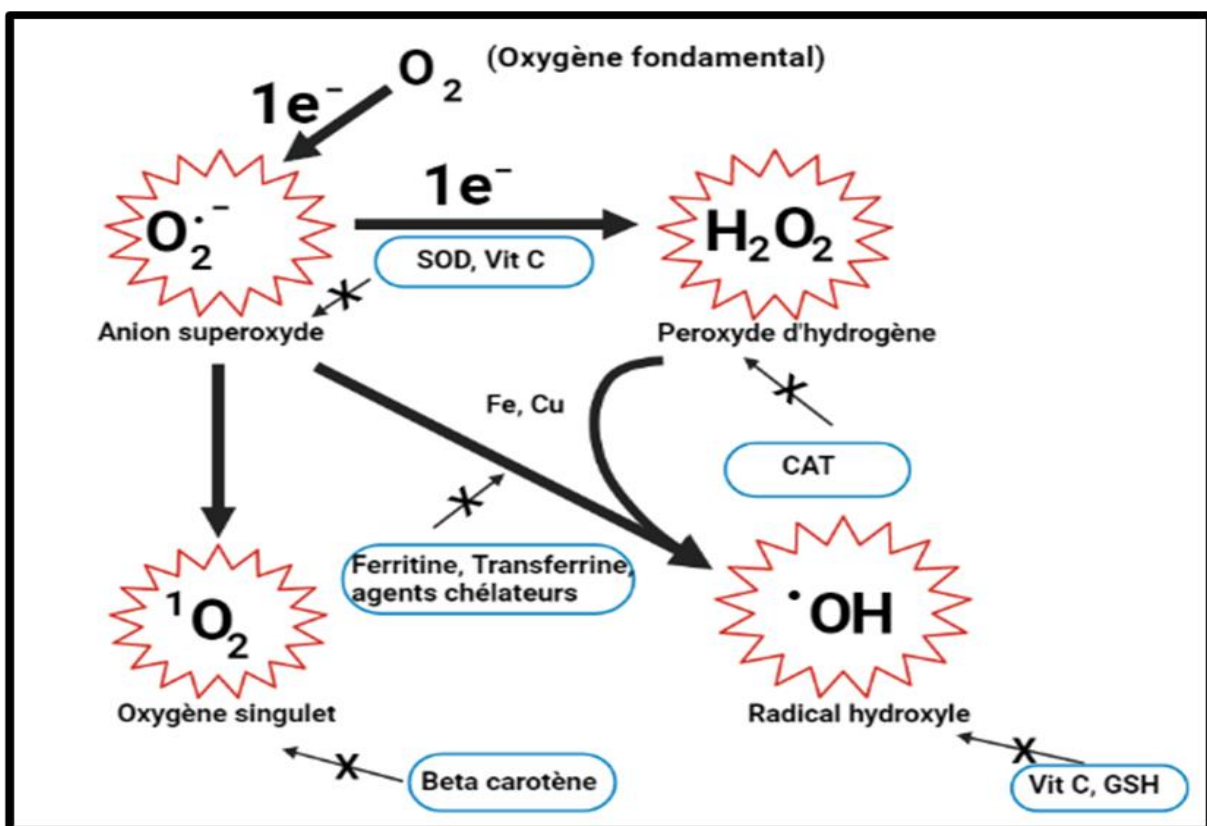


Figure 8: Les ERO et les systèmes de défense antioxydants.

5. Les voies de signalisation

Pour tous les organismes vivants en aérobie, la production des ERO est un processus normal et ne s'agit pas, en soi, une situation de stress oxydatif. En effet, les cellules ont un système complexe de détoxification contre les ERO via différentes lignes de défenses agissantes en synergie. La première ligne s'agit du système de défense enzymatique englobant les enzymes

de type oxydoréductase. La deuxième ligne s'agit du système de défense non-enzymatique, cette ligne met en jeu les antioxydants (la vitamine C et E, les polyphénols, les caroténoïdes...) capables de neutraliser et piéger les ERO. La troisième ligne s'agit du système de réparation des macromolécules endommagées par les ERO à citer les protéines (protéinases et peptidases), les lipides (hydrolyse sélective des acides gras oxydés) et l'ADN (polymérase et nucléases) (**Ighodaro & Akinloye, 2018**). La réponse antioxydante de phase II est considérée la voie de défense présente dans les cellules. Elle est régulée par le facteur de transcription nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) (**Buendia et al., 2016**). Nrf2 est un facteur de transcription de 605 acides aminés composé de sept domaines fonctionnels (De Neh1 à Neh7). Le domaine N terminal Neh2 est le site de liaison de la protéine Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1). Keap 1 est composé de 624 acides aminés et riche en cystéine. Le domaine Neh1 permet la liaison de Nrf2 à la séquence de l'élément de réponse antioxydant (ARE) (**Tu et al., 2019**) qui est une séquence activatrice favorisant l'activation transcriptionnelle des gènes dans les cellules exposées au stress oxydatif (**Nguyen et al., 2003**). Durant les conditions physiologiques normales, le complexe Keap 1 et Cullin-3 (Cul3) agit négativement sur le Nrf2 qui reste séquestré dans le cytosol. En effet, Cul 3 se lie au Keap1 qui supprime la translocation nucléaire de Nrf2 en se liant au Neh2. Puis, Keap 1 stimule la dégradation protéasomique par ubiquitination de Nrf2 à travers Cul3 contenant l'ubiquitine ligase E3. Cependant, toute interruption dans cette condition de base mène au stress. Dans les conditions du stress, notamment le stress oxydatif, Keap1 n'interagit pas avec Nrf2, ce qui entraîne sa dissociation de Nrf2. En conséquence, un niveau élevé de Nrf2 s'accumule dans le cytoplasme, et se transfère ensuite au noyau (**Ashrafizadeh et al., 2020**) dans lequel il s'hétérodimérise avec une petite protéine Maf (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog) (**Bellezza et al., 2018**) où il cible l'élément de réponse antioxydante (ARE). ARE est également appelé élément de réponse électrophile, est un élément cis-régulateur ou une séquence amplificatrice, qui se trouve dans la région promotrice de plusieurs gènes codant pour des enzymes de détoxification. La séquence centrale de l'ARE comprend 5'-TGACNNNGC-3' et répond principalement aux inducteurs de stress oxydatif (**Bhakkiyalakshmi et al., 2018**). Une fois activé, ARE déclenche par la suite l'expression des gènes antioxydants comme l'hème l'oxygénase-1 (HO-1), le NADPH quinone réductase-1 (NQO1), superoxyde dismutase (SOD), glutathion-s-transférase (GST) (**Ashrafizadeh et al., 2020**), glutathione réductase (GR), glutathione peroxydase (GPx) et catalase (CAT) (**Lakhan et al., 2009**). Ces enzymes antioxydants diminuent efficacement une charge de stress oxydatif, réduisant ainsi les dommages aux lipides, aux protéines, à la membrane cellulaire et au matériel génétique (**Figure 9**) (**Ashrafizadeh et al., 2020**).

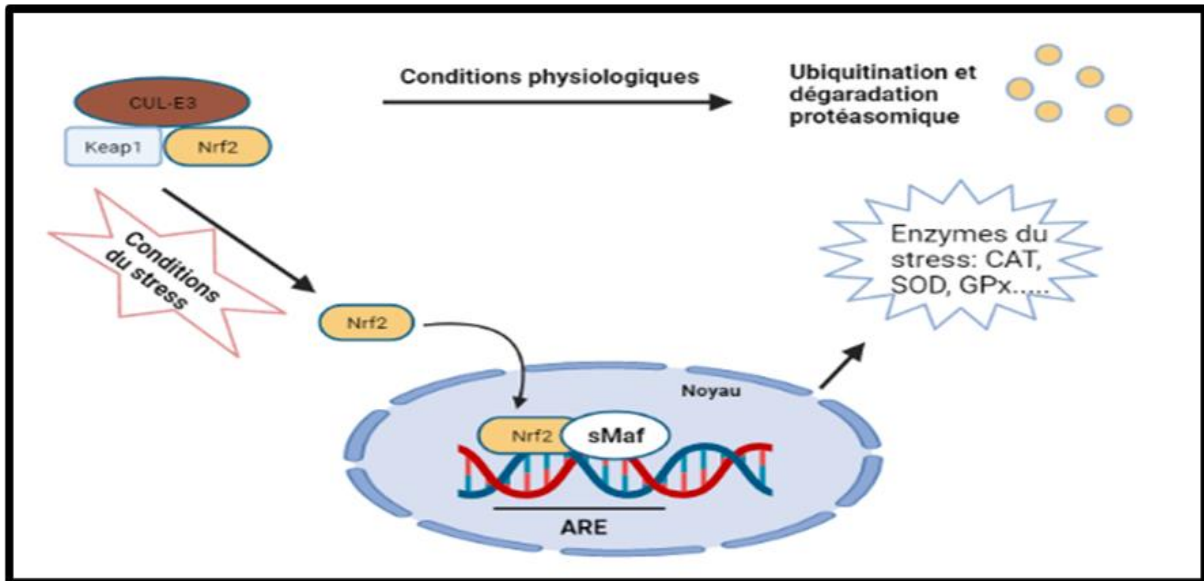


Figure 9: Signalisation antioxydante du facteur lié à l'érythroid nucléaire (Nrf2).

Les métaux, sous diverses formes et combinaisons chimiques, sont courants dans notre environnement. Les êtres humains sont exposés de manière omniprésente à ces substances par le biais de diverses sources. Le fer appartient à ces métaux (Khalid et al., 2020). La capacité de gagner et de perdre d'électrons permet au fer de participer à des réactions potentiellement nocives de génération de radicaux libres, produisant le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) qui est une espèce réactive de l'oxygène (ERO) basée sur la réaction de Fenton. Le radical hydroxyle, qui est l'espèce chimique la plus réactive dans les systèmes biologiques, lorsqu'il est présent en excès, peut non seulement endommager les lipides et les protéines, mais aussi causer des dommages oxydatifs à l'ADN, notamment des modifications des bases de l'ADN et des ruptures de brins d'ADN (Pilo & Angelucci, 2018).

III. Fer

1. Introduction

Le fer est un élément chimique classé en 4^{ème} position dans les éléments les plus abondants sur la croûte terrestre. Il est de symbole Fe, numéro atomique 26 et de masse atomique 55,845 (Figure 10). Il appartient aux métaux de transition avec des états d'oxydation allant de -4 à +7 (Kloprogge et al., 2020). D'un point de vue biologique, le fer est un élément chimique essentiel pour les cellules vivantes (Anderson & Shah, 2013). En effet, le fer participe à la synthèse de l'ADN, la croissance cellulaire et le transport de l'oxygène (Cornelissen et al., 2019). Cependant, en excès, il conduit à la génération des espèces réactives

à l'oxygène (ERO) via les réactions de Fenton et d'Haber Weiss (Milic et al., 2016). Pour affronter cette double nature du fer, les cellules ont des mécanismes développés afin de réguler le fer de son entrée à sa sortie (Borch-Johnsen et al., 2009). Dernièrement, le métabolisme du fer au niveau de la cellule et de l'organisme a été développé et ce progrès sera résumé dans ce chapitre.

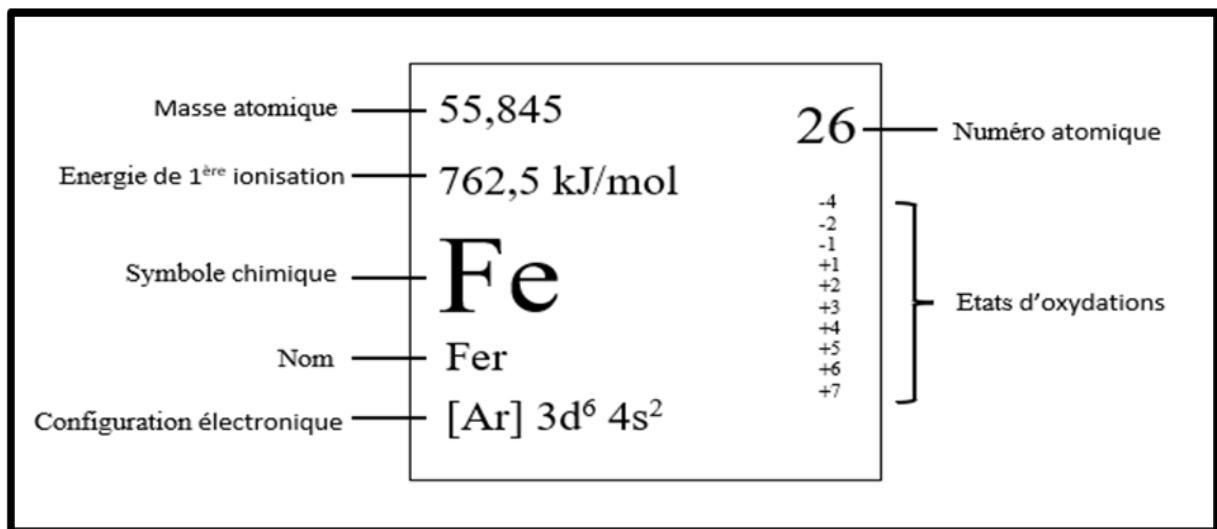


Figure 10: Caractéristiques chimiques du fer.

2. Rôle biologique du fer

Le fer est incorporé dans trois grandes classes de protéines : les hémoprotéines, les protéines fer-soufre et finalement la classe des protéines non hémique et non fer-soufre (Crichton, 2016).

2.1 Les hémoprotéines

La première classe de protéines contenant du fer que nous considérons sont celles dans lesquelles le fer est lié à quatre atomes d'azote du cycle d'une molécule de porphyrine (hème). Trois types d'hémoprotéines ont été identifiés : Transporteurs d'oxygène, activateurs d'oxygène moléculaire et protéines de transport d'électrons (cytochromes) (Crichton, 2016).

2.1.1 Les transporteurs d'oxygène

Le transport et le stockage de l'oxygène dans de nombreux eucaryotes supérieurs sont assurés par des hémoglobines et des myoglobines. Dans ces derniers, l'hème est étroitement lié à la protéine par un grand nombre d'interactions hydrophobes et par une liaison coordonnée unique entre l'imidazole d'un « histidine proximale » et le fer ferreux (Crichton, 2016).

2.1.2 Activateurs d'oxygène moléculaire

Ces enzymes à hème comprennent les cytochromes oxydases, catalases et peroxydases. Ils sont caractérisés par une géométrie pentacoordonnée dans laquelle le sixième site du métal peut lier soit l'oxygène moléculaire, le peroxyde d'hydrogène ou dans le cas du cytochrome P450s, même former des liaisons fer-carbone avec le substrat (Crichton, 2016).

2.1.3 Protéines de transport d'électrons

La troisième classe d'hémoprotéines, les cytochromes, ont du fer dans sa structure. Les cytochromes sont largement distribués et servent de protéines porteuses d'électrons dans les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Crichton, 2016).

2.2 Les protéines fer-soufre

Cette deuxième classe des protéines contenant du fer contient des atomes de fer liés au soufre en formant un groupe lié à la chaîne polypeptidique uniquement par les groupes thiols de résidus de cystéine (Crichton, 2016).

2.3 Les protéines non hémiques et non fer-soufre

La troisième classe des protéines consiste en une collection hétérogène qui contient du fer sous forme non hémique et non fer-soufre. Ces protéines peuvent être classées en trois catégories :

2.3.1 Enzymes mononucléaires à fer non hémique :

Ceux-ci comprennent un grand nombre d'enzymes impliqués dans l'activation de l'oxygène et son incorporation dans les substrats organiques notamment les dioxygénases de Rieske et les dioxygénases α -cétoglutarate dépendantes (Crichton, 2016).

2.3.2 Enzymes dinucléaires à fer non hémique :

Ceux-ci comprennent un certain nombre de protéines d'activités biologiques diverses, caractérisées par la présence de fer dans les noyaux métalliques notamment les monooxygénases. Parmi leurs fonctions figurent le stockage du fer dans les ferritines des cellules eucaryotes et bactériennes, le transport de l'oxygène et le piégeage des peroxydes (Crichton, 2016).

2.3.3 Protéines de stockage, du transport et du métabolisme du fer :

Il s'agit notamment des protéines de :

- Stockage du fer : le stockage est assuré par la ferritine qui est la principale protéine de stockage du fer car elle possède une grande cavité qui peut accumuler de grandes quantités de fer (Arosio et al., 2017).

- Transport du fer : le transport dans la circulation est assuré par la transferrine empêchant la participation du fer aux réactions d'oxydoréduction (Boshuizen et al., 2017).

- Régulation du fer : la régulation est assurée par l'hépcidine qui est une hormone peptidique de 25 acides aminés qui inhibe l'entrée dans le compartiment plasmatique du fer provenant des trois principales sources de fer : l'absorption alimentaire dans le duodénum, la libération de fer recyclé par les macrophages et la libération de fer stocké par les hépatocytes (Ganz & Nemeth, 2012).

3. Homéostasie du fer

3.1 Formes biologiques du fer alimentaire

Le fer dans l'organisme provient de l'alimentation et il existe sous 2 formes, le fer héminique (fer lié à l'hème) et le fer non héminique (fer libre).

Le fer héminique : Cette forme du fer est d'origine animale (poissons, viandes) dont l'absorption est supérieure à celle du fer non héminique avec une biodisponibilité de 20% à 30%. Le fer héminique est constitué d'un atome du fer complexé à une porphyrine.

Le fer non héminique : Cette forme du fer est d'origine végétale (végétaux et céréales), il se trouve aussi dans les produits laitiers et les œufs dont l'absorption est faible avec une biodisponibilité de 2 à 5% (Vaulont, 2017).

Différents aliments sont connus comme source du fer notamment le foie de veau, les lentilles et le jaune d'œuf (Tableau 7) (U.S. Department of Agriculture, 2016).

Tableau 7: Valeurs de certains nutriments les plus courants comme source du fer.

D'après (U.S. Department of Agriculture, 2016)

Alimentation	mg de fer/100 g	Alimentation	mg de fer/100 g
Viandes et charcuterie		Céréales	
Jambon de bœuf	9,8	Son de blé	16
Foie de veau	7,9	Germe de blé	7,6
Viande séchée de Grisons	9,8	Avoine	4,2
		Gruau d'orge	2,8
		Riz	1,7
Poisson et fruits de mer		Légumes et légumineuses	
Huitres, moules	5,8	Lentilles	8
Sardines	2,5	Haricots blancs	7
Crustacés	2	Salsifis	3,3
Crevettes	1,8	Epinard, cote de bettes	2,7
Homard, perche	1	Petits pois	1,9
Produits laitiers et œufs		Fruits et fruits séchés	
Jaune d'œuf	5,5	Amandes	4,7
Œufs	1,8	Noisettes	3,7
Parmesan	1,7	Noix de coco	3,5
Fromage fondu	0,9	Dattes	3
Lait écrémé en poudre	0,8	Cassis	1,3

3.2 Absorption intestinale et libération du fer

Le fer non hémique sous forme ferrique Fe (III) est réduit en fer ferreux Fe (II) sous l'action de duodenal cytochrome B (Dcyt B) reductase qui est une ferriréductase localisée au niveau de la membrane apicale de l'entérocyte. Le Fe (II) est pris en charge par une protéine transporteuse localisée au niveau apicale appelée "divalent metal transporter 1" (DMT1) (Beaumont & Karim, 2013). Tandis que le fer hémique sous forme ferreux Fe (II) est internalisé grâce au récepteur hème carrier protein 1 (HCP1) (Loréal al., 2012), et ensuite pris en charge par un enzyme appelée l'hème oxygénase 1 (HO1) permettant la libération du Fe (II). Une fois dans la cellule, le fer est soit pris par la protéine de stockage ferritine ou il est livré à la circulation sanguine grâce à la protéine ferroportine (FPN) ancrée dans la membrane basolatérale, le fer est ensuite oxydé en Fe (III) par l'héphaestine ; une ferroxidase

membranaire. Une fois dans la circulation sanguine, le fer est véhiculé vers les cellules de l'organisme par sa fixation sur la protéine du transport la transferrine (Tf) (**Figure 11**) (Nicolas et al., 2004).

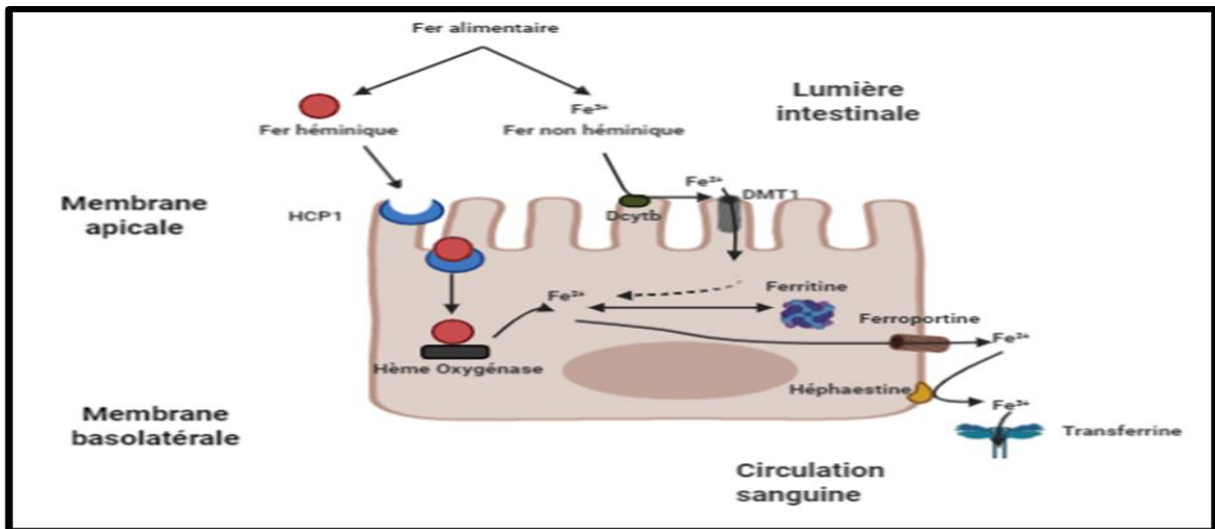


Figure 11: Absorption intestinale et libération du fer.

3.3 Absorption cellulaire du fer

Une fois dans la circulation sanguine, le complexe fer-transferrine est capté par les cellules grâce au récepteur 1 de la transferrine (TfR1). Ce dernier est un récepteur de la Tf constitué de deux sous-unités liés par des ponts disulfure et ancrée dans la membrane cellulaire. Le complexe fer- transferrine - récepteur 1 transferrine entre dans la cellule par endocytose, l'endosome est ensuite acidifié par des pompes à protons via une ATPase ; le pH acide dans les vésicules endosomales permet la dissociation du fer ferrique de la transferrine, le fer ferrique est ensuite réduit en fer ferreux par la Steap 3 (six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3) ; une protéine à activité ferriréductase. Le fer à la fin est véhiculé vers le cytoplasme grâce au transporteur divalent metal transporter 1 pour former le pool du fer labile (labile iron pool ou LIP) (**Figure 12**) (Hamaï & Mehrpour, 2017; Loréal et al., 2012). Le pool du fer labile ou le pool de transit est dirigé ensuite soit vers le pool de stockage ou le pool fonctionnel (**Figure 13**) (Cadet et al., 2005).

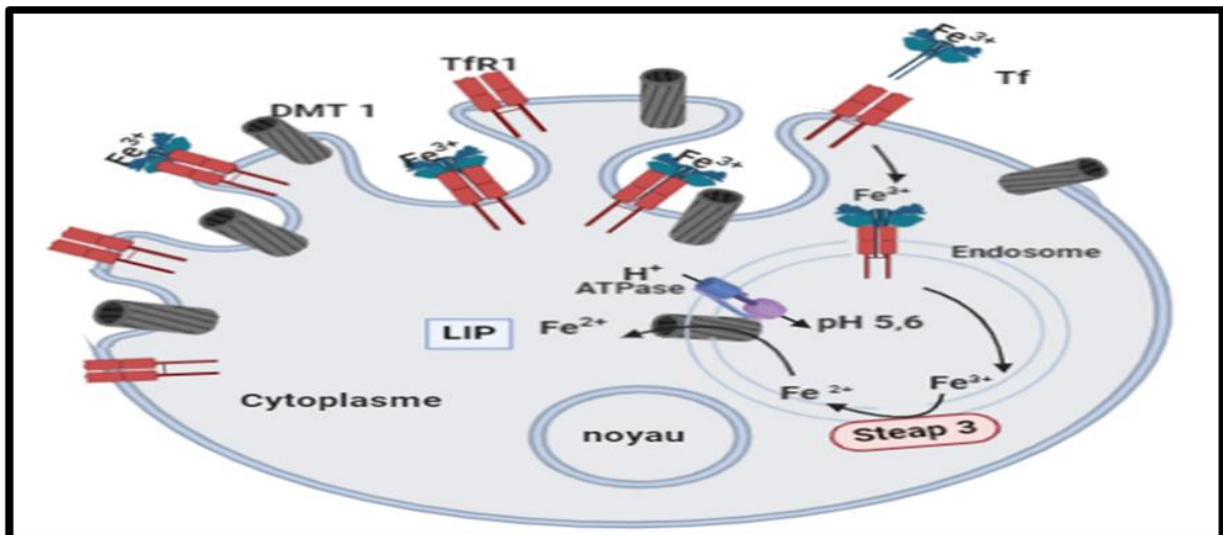


Figure 12: Absorption cellulaire du fer.

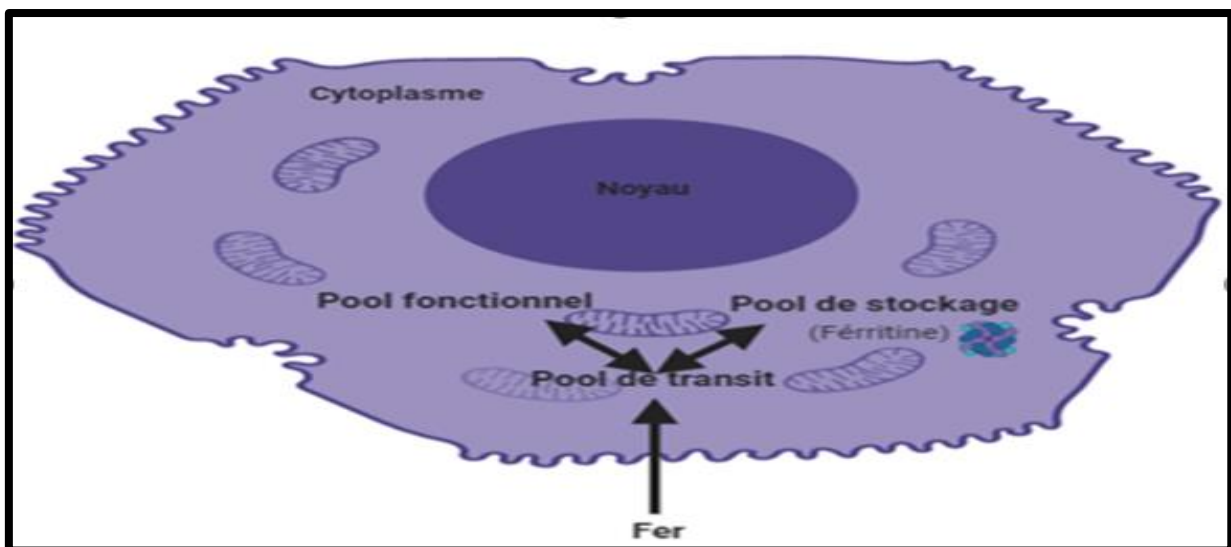


Figure 13: Destination du pool du fer labile.

3.4 Destination cellulaire du fer

La principale destination du fer est la mitochondrie, dans laquelle il participe d'une part, à la synthèse de l'hème trouvé dans les hémoprotéines comme l'hémoglobine, la myoglobine, les cytochromes et la catalase, et d'autre part, à l'assemblage du groupement fer-soufre trouvé dans les métalloprotéines telles que nicotinamide dérivé dinucléotide réduit (NADH) déshydrogénase, coenzyme Q-cytochrome C réductase et la succinate déshydrogénase. Le fer peut être aussi incorporé dans le site actif de quelques enzymes telles que ribonucléotide réductase ; enzyme participant à la synthèse de l'ADN et prolyl hydroxylase qui intervient dans

la synthèse des collagènes (Hamaï & Mehrpour, 2017; Loréal et al., 2000). Le fer peut être aussi exporté à la circulation sanguine par la FPN dans les macrophages après la phagocytose des globules rouges sénescents et la destruction de l'hème de l'hémoglobine (Figure 14) (Hamaï & Mehrpour, 2017).

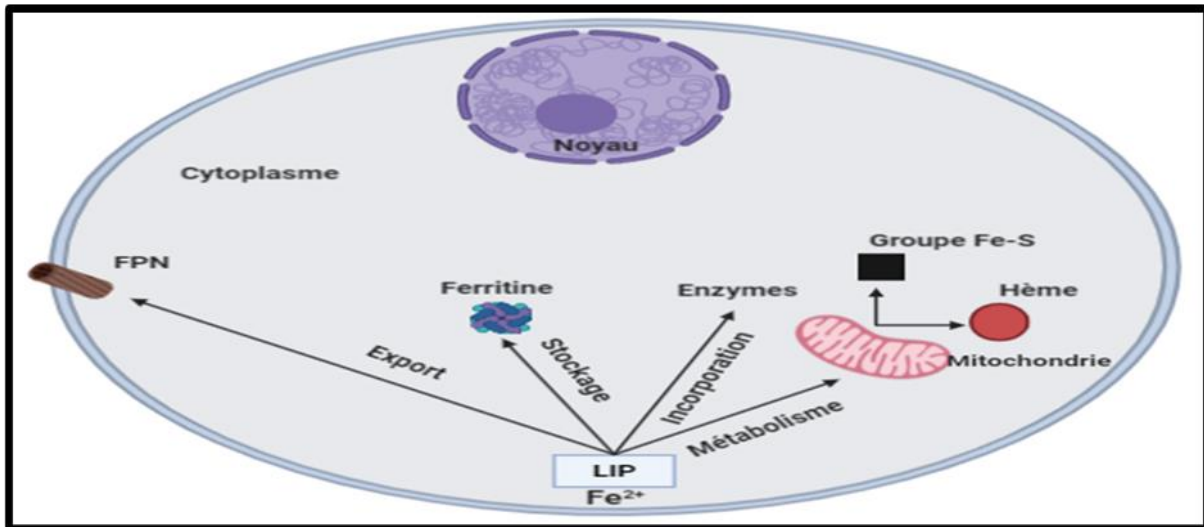


Figure 14: Destination cellulaire du fer.

3.5 Stockage cellulaire du fer

Il est bien connu que le fer en excès engendre des effets oxydants, le pool du fer labile dans les cellules doit être stocké afin de le maintenir à des niveaux plus bas. Ce processus est assuré par la ferritine. C'est une protéine de poids moléculaire varie entre 430 et 460 kDa, composée de 24 sous-unités d'apoferritine de deux types : H (Heavy) et L (Light). La ferritine forme une coquille protéique creuse contenant un noyau du fer qui peut lier de 0 à 4500 atomes. Le fer ferreux entre dans la ferritine via des canaux localisés entre les sous-unités, où il est oxydé par les chaînes H générant le fer ferrique qui subit une nucléation par les chaînes L avec formation d'oxyhydroxyde ferrique qui est la forme de stockage du fer (Beguin, 2002; Loréal et al., 2008; Omar et al., 2006). Dans les tissus à fort stockage du fer, comme le foie et la rate, les sous unités L-ferritine prédominent, tandis que les sous unités H-ferritine prédominent dans les tissus métaboliquement actifs comme le cerveau (Hadzhieva et al., 2014).

3.6 Libération cellulaire du fer

L'export du fer hors la cellule est assuré par la protéine ferroportine (**Abboud & Haile, 2000**). La protéine ferroportine a été aussi identifiée dans l'intestin comme étant responsable de l'export du fer (**Nicolas et al., 2004**). La FPN est fortement exprimée dans les hépatocytes et les macrophages. Les hépatocytes comme étant les cellules de stockage du fer (**Zhang et al., 2004**) ainsi que les macrophages comme étant les cellules d'export du fer à la suite de la phagocytose des globules rouges sénescents. La libération du fer dans la circulation sanguine se fait par FPN-1 et une ferroxidase associée. Le Fe^{2+} du milieu intracellulaire vers le plasma est oxydé en fer Fe^{3+} , également par la céruloplasmine plasmatique à la sortie des macrophages ou des hépatocytes (**Figure 15**) (**Hamaï & Mehrpour, 2017**).

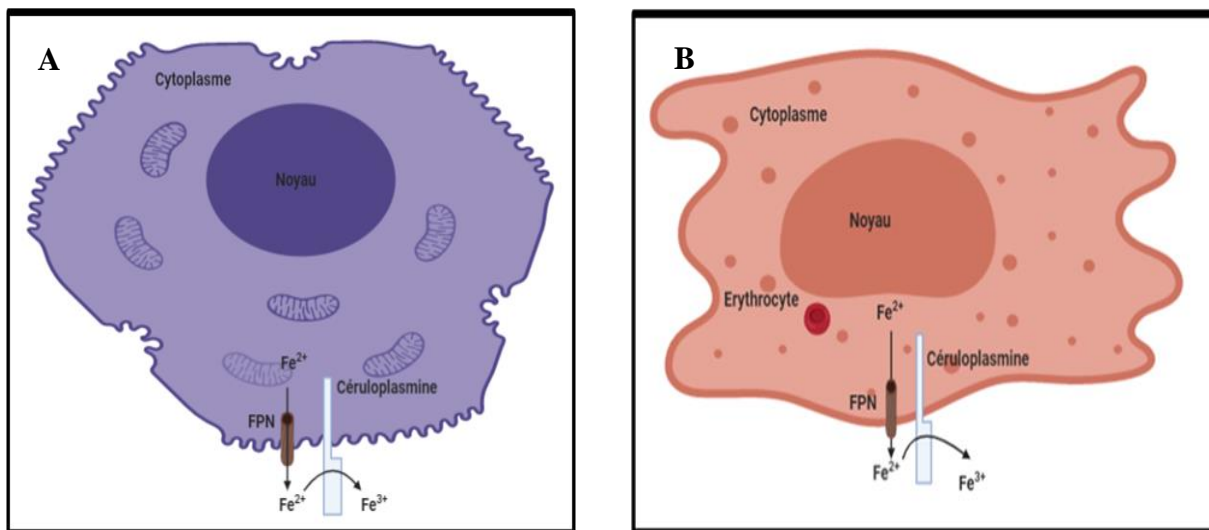


Figure 15: Libération du fer au niveau des hépatocytes et des macrophages.

A : les hépatocytes et B : les macrophages.

3.7 Recyclage du fer par le processus d'érythrophagocytose

Au terme d'environ 120 jours de vie, les érythrocytes sénescents sont dégradés par les macrophages tissulaires, en particulier ceux de la rate (**Andrews, 1999**). Au cours de ce processus d'érythrophagocytose, les macrophages phagocytent les hématies sénescents, l'hème est catabolisé par l'hème oxygénase et le fer est libéré. En fonction des besoins de l'organisme, ce fer est : soit véhiculé pour être stocké au sein de la ferritine (la protéine de stockage cellulaire du fer) à l'intérieur des macrophages ; soit libéré dans le plasma via la protéine d'export cellulaire du fer la ferroportine, (qui est ainsi retrouvée à la surface des macrophages et à la membrane basolatérale des entérocytes). Une fois dans le plasma, le fer

exporté sous forme Fe^{2+} va être oxydé en Fe^{3+} par la céruloplasmine au niveau du macrophage (Kono, 2013) et l'héphaestine au niveau de la membrane basolatérale de l'entérocyte. Le Fe^{3+} est alors pris en charge par la transferrine et transporté dans le plasma jusqu'aux cellules cibles. Le fer cellulaire est ainsi recyclé par le processus d'érythrophagocytose, les macrophages constituant de ce fait la principale source plasmatique du fer destiné aux sites fonctionnels (Renassia & Peyssonnaud, 2019).

4. Chélateurs du fer

Les chélateurs forment des complexes avec le fer pour permettre son élimination du corps dans l'urine ou la bile. Le traitement par les chélateurs du fer vise à réduire le fer labile, le fer non lié à la transferrine à l'extérieur des cellules ainsi que la surcharge en fer (sous forme de dépôts de ferritine et d'hémosidérine dans différents organes). Les chélateurs peuvent être divisés en trois groupes principaux selon leur façon de se lier au fer : hexadentate (déféroxamine), bidentate (défériprone) et tridentate (déférasirox) (Di Maggio & Maggio, 2017).

4.1 Déféroxamine

La déféroxamine est un chélateur de fer à 6 dents qui lie le fer avec un ratio de 1:1 (chaque molécule de déféroxamine lie un ion ferrique). Il est infusé par voie sous-cutanée ou par voie intraveineuse. il ne peut pas être absorbé par voie orale. La déféroxamine a une demi-vie plasmatique de 20 à 30 min, donc elle ne fournit pas de chélation de 24 h. La dose quotidienne habituelle est de 20 mg/kg/jour pour les enfants et de 40 à 60 mg/kg/jour pour les adultes. La déféroxamine est approuvée aux États-Unis, au Canada, en Europe et dans d'autres pays pour le traitement de la surcharge en fer (Di Maggio & Maggio, 2017). De plus, une vaste étude d'observation portant sur 977 patients atteints de la bêta thalassémie majeure dans sept centres italiens a révélé une association significative entre la cohorte de naissance et la survie sans complication, ainsi qu'un taux de survie croissant depuis 1975 (lorsque la déféroxamine a été introduite) (Borgna-Pignatti et al., 2004). Par ailleurs, la déféroxamine peut réduire les niveaux de fer cardiaque et inverser les complications en améliorant la fraction d'éjection ventriculaire gauche (Di Maggio & Maggio, 2017).

4.2 Défériprone

La défériprone est un chélateur de fer à 2 dents qui lie le fer avec un ratio de 3:1 (chaque molécule de défériprone lie 3 ions ferriques). C'était le premier chélateur administré par voie orale à être mis au point (**Kontoghiorghes, 1982**). Elle est administrée à une dose de 75 à 100 mg/kg/jour répartie sur trois administrations et elle a été approuvée en Europe, en Inde et dans d'autres pays pour utilisation lorsque le traitement de la déféroxamine est contre-indiqué (**Di Maggio & Maggio, 2017**) et aux États-Unis depuis octobre 2011 lorsque le traitement par chélation avec déférasirox ou déféroxamine est inadéquat (**Traynor, 2011**).

4.3 Déférasirox

Le déférasirox est un chélateur de fer à 3 dents qui lie le fer dans avec un ratio de 2:1 (chaque molécule de déférasirox lie 2 ions ferriques). Il est recommandé pour les patients atteints de surcharge en fer. La dose approuvée la plus élevée de déférasirox est actuellement de 30 mg/kg une ou deux fois par jour dans de nombreux pays. Cependant, certains patients ont besoin d'une augmentation à 20-40 mg/kg/jour pour atteindre l'objectif thérapeutique (**Di Maggio & Maggio, 2017**). Une étude a montré que le déférasirox était bien toléré par la population pédiatrique (2 ans et plus) (**Galanello et al., 2006**). Une autre étude a montré que le déférasirox administré à des doses quotidiennes de 10 ou 20 mg/kg était bien toléré. De plus, une dose de 20 mg/kg avait une efficacité similaire à 40 mg/kg de déféroxamine en termes de diminution de la concentration de fer dans le foie (**Piga et al., 2006**).

L'utilisation des chélateurs du fer actuellement disponible pour éliminer le fer en excès est limitée en raison de leurs effets secondaires. Il est donc intéressant d'identifier de nouvelles molécules pour prévenir la toxicité du fer.

5. Toxicité du fer

5.1 Fer et stress oxydant

Les métaux sont nécessaires pour de nombreux processus cellulaires, mais il est essentiel que les concentrations intracellulaires des métaux n'atteignent pas des niveaux toxiques. S'il n'est pas régulé, les métaux catalyseront des réactions nuisibles au sein de la cellule (**Bennett & Gralnick, 2019**). Le fer appartient aux métaux, il semble que la production des ERO soit un principal mécanisme de toxicité cellulaire des nanomatériaux à base de fer (**Paunovic et al., 2020**). Il a le pouvoir de gagner et de perdre des électrons en changeant sa valence et basculer entre la forme ferreuse (Fe^{2+}) et la forme ferrique (Fe^{3+}). Cette propriété lui

rend à la fois oxydant et réducteur mais le rend toxique (**Dixon & Stockwell, 2014**). Il est bien connu que ni le peroxyde d'hydrogène ni le superoxyde ne sont suffisamment réactifs pour oxyder les macromolécules cellulaires de base, telles que les acides nucléiques, les protéines et les lipides membranaires. Cependant, en présence du fer, ces espèces sont transformées en radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton (**Galaris et al., 2019**). Dans la réaction de Fenton, le peroxyde d'hydrogène oxyde le fer ferreux générant le radical hydroxyle (**Zhuang et al., 2014**). Ce dernier entraîne des lésions au niveau des protéines, les lipides et les acides nucléiques (**Loréal et al., 2012**). Le radical hydroxyle est le radical le plus réactif qui peut facilement réagir avec de nombreuses substances biochimiques. L'augmentation des radicaux $\bullet\text{OH}$ est connue pour produire de nouveaux radicaux en provoquant une dégradation des protons dans de nombreuses molécules telles que les thiols et les acides gras *in vivo*. À la suite de ces réactions, les cellules sont endommagées. Ce qui peut provoquer dans quelques cas le cancer, le vieillissement ou le diabète (**Sugeçti, 2018**).

5.2 Fer et inflammation

Un grand nombre de preuves cliniques démontrent que l'inflammation s'aggrave avec des réserves élevées de fer (**Wessling-Resnick, 2010**). Un mécanisme bien étudié reliant le fer à l'inflammation implique les effets du fer sur le facteur nucléaire κB (NF- κB) dans les cellules de Kupffer. NF- κB est un facteur de transcription sensible aux réactions redox qui stimule la transcription des cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de la nécrose tumorale (TNF α) et l'interleukine-6 (IL-6). Dans les cellules quiescentes, NF- κB est lié à I κB , qui séquestre ce complexe protéique dans le cytosol ; cependant, le stress oxydatif active I κB -kinase, conduisant à la phosphorylation de I κB , ce qui permet à NF- κB de se déplacer vers le noyau (**Bloomer & Brown, 2019**). Il est bien connu que la surcharge en fer augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires notamment factor- α (TNF α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β) (**Das et al., 2016**). Ces cytokines citées stimulent directement la transcription et la traduction de la ferritine, protéine majeure du stockage du fer (**Ludwiczek et al., 2003; Miller et al., 1991**). L'inflammation a aussi un effet majeur sur l'expression de l'hepcidine qui est un petit peptide dont la forme mature comprend 25 acides aminés synthétisés essentiellement par l'hépatocyte, elle est sécrétée dans le plasma et interagit avec la ferroportine membranaire (**Loréal et al., 2012**). En effet, l'IL-6 libérée durant le processus inflammatoire provoque une activation de la voie STAT3 qui active la transcription du gène hepcidine (**Pietrangelo et al., 2007; Verga Falzacappa et al., 2007**). L'importante augmentation du niveau d'hepcidine participe à la diminution du fer plasmatique qui n'est plus normalement libéré à partir des

macrophages et des entérocytes (**Ganz & Nemeth, 2009**). Ces observations suggèrent que le fer peut moduler l'inflammation dans diverses formes de lésions hépatiques.

5.3 *Fer et sénescence cellulaire*

La sénescence cellulaire est définie comme un arrêt irréversible du cycle cellulaire induit par de nombreuses variétés de stimuli, comme le raccourcissement des télomères et les dommages d'ADN (**Petrat et al., 2002**). Bien que de nombreuses variétés de stimuli induisent la sénescence cellulaire, le fer est particulièrement considéré comme impliqué dans les deux : les dommages d'ADN induits par le stress oxydatif et la sénescence cellulaire induite par un dysfonctionnement mitochondrial (**Nakamura et al., 2019**). L'excès de fer intracellulaire peut endommager l'ADN au moyen de la réaction de Fenton et bloquer les systèmes de réparation génomique, ce qui entraîne la sénescence cellulaire (**Sfera et al., 2018**). Afin de déterminer la causalité de relation entre le fer et la sénescence cellulaire. Des travaux antérieurs sur la drosophile ont montré qu'une consommation accrue de fer diminuait la durée de vie tandis qu'une réduction de l'apport en fer prolongeait la durée de vie (**Massie et al., 1985, 1993**). Cela suggérait que la durée de vie est influencée par le changement du statut du fer.

6. Pathologies liées à la surcharge en fer

La surcharge chronique en fer se produit lorsque les capacités de stockage du fer de l'organisme sont dépassées. Une fois la capacité de liaison de la transferrine est complètement saturée, le fer restant dans le plasma devient détectable comme fer non lié à la transferrine. Ce dernier, est ensuite déposé dans divers tissus et organes comme le foie. Le fer déposé dans les tissus peut générer des radicaux libres qui finalement endommagent les cellules et par la suite l'organe. Les manifestations cliniques résultantes dépendent de l'organe touché (**Shander et al., 2012**).

6.1 *Maladies hépatiques*

Le foie est un organe important de l'homéostasie du fer. D'une part, par son intervention dans le stockage du fer, ce qui signifie la présence d'une grande quantité de protéines de stockage du fer (ferritine) dans le foie, et d'autre part, par la production de la transferrine qui est une protéine de transport du fer. De ce fait, le foie est le premier organe affecté dans les troubles de surcharge en fer (**Büyükaşık & Büyükaşık, 2016**).

Il existe de plus en plus de preuves que des quantités accrues de fer dans le foie peuvent augmenter les lésions hépatiques en combinaison avec d'autres agressions, comme une infection

chronique par le virus de l'hépatite C, une consommation excessive d'alcool ou une stéatose hépatique non alcoolique. La raison qui fait du fer un facteur hépatotoxique potentiel est basée sur la capacité de ce métal à induire un stress oxydatif par la formation de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton (**Fargion et al., 2011**). Les personnes atteintes du syndrome métabolique peuvent développer une ferritine sérique fortement élevée malgré une augmentation normale à légère du fer hépatique, ce qui reflète un état inflammatoire systémique. De plus, la maladie du foie en stade terminal, quelle que soit l'étiologie, est associée à une carence acquise en hepcidine entraînant une absorption accrue du fer et le développement de la surcharge en fer au niveau du cœur et du pancréas (**Sikorska et al., 2016**).

6.2 Maladies neurodégénératives

L'accumulation du fer dans les cellules du cerveau doit être régulée pour prévenir les effets toxiques car la perturbation de l'homéostasie du fer peut accélérer la progression des maladies neurodégénératives (**Ward et al., 2014**). Le développement et la progression des troubles neurodégénératifs comme la maladie d'Alzheimer (**Smith et al., 2004**) et la maladie de Parkinson (**Yamamoto et al., 2002**) ont, entre autres, été attribuées à une perturbation des mécanismes de régulation du fer notamment l'accumulation de fer (**Gaasch et al., 2007**). Il a été suggéré que la surcharge en fer de la substantia nigra et sa toxicité pour les neurones dopaminergiques jouent un rôle clé dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson (**Ward et al., 2014**). L'accumulation du fer au niveau du cerveau a également été documentée à plusieurs reprises dans les syndromes parkinsoniens atypiques, comprenant principalement une atrophie multisystémique, et une paralysie supranucléaire progressive. De plus, des études pathologiques ont montré que les niveaux de fer dans le putamen, globus pallidus, et substantia nigra sont plus élevés chez les patients atteints de l'atrophie multisystémique (**Lee & Lee, 2019**).

6.3 Maladies rénales

Le rein participe activement à l'homéostasie systémique du fer par le mécanisme de réabsorption du fer filtré afin d'empêcher sa perte par voie urinaire. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'homéostasie du fer rénal peuvent différer de ceux observés dans d'autres tissus, tels que le foie et le duodénum, en raison de la demande métabolique élevée des cellules rénales et de l'expression différentielle des transporteurs de fer. De plus, l'accumulation du fer dans les reins et l'augmentation de sa concentration dans les urines ont été associés à la progression des lésions rénales et sont de plus en plus observée dans les pathologies de la surcharge en fer aiguë et chronique (**Van Swelm et al., 2020**).

Par ailleurs, d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de fer dans la pathogenèse des maladies rénales et les effets potentiellement nocifs ou bénéfiques de l'administration du fer intraveineux pour les maladies rénales (**Dev & Babitt, 2017**).

OBJECTIFS
ET
APPROCHES

Le fer est un métal impliqué dans de nombreux processus enzymatiques maintenant diverses fonctions physiologiques. Cependant, la perturbation de l'homéostasie du fer joue un rôle essentiel dans l'apparition de quelques maladies hépatiques, neurodégénératives et rénales. Le rôle toxique du fer est lié à la décomposition du peroxyde d'hydrogène (réaction de Fenton) conduisant à la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui endommagent les biomolécules, y compris les protéines, les acides nucléiques et les lipides. Ainsi, la conception des molécules ayant une activité antioxydante et/ou chélatrice du fer semble être une approche importante dans le traitement des maladies liées à la surcharge du fer. Les chélateurs du fer existants actuellement présentent divers effets secondaires qui limitent leur utilisation pour traiter les maladies hépatiques, neurodégénératives et rénales. Ce travail de thèse s'intègre dans cette nouvelle stratégie préventive qui vise à chercher des substances chélatrices et/ou antioxydante avec moins de risque que les chélateurs synthétiques. Dans ce travail, nous avons choisi l'huile d'argane comme source de ces molécules. L'huile d'argane a une composition particulière, elle est caractérisée par des taux élevés d'acides linoléique et oléique. De plus, elle est riche en polyphénols et en tocophérols, présentant une activité antioxydante. L'huile d'argane contient aussi d'autres composés tels que les caroténoïdes, les squalènes, les stérols et les xanthophylles. Ces composés pourraient contribuer à la valeur nutritionnelle de l'huile d'argane, à ses propriétés bénéfiques pour la santé, ainsi qu'à ses caractéristiques organoleptiques et diététiques et à sa conservation. Moins d'études *in vivo* ont été réalisées sur l'effet de l'huile d'argane d'où vient l'importance de notre travail.

Afin de préciser l'intérêt de l'huile d'argane pour prévenir les maladies hépatiques, neurodégénératives et rénales, l'huile d'argane ou certains de ces composés ont été évalués sur différents modèles *in vivo* et *in vitro*. Pour réaliser ce travail, quatre approches ont été mises en œuvre :

Approche 1 : Screening phytochimique de l'huile d'argane

Afin de caractériser l'huile d'argane et évaluer son activité antioxydante. Plusieurs tests chimiques ont été effectués sur l'huile d'argane (Agadir, Maroc). Tous les résultats de l'huile d'argane sont comparés avec ceux de l'huile d'olive (Séfrou, Maroc) utilisée comme contrôle positif dans cette étude. En premier lieu, nous avons préparé les extraits méthanoliques de l'huile. En deuxième lieu, nous avons mesuré la teneur en polyphénols, chlorophylles et

caroténoïdes dans l'huile. En dernier lieu, nous avons mesuré l'activité antioxydante des extraits méthanoliques ou de la totalité de l'huile par trois différents tests chimiques (FRAP, DPPH et ABTS).

Approche 2 : Etude *in vivo* sur des souris

Sur un modèle animal de souris de souche Swiss OF1, nous avons testé l'effet protecteur de l'huile d'argane contre la toxicité induite par le fer pendant 28 jours. Dans le but d'évaluer l'effet antioxydant de l'huile d'argane nous avons mesuré l'activité des enzymes de stress (CAT, SOD et GPx) et le taux des marqueurs du stress oxydatif (GSH et MDA) au niveau de trois organes (le foie, les reins et le cerveau). En plus, nous avons visualisé l'intégralité de l'ADN sur des coupes de foie sous le microscope en fluorescence.

Approche 3 : Etude *in vitro* sur le protozoaire *Tetrahymena pyriformis*

Sur un modèle de protozoaire *Tetrahymena pyriformis*, nous avons testé l'effet protecteur de l'huile d'argane contre la toxicité induite par le fer. Ce type de cellule a été choisi comme modèle de système unicellulaire approprié pour les expériences pharmacologiques permettant l'utilisation de marqueurs communs dans les expériences des animaux tels que les enzymes spécifiques et la croissance. En plus, ce modèle cellulaire possède l'avantage de la simplicité, de la rapidité, et du coût faible d'utilisation. En premier lieu, nous avons traité les cellules par le fer afin de déterminer l'IC 50. En second lieu, nous avons mesuré l'activité des enzymes de stress (SOD et GPx) et le taux des marqueurs du stress oxydatif (GSH et MDA).

Approche 4 : Etude *in vitro* sur les fibroblastes MRC5

Sur un modèle de fibroblastes embryonnaires humains MRC-5, nous avons testé l'effet protecteur de l'huile d'argane contre les conditions d'excès d'apport d'oxygène appelé l'hyperoxie. Nous avons évalué l'effet protecteur de l'huile d'argane contre les dommages d'ADN sous le microscope en fluorescence. De plus, nous avons mesuré la capacité de l'huile d'argane sur le piégeage des peroxydes intracellulaires par la sonde dihydrorhodamine 123 en utilisant le cytomètre en flux.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel d'études

Pour évaluer l'effet protecteur de l'huile d'argane contre la toxicité induite par le fer et par l'hyperoxie, plusieurs matériels d'études ont été utilisés pour aborder les différentes parties de sujet de thèse :

- L'huile d'argane a été choisie comme matériel végétal afin d'évaluer son effet sur plusieurs paramètres à savoir l'activité antioxydante, le stress oxydant et l'intégralité de l'ADN. Les effets de l'huile d'argane sont comparés à ceux de l'huile d'olive utilisée comme contrôle positif.

- Les souris ont été choisies pour l'étude *in vivo* afin d'élucider l'effet protecteur de l'huile d'argane au niveau des organes (Cerveau, Foie et Rein) des souris contre la toxicité induite par le fer.

- Les cellules *Tetrahymena pyriformis* et les fibroblastes humains MRC-5 cultivées sous des conditions de stress oxydatif afin d'évaluer le potentiel protecteur de l'huile d'argane.

1. Les huiles

Dans notre thèse, nous avons utilisé l'huile d'argane et l'huile d'olive pour les deux études *in-vivo* et *in-vitro*.

1.1 Origine des huiles

- L'huile d'argane (HA) comestible provient de l'Entreprise Féminine Rurale d'Economie Sociale (**EFAS**) située au village Aghraïsse, province Ait Baha, Agadir, Maroc.

- L'huile d'olive (HO) provient de la coopérative **AZZABA** située au village Azzaba, province Séfrou, Fès, Maroc.

1.2 Procédé de la production des huiles

1.2.1 Huile d'argane

L'huile d'argane utilisée pour les traitements des souris et des cellules provient de la région d'Agadir (Milieu du Maroc). Elle a été préparée par un procédé d'extraction semi-mécanique qui consiste respectivement en dépulpage mécanique des fruits, le concassage de la coque entre deux pierres, la torréfaction de l'amande oléagineuse et le broyage des amandes

torréfiées qui servent à l'extraction de l'huile par la machine de presse. Après extraction de l'huile, cette dernière passe à la machine de filtrage (EFAS, 2019).

1.2.2 Huile d'olive

L'huile d'olive HO est extraite par un broyage des olives afin d'obtenir une pâte, malaxage pendant 25 à 40 minutes, pressage de la pâte et séparation de l'huile par décantation (Azzaba, 2019).

1.3 Stockage des huiles

Les huiles ont été stockées à 4 °C à l'obscurité jusqu'à l'analyse et ont été utilisées entre 1 et 4 mois après leur achat.

2. Les souris

L'étude *in-vivo* a été effectuée sur des souris de souche Swiss OF1 mâles âgées de 12 à 16 semaines, obtenues d'IFFA CREDO (Casablanca, Maroc). Les études sur les souris ont été effectuées à l'animalerie du Laboratoire de Biochimie, Neurosciences, Ressources Naturelles et Environnement, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan Premier, Settat, Maroc.

3. Les lignées cellulaires

3.1 *Tetrahymena pyriformis*

Le premier modèle cellulaire utilisé dans l'étude *in vitro* est le protozoaire cilié *Tetrahymena pyriformis* (*T. pyriformis*), qui est un modèle unicellulaire largement utilisé dans les études physiologiques et toxicologiques (Darcy et al., 2002) grâce à sa culture facile en milieu axénique, sa manipulation facile au laboratoire et sa capacité à atteindre des densités cellulaires élevées (Nilsson, 1989). En outre, ce protozoaire combine la complexité des fonctions eucaryotes cellulaires et des structures comparables à celles trouvées dans les cellules humaines (Yao et al., 2007). Les études sur cette lignée cellulaire ont été effectuées au Laboratoire de Biochimie, Neurosciences, Ressources Naturelles et Environnement, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan Premier, Settat, Maroc.

3.2 *Fibroblastes pulmonaires humains MRC5*

Le deuxième modèle cellulaire utilisé dans la partie *in vitro* est la lignée MRC5 qui est une lignée cellulaire de type fibroblastes pulmonaires embryonnaires humains. C'est le modèle

utilisé par l'équipe de Biosciences Institute *Newcastle University* pour évaluer le stress oxydatif. Cette lignée est largement utilisée dans les études cytotoxiques *in vitro* (Ahmed et., 2008). Les fibroblastes embryonnaires humains MRC5 sont le meilleur modèle cellulaire utilisé pour induire le stress oxydant par l'hyperoxie car cette lignée est dérivée du tissu pulmonaire humain et le poumon est l'organe humain qui est exposé aux concentrations les plus élevées d'oxygène atmosphérique et, par conséquent, il s'est développé des systèmes complexes pour s'adapter aux changements des concentrations d'oxygène (Steinhorn & Lakshminrusimha, 2020). Les études sur cette lignée cellulaire ont été effectuées à Biosciences Institute, Newcastle University, Campus for Ageing and Vitality, Newcastle upon Tyne, United Kingdom.

II. Etude des huiles

1. Analyse des huiles

Elle est bien connue que la composition et les paramètres physico-chimiques de l'huile influencent son effet (Harhar et al., 2010). Pour cela, dans notre étude sur les souris, les cellules MRC5 et les protozoaires *Tetrahymena pyriformis*, nous avons utilisé HA et HO avec une composition en acides gras et des indices de qualité établis et validés respectivement par l'entreprise EFAS et la coopérative AZZABA (Tableau 8 et Tableau 9).

Tableau 8: La composition de l'huile d'argane et l'huile d'olive en acides gras.

D'après (AZZABA, 2019 ; EFAS, 2019)

<i>Acides gras (%)</i>	<i>Huile d'argane</i>	<i>Huile d'olive</i>
<i>C14 :0 (acide myristique)</i>	0.1	0.0
<i>C15 :0 (acide pentadecanoïque)</i>	<0.1	ND
<i>C16:0 (acide palmitique)</i>	12.6	9.7
<i>C17:0 (acide margarique)</i>	0.1	0.0
<i>C17:1 (acide heptadecenoïque)</i>	<0.1	0.1
<i>C18:0 (acide stéarique)</i>	5.8	2.6
<i>C18:1 (acide oléique)</i>	46.3	73.6
<i>C18:2 (acide linoléique)</i>	34.0	11.3
<i>C18:3 (acide linoléinique)</i>	0.1	1.0
<i>C20 :0 (acide arachidique)</i>	0.3	0.3
<i>C20 :1 (acide gadoléique)</i>	0.3	0.4
<i>C22 :0 (acide behénique)</i>	0.1	0.1
<i>C24 :0 (acide lignocérique)</i>	ND ^a	0.2
<i>C18 :1t</i>	ND ^a	0.02
<i>C18 :2t + C18 :3t</i>	ND ^a	0.04

a : non détecté

Tableau 9: Caractéristiques physicochimiques de l'huile d'argane et d'olive.

D'après (AZZABA, 2019 ; EFAS, 2019)

	<i>Huile d'argane</i>	<i>Huile d'olive</i>
<i>Acidité (% d'acide oléique)</i>	0.22	0.28
<i>Indice de peroxyde (meq O₂/kg oil)</i>	2.1	3.2
<i>K232</i>	ND ^a	1.71
<i>K270</i>	0.13	0.15
<i>AK</i>	0.003	0.00
<i>Teneur en eau et matières volatiles (%)</i>	0.02	0.13

a : non détecté

2. Détermination de la teneur en pigments

Les pigments chlorophylles et caroténoïdes ont été déterminés par spectrophotométrie à 670 et 470 nm, respectivement, dans le cyclohexane, en utilisant les coefficients d'extinction spécifiques, $\epsilon = 613$ pour la phéophytine, en tant que composant principal de la fraction chlorophyllienne, et $\epsilon = 2000$ pour la lutéine en tant que composant principal de la fraction caroténoïde selon la méthode proposée (Minguez et al., 1991). Le choix de ces deux longueurs est basé sur la forte absorption de la fraction de la chlorophylle à 670 nm et de la fraction des caroténoïdes à 470 nm.

Ainsi, la teneur en pigments a été calculée comme suit :

$$\text{Chlorophylle (mg kg}^{-1}\text{)} = (A_{670} \times 10^6) / (613 \times 100 \times d)$$

$$\text{Caroténoïde (mg kg}^{-1}\text{)} = (A_{470} \times 10^6) / (2000 \times 100 \times d)$$

Avec

A_{670} : Absorbance à 670 nm

A_{470} : Absorbance à 470 nm

613 : Coefficient d'extinction spécifique de la phéophytine

2000 : Coefficient d'extinction spécifique de la lutéine

d : Largeur de la cuve

3. Extraction des polyphénols totaux

L'extraction des composés phénoliques de chaque huile a été réalisée selon la procédure de **Marfil et al. (2011)**. 2g de l'huile ont été dissoutes dans 1 ml de n-hexane et la solution a été agitée, suivie d'une extraction liquide-liquide utilisant 2 ml de méthanol/eau (80 :20 v/v). Le mélange a été centrifugé à 2800 g pendant 5 minutes, l'extraction a été répétée dans la fraction lipophile, et les fractions méthanoliques ont été mélangées (**Figure 16**).

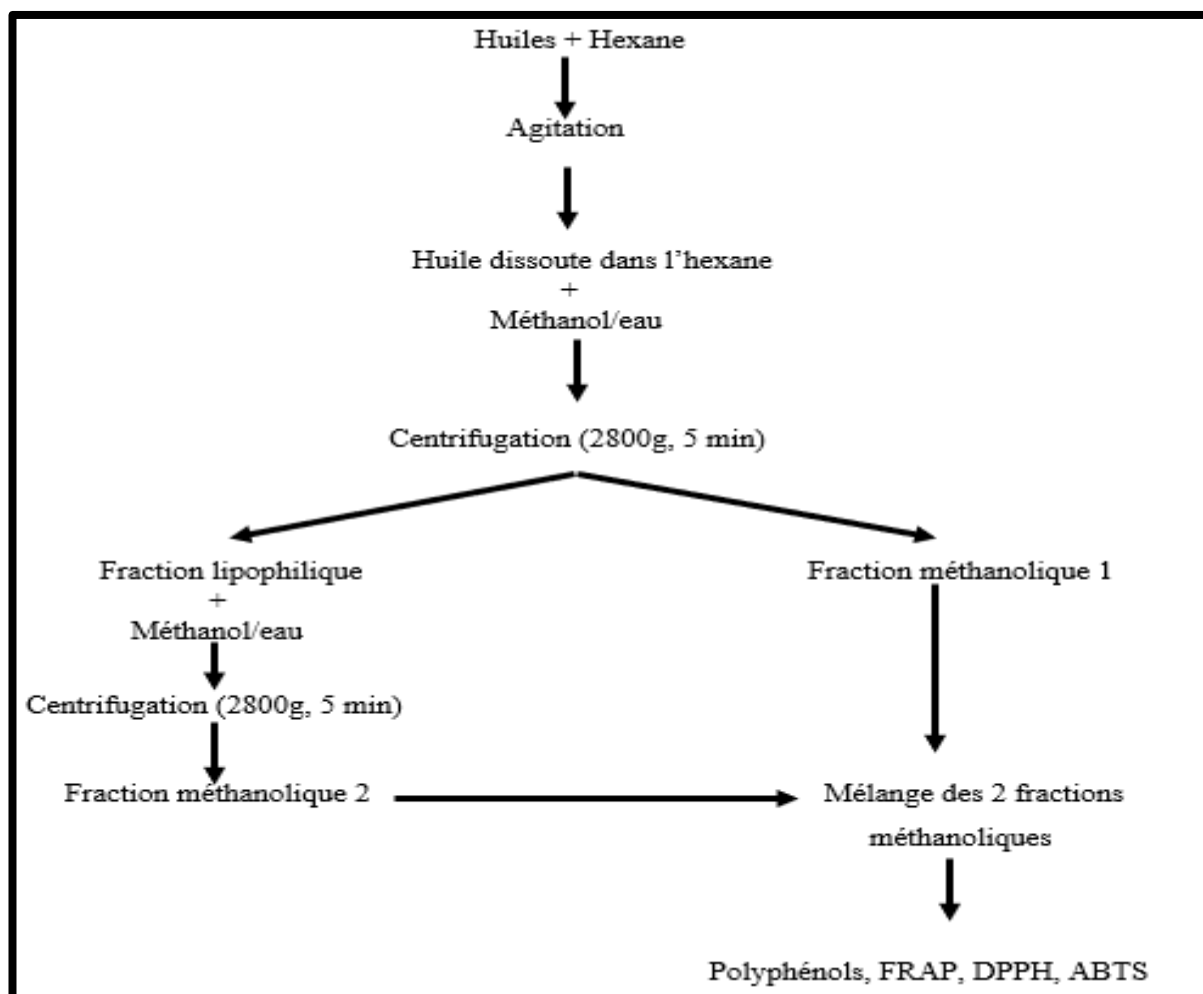


Figure 16: Schéma général de l'extraction des polyphénols totaux à partir de l'huile d'argane et d'olive.

4. Dosage des composés phénoliques

La teneur en polyphénols de la fraction méthanolique a été estimée par la méthode qui utilise le Folin-Ciocalteu (**Sun et al., 2007**)., 100 µl de la fraction méthanolique ont été mélangés avec 900 µl de réactif Folin-Ciocalteu (dilué dans l'eau 1 :10). Après 5 min, on ajoute

750 µl de carbonate de sodium (6% w/v). La solution a été vigoureusement agitée et laissée reposer pendant 90 minutes. L'absorbance a été mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le solvant d'extraction est utilisé pour les témoins à blanc. Toutes les valeurs sont exprimées en mg d'équivalent d'acide gallique par kg d'huile (GAE/kg d'huile).

5. Mesure de l'activité antioxydante des huiles

5.1 Test FRAP

Le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique a été déterminé selon la procédure décrite par **Singleton and Rossi. (1965)**, 500 µl de la fraction méthanolique de l'huile ont été mélangés avec 1,25 ml de tampon de phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 1,25 ml de cyanure ferrique de potassium ($K_3Fe(CN)_6$) (1 %). Le mélange a été incubé à 50 °C pendant 20 min. 1,25 ml d'acide trichloroacétique (10 %) est ajouté pour arrêter la réaction. Le mélange a été centrifugé à 1000g pendant 10 min. 1,25ml du surnageant a été mélangé avec 1,25ml d'eau distillée et 500µl de l'aqueux de $FeCl_3$ (0,1%). L'absorbance est mesurée à 700 nm par un spectrophotomètre. Toutes les valeurs sont exprimées en mmol d'équivalent Trolox par kg d'huile (TE/kg d'huile).

5.2 Test DPPH

L'activité anti-radicalaire de l'extrait d'acétate d'éthyle de l'huile a été estimée avec une adaptation de la méthode de **Koprivnjak et al. (2008)**. 1ml de fraction d'huile (10%) a été ajouté à 4 ml de solution de DPPH (0,1 mM), le mélange est vortexé et placé dans l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance est mesurée à 515 nm par un spectrophotomètre. Toutes les valeurs sont exprimées en mmol d'équivalent Trolox par kg d'huile (TE/kg d'huile).

5.3 Test ABTS

L'analyse antioxydante de l'extrait d'huile méthanolique a été estimée par mesure de la capacité des composés antioxydants à piéger le radical ABTS (2,2-azinobis (3-11 éthybenzothiazoline-6-sulfonate)) par rapport à un antioxydant standard (Trolox) (**Re et al., 1999**). Le radical $ABTS^+$ a été produit par la réaction entre 7 mM d'ABTS et 2,5 mM de persulfate de potassium, dans le tampon de phosphate (5mM, pH 7.4). Le mélange est placé dans l'obscurité pendant 12h. Après, il a été dilué avec le tampon phosphate pour obtenir une absorbance de $0,70 \pm 0,1$ à 734 nm. Toutes les valeurs sont exprimées en mg d'équivalent Trolox par kg d'huile (TE/kg d'huile).

III. Traitements

1. Etude *in vivo* sur les souris

1.1 Conditions d'élevage

Des souris de la souche Swiss OF1 mâles âgées de 12 à 16 semaines ont été obtenues d'IFFA CREDO (Casablanca, Maroc) sont maintenues dans l'animalerie à une température ambiante de $22^{\circ}\text{C} \pm 3$ et un cycle de lumière de 12/12h tout au long de l'expérience. Les travaux sur les souris ont été réalisés selon les recommandations du comité d'éthique de l'université Hassan 1^{er} Settat.

1.2 Traitement

1.2.1 Préparation aqueuse de la solution du fer

La concentration du sulfate de fer (médicament Tardyferon) utilisée dans notre étude est de 3,5 mg Fe^{2+} / litre. Elle a été calculée dans le but de dépasser la concentration normale de ce produit chimique trouvé dans l'eau potable selon l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) qui est inférieur à 0,3 mg/litre (**Organization & Safety, 1996**). En plus, le choix de la dose est basé sur des études préliminaires effectuées dans notre laboratoire. Les souris avaient accès libre à la solution du fer pendant une période du traitement de 28 jours.

1.2.2 Préparation de l'alimentation enrichie par les huiles

120 grammes de granulés par lot destinés à l'alimentation des souris ont été mélangés avec 6% de HA et HO dissoutes dans l'acétone (**El Kebbaj et al., 2015**). L'alimentation de traitement a été séchée sous la hotte pendant 24h pour évaporer l'acétone, puis conservée à $+4^{\circ}\text{C}$ dans des sacs de plastique fermés. Les souris avaient accès libre à l'alimentation enrichie par les huiles pendant la période du traitement.

1.2.3 Conditions de traitement des souris

Les souris ont été réparties en 6 lots soit 3 souris par lot avec un libre accès à la nourriture et à l'eau potable (**Tableau 10**). Le protocole expérimental du traitement des souris avec le sulfate du fer et les huiles (Huile d'argane et d'olive) est schématisé ci-dessous (**Figure 17**). Les souris ont reçu pendant 28 jours une nourriture enrichie à 6 % en huile d'argane ou à 6 % en huile d'olive. En parallèle, les animaux ont accès libre au sulfate du fer dissout dans l'eau potable. Durant la période du traitement, les souris des lots contrôles ont reçu de l'eau potable sans fer et de l'alimentation normale sans aucune huile.

Tableau 10: Les conditions de traitement des souris en présence ou en absence du sulfate du fer avec une alimentation enrichie en huiles (huile d'argane ou d'olive).

	Eau	Alimentation normale	Sulfate de fer (3,5 mg Fe ²⁺ /litre)	Alimentation normale enrichie par l'huile d'argane	Alimentation normale enrichie par l'huile d'olive
Contrôle	+	+			
Argane	+			+	
Olive	+				+
Sulfate de fer		+	+		
Argane+Sulfate de fer			+	+	
Olive+Sulfate de fer			+		+

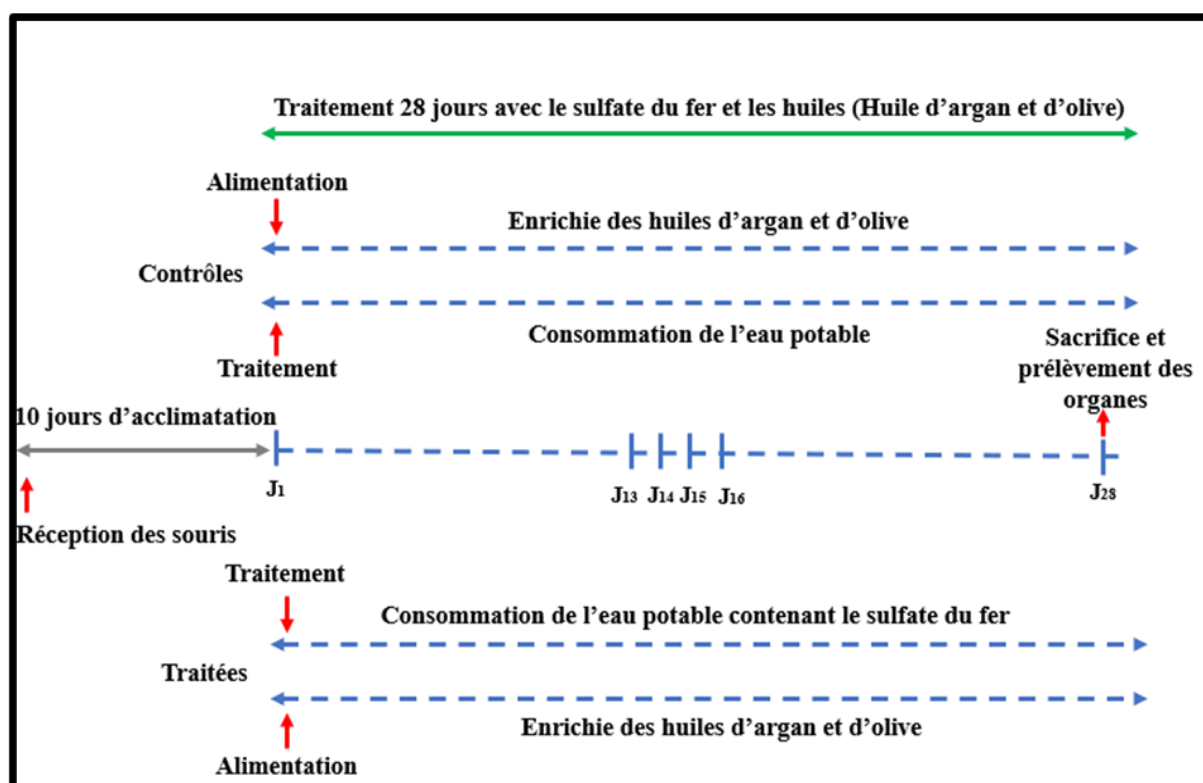


Figure 17: Protocole expérimental du traitement des souris avec le fer et l'huile d'argane et d'olive.

1.3 Sacrifice

À la fin du traitement, les souris sont décapitées et le sang est récupéré puis centrifugé à 4°C à 8000g pendant 2 min pour récolter le sérum. Les organes (foie, reins et cerveau) sont prélevés et lavés immédiatement avec de l'eau physiologique pour les peser et ensuite congelés

rapidement dans la carboglace et stockés à -80°C dans des tubes secs jusqu'à l'utilisation. Un fragment de chaque organe a été fixé dans une solution 4% de formaldéhyde préparé dans le PBS.

1.4 Suivi durant le traitement

1.4.1 Suivi de la masse corporelle et la masse relative des organes

Avant le traitement, chaque souris a été marquée par une couleur sur sa queue afin de suivre l'évolution de la masse corporelle de chaque animal. Au cours du traitement (28 jours), les souris ont été pesées chaque cinq jours. De plus, les organes de chaque souris ont été pesés afin de calculer la masse relative des organes par rapport à la masse totale de l'animal.

1.4.2 Etat général

Tous les animaux ont été observés afin d'évaluer la présence des signes cliniques de la mortalité et/ou de la toxicité aigüe. Les changements dans la posture, la marche et la présence d'un comportement anormal (par exemple : l'automutilation et marche arrière). L'examen macroscopique a été mené sur tous les animaux. Ainsi que les critères d'examens pathologiques bruts étaient fondés sur la position, la forme, la taille, la couleur et la consistance des organes.

1.5 Evaluation de stress oxydant

1.5.1 Préparation de l'homogénat

Pour la préparation de l'homogénat, 4w/v du foie, rein et cerveau sont coupés en petits morceaux avant d'être pré-homogénéisés au Potter dans le tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (50 mM, pH 7,4) puis soniqués à raison de 3 cycles de 30 secondes dans la glace et ensuite centrifugés à 3 000 g pendant 10 minutes à 4°C . Le surnageant récupéré est divisé en plusieurs aliquots de 200 μl puis conservés à -28°C jusqu'à leur utilisation (El Kamouni et al., 2017).

Le dosage des protéines est une étape nécessaire pour calculer l'activité spécifique des enzymes et pour normaliser les résultats afin qu'ils soient comparés. Dans notre étude, le dosage des protéines est fait par spectrophotométrie selon la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951),

Le dosage est effectué en utilisant 5 μl de l'homogénat, l'eau distillée et la solution de Lowry qui est un mélange en raison de 50 :1 de la solution A (4 mg NaOH + 20 mg Na_2CO_3 + 1 ml d'eau) et la solution B (10 mg Potassium sodium tartrate + 5 mg CuSO_4 + 1 ml d'eau). Après 15 min d'incubation à température ambiante, nous avons ajouté la solution de folin 1N puis une autre incubation de 30 min à l'obscurité. Une gamme étalon de 1 à 20 μg de protéines

est effectuée avec une solution de sérum albumine bovine (BSA) (Sigma-Aldrich) à 2 mg/ml (Tableau 11). Dans notre étude nous avons utilisé le spectrophotomètre TECAN (Laboratoire des Sciences et Technologies de la Santé à l'Institut Supérieur des Sciences de la Santé, Université Hassan I, Settat, Maroc). Ce qui a donné la possibilité d'utiliser la microplaque à 96 puits avec un volume final réduit de 200 µl. L'absorbance a été mesurée à 750 nm.

Tableau 11: Le protocole de dosage des protéines selon la méthode de Lowry.

	Blanc	BSA 2 mg/ml						Echantillon
Quantité des protéines (µg)	0	2	4	8	12	16	20	X
Volume de l'échantillon (µl)	0	1	2	4	6	8	10	5
Volume de l'H ₂ O distillée (µl)	30	29	28	26	24	22	20	25
Solution de Lowry (µl)	154							
Incubation (min)	15							
Folin ½ N (µl)	16							
Incubation (min)	30							

1.5.2 Evaluation du stress oxydant :

Afin d'évaluer le stress oxydant au niveau cellulaire, nous avons mesuré l'activité enzymatique de la SOD, la GPx et de la CAT et dosé les marqueurs de stress oxydatif MDA et GSH. Ces mesures ont été réalisées au sein de Laboratoire des Sciences et Technologies de la Santé à l'Institut Supérieur des Sciences de la Santé, Université Hassan I, Settat, Maroc.

a. Mesure de l'activité de la SOD

La SOD catalyse la dismutation des anions superoxydes (O₂^{•-}) pour donner H₂O₂ et l'oxygène moléculaire (O₂) selon la réaction suivante :



L'activité de la SOD a été mesurée comme décrit par **Beyer Jr and Fridovich (1987)**. Le mélange réactionnel contient 50 mM de tampon phosphate, 0,025 % de triton x-100 utilisé comme agent mouillant pour éviter les interactions non spécifiques entre les protéines et éviter ainsi l'agrégation, 0,1 mM d'EDTA, 12 mM de L-méthionine comme donneur d'électrons, 75

mM de NBT (la réduction de NBT est un indicateur de la production d'anions superoxydes), de l'extrait et 2 µM de riboflavine utilisée comme donneur d'anions superoxydes. Les tubes ont été placés 30 cm en dessous d'une lampe de 15 W pendant 10 min pour illuminer la riboflavine en présence de l'oxygène et de la méthionine afin de générer l'anion superoxyde. L'absorbance a été mesurée à 560 nm.

L'activité SOD est mesurée selon la relation suivante :

$$\% \text{ Inhibition} = ((Ac - Ae) / Ac) \times 100$$

Ac : Absorbance du blanc sans homogénat et sans NBT

Ae : Absorbance de l'échantillon

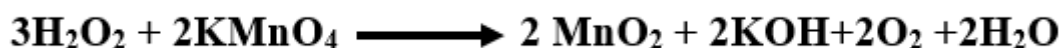
Une unité d'activité de SOD est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber de 50 % la réduction de NBT.

b. Mesure de l'activité enzymatique de la GPx

L'activité du GPx a été mesurée comme décrit par **Mills (1959)**. Le mélange réactionnel contenant 300 µl de l'homogénat a été mélangé avec 300 µl de tampon de phosphate de potassium (0,4 mM, pH 7,0), 200 µl de GSH (2 mM) utilisé comme substrat, EDTA (0,8 mM) et 100 µl d'azide sodium (pour inhiber la catalase) (10 mM) et 100 µl de H₂O₂ (réduit par la GPx) (2,5 mM). Après 10 minutes d'incubation à 37 °C, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 500 µl de TCA (10 %) puis centrifugée à 1500 g pendant 5 min. Ensuite, 200 µl de phosphate de sodium tribasique (0,1 M) et 700 µl de tampon DTNB (pour oxyder le GSH réduit en disulfure GSSG) (0,04 %) ont été ajoutés au surnageant. L'absorbance a été lue à 412 nm après 2 min. L'activité spécifique du GPx a été exprimée en micromoles de GSH par minute par milligramme de protéine.

c. Mesure de l'activité enzymatique de la CAT

L'activité de la CAT a été mesurée (**Ni et al., 2002**) selon la méthode de mesure d'activité enzymatique en point final. Le principe est de mesurer la concentration finale d'H₂O₂, après action de la catalase, par sa réaction avec du KMnO₄. En effet, le permanganate de potassium, de couleur violette, est oxydé en dioxyde de manganèse incolore par l'H₂O₂. La concentration de KMnO₄ restant après réaction totale de l'H₂O₂ est calculée à partir de la mesure de son absorbance à 480 nm.



Le mélange réactionnel de 200 μl contient 10 μl de l'aliquot et 30 μl de la solution H_2O_2 de 7,3 mM. Après 3 minutes d'incubation, la réaction a été arrêtée en ajoutant 20 μl de H_2SO_4 à 6N, puis 140 μl de KMnO_4 à 2 mM ont été ajoutés à l'aide de l'injecteur du spectrophotomètre à plaques car la réaction est rapide. La quantité de substrat H_2O_2 restante est mesurée par titration avec la KMnO_4 . L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 480 nm. L'activité spécifique du CAT a été exprimée en micromoles par minute par milligramme de protéines.

d. Dosage de MDA

Le taux de la peroxydation lipidique a été évalué en mesurant la teneur en malondialdéhyde, qui est un produit de peroxydation lipidique. Le MDA a été déterminé par la réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA) (Ohkawa et al., 1979). 500 μl d'homogénat ont été ajoutés à 500 μl d'acide trichloracétique (TCA) (20 %) pour précipiter les protéines et à 1 ml d'acide thiobarbiturique (0,67 %). Le mélange a été chauffé à 100 °C pendant 15 min, puis refroidi rapidement dans un bain de glace, le n-butanol a été ajouté. Après centrifugation à 3000 g pendant 15 min, l'absorbance du surnageant à 532 nm a été lue (Figure 18). La concentration de MDA a été exprimée en nanomoles de MDA par milligramme de protéine.

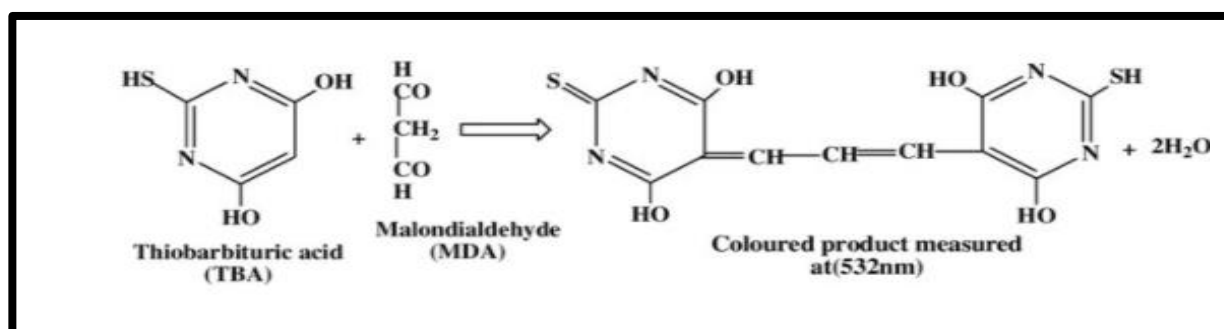


Figure 18: La réaction de la peroxydation lipidique.

Le dosage MDA est exprimé :

$$[\text{MDA}] = A^\circ / \xi \text{ (n mol)}$$

A° : La valeur de l'absorbance à 532 nm

ξ MDA : Coefficient d'extinction molaire du MDA = $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

e. Dosage de GSH

Le GSH est oxydé par le DTNB pour donner le disulfure de glutathion (GSSG) avec la formation stœchiométrique de TNB, selon la réaction :



Le dosage de GSH a été réalisé par la méthode d'**Ellman (1959)**. Le mélange réactionnel contient le TCA (5 %) utilisé pour précipiter les protéines et l'homogénat. Après centrifugation à 12000g pendant 10 min, 50 µl de surnageant ont été ajoutés à 100 µl de DTNB (pour oxyder le GSH réduit en disulfure GSSG) (6 mM) et 850 µl de tampon phosphate de 50 mM, pH 8. L'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie à 412 nm après 5 min.

1.6 Evaluation de l'intégrité de l'ADN

Le fer est connu comme générateur des ERO (**Milic et al., 2016**) en stimulant des dommages au niveau des structures cellulaires à savoir l'ADN (**Bhat et al., 2015**). Pour cela, nous avons étudié l'intégrité de l'ADN suite à l'exposition au fer et d'évaluer la prévention par la consommation de l'huile d'argane.

1.6.1 Préparation des coupes histologiques

La préparation des coupes histologiques a été réalisée sur le foie des souris déjà fixé dans le formol à Biosciences Institute, Newcastle University, Campus for Ageing and Vitality, (Newcastle upon Tyne, Royaume-Uni). Les foies des souris traitées ont été lavés à l'eau puis une déshydratation a été réalisée par des bains successifs d'alcool à des concentrations croissantes 70%, 85%, 90% jusqu'à l'alcool absolu. Ensuite, on passe à l'éclaircissement par le toluène à 100%. L'inclusion des organes s'effectue dans un bain de paraffine fondue pendant 2 heures qui va nous permettre de réaliser des coupes fines et régulières (**Slaoui & Fiette, 2011**). Par la suite, les coupes histologiques de 5 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome (Leica) puis collées sur des lames de verre et mis dans une étuve à 30 °C pendant 3 jours et en enfin colorées.

a. Déparaffinage et recherche antigénique

Des sections (5 µm) du tissu hépatique incorporées dans la paraffine ont été incubées à 60°C pendant 30 minutes, déparaffinées et hydratées dans HistoClear pour enlever la paraffine

pendant 2x10 minutes, réhydratées dans 100 % I, 100 % II, 90 % et 70 % d'éthanol pendant 10 minutes chacune. Les lames ont été immergées dans de l'eau distillée pendant 2x5min. Ensuite, elles ont été placées dans le micro-ondes dans le tampon citrate à haute puissance (100%) et à 40% de puissance pendant 4 min et 10 min respectivement (**Ishaq et al., 2018**).

b. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage utilisant les anticorps et les fluorochromes. Cette technique permet de détecter non seulement la présence ou l'absence d'une protéine spécifique par émission de fluorescence mais aussi sa localisation dans le tissu ou la cellule. Il existe 2 types de marquages. Le 1^{er} est l'immunofluorescence directe qui utilise un seul anticorps couplé à un fluorochrome dirigé contre la protéine d'intérêt et le 2^{ème} type est l'immunofluorescence indirecte qui est utilisé dans cette étude. Ce type consiste à utiliser 2 anticorps. Le premier reconnaît la protéine recherchée et le 2^{ème} anticorps est couplé à un fluorochrome et spécifique pour le 1^{er} anticorps (**Im et al., 2019**).

La coloration d'immunofluorescence des sections de tissu paraffin-incorporé a été effectuée selon la méthode de **Ishaq et al. (2018)** :

- Laver dans le PBS ;
- Bloquer avec la solution de blocage (5 % de sérum de chèvre normal (NGS) et 1 % de BSA dans le PBS) pendant 60 minutes à température ambiante.
- Rincer et bloquer avec avidine pendant 15 minutes.
- Laver et bloquer avec de la biotine pendant 15 minutes.
- Incuber pendant la nuit avec un anticorps primaire monoclonal de lapin dirigé contre la protéine d'intérêt γ H2A.X (#9718, Cell Signaling Technologies, USA) dilué dans une solution de blocage à 4 °C.

γ H2A.X : H2AX (famille des histones H2A, membre X) est un gène codant pour l'histone H2A. En réaction aux coupures double-brin de l'ADN, H2AX est phosphorylée au niveau de la sérine 139, appelée alors gamma- H2AX (γ H2A.X).

- Laver 3 fois dans le PBS pendant 5 minutes chacun.
- Incuber dans un anticorps secondaire biotinylé dirigé contre le 1^{er} anticorps, dilué dans une solution de blocage pendant 30 minutes.
- Laver 3 fois dans le PBS pendant 5 minutes chacun.
- Incuber avec avidine diluée dans PBS pendant 30 minutes.
- Laver 3 fois dans PBS pendant 5 minutes chacun.

- Marquer les noyaux au DAPI et laver dans le PBS pendant 10 minutes.
- Appliquer une solution anti-décoloration Vectashied (Vector Laboratories, États-Unis) et déposer le couvre lame.
- Placer à plat au réfrigérateur à 4°C jusqu'à la lecture au microscope en fluorescence.

c. Comptage des foyers de dommages d'ADN par Image J

Après avoir été visualisés sous le microscope à fluorescence (Leica DMi8, Leica Microsystems, Allemagne), 5 différents champs de chaque coupe (étiquetée sur le côté de la lame) ont été capturés et les images ont été analysées par le logiciel Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). La distribution spatiale et le nombre moyen de foyers de dommages d'ADN dans le noyau cellulaire ont été comptés.

1.7 *Evaluation de l'inflammation et du vieillissement*

1.7.1 **Extraction d'ARN**

L'extraction des ARN totaux a été réalisée, à partir du foie des souris obtenu après traitement, en utilisant le kit d'extraction RNeasy (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

- Le kit est composé de trois tampons :
- Tampon RLT
 - Tampon RW1
 - Tampon RPE

L'extraction se déroule comme suit :

- Ajouter au tissu 600µl de tampon RLT (lyse les cellules et inhibition des activités RNAases).
- Ajouter 600 µl d'éthanol 70% et bien mélanger.
- Déposer 700µl de lysat cellulaire sur une mini-colonne RNeasy Spin.
- Centrifuger pendant 15 secondes à température ambiante et à une vitesse de 8000g. (Fixation des ARN totaux sur la colonne).
- Ajouter 700µl de tampon RW1 sur la colonne (lavage).
- Centrifuger pendant 15 secondes à température ambiante et à une vitesse de 8000g.
- Ajouter 500µl de tampon RPE sur la colonne.
- Centrifuger pendant 15 secondes à température ambiante et à une vitesse de 8000g.
- Centrifuger pendant 1 minute à une vitesse de 8000g pour s'assurer que la colonne soit sèche. Si du liquide se retrouve dans le tube, centrifuger pour une autre minute.

- Déposer au centre de la colonne 30µl de RNAase-free water ou H₂O milliQ pour éluer les ARNs.

- Centrifuger pendant 1 minute à 8 000 g.
- Entreposer l'ARN dissout à -80° C.

1.7.2 Dosage d'ARN

La concentration d'ARN totaux a été mesurée par Nanodrop (ND-1000) (Thermo Fisher, UK). Le rapport DO₂₆₀/DO₂₃₀ doit être compris entre 2 et 2,2 unités d'absorbance. Le rapport 260/230 est utilisé pour indiquer la présence de composés organiques indésirables tels que le trizol, le phénol, la guanidine HCL et le thiocyanate de guanidine. Le rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀ doit être compris entre 2 et 2,2 unités d'absorbance car au-dessous de 2, une contamination par les protéines ou le phénol est à redouter.

1.7.3 RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

1 µg d'ARN totaux a été ajouté aux amorces (Thermo Fisher Scientific) et rempli jusqu'à 11 µl d'eau sans ARNase. L'ARN a été dénaturé pendant 7 minutes à 75 °C dans un thermocycleur. Après refroidissement, 4 µl de First Strand buffer (Invitrogen), 2 µl de DTT 0,1 M (Invitrogen), 1 µl de mélange de dNTP 10 mM, 1 µl d'inhibiteur de l'ARNase et 1 µl de transcriptase inverse (Invitrogen) ont été ajoutés aux échantillons. Le mélange de transcriptase inverse a été incubé à 42 °C dans un thermocycleur pendant 90 min et inactivé à 95 °C pendant 5 min. L'ADNc a été stocké à -80 °C.

1.7.4 qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

L'ADNc a été amplifié à l'aide du kit SensiFAST SYBR HiROX (Bioline).

La réaction de qPCR se déroule comme suit :

- Pour chaque puit sur une plaque qPCR à 96 puits (Applied Biosystems, États-Unis), 5 µl de SYBR Green (SensiFAST SYBR Hi-ROX kit, Bioline, UK).
- 0,5 µl des amorces sens et antisens à 10 µM, diluées 1 :10 dans de l'eau sans nucléase a été mis dans chaque puit.
- 3 µl d'eau sans nucléase ont été ajoutés à un tube de centrifugeuse de 500 µl.
- 9 µl de ce mélange ont été ajoutés à chaque puit, ainsi que 1 µl d'ADNc de l'échantillon.

- L'amplification a été réalisée avec le programme suivant : 1 cycle à 95 °C pendant 2 min, 50 cycles à 95 °C pendant 5 s et 60 °C pendant 30 s, 1 cycle à 95 °C pendant 15 s, 60 °C pendant 1 min et 95 °C pendant 15 s.

-L'expression génique a été quantifiée en utilisant des valeurs de cycle seuil (Thershold Cycle, Ct) et normalisée par le gène de référence, GAPDH, codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase.

-L'expression quantitative du gène a été déterminée selon $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec $\Delta Ct = (Ct \text{ du gène étudié}) - (Ct \text{ du gène GAPDH})$. Toutes les réactions de PCR ont été effectuées sur un système de PCR en temps réel (Step One Plus Real-Time PCR-System). Les séquences d'amorces sens et antisens utilisées pour le gène de référence sont résumées dans le **Tableau 12** :

Tableau 12: Séquence du gène de référence utilisé dans la qPCR.

Amorces	Séquence sens	Séquence antisens
GAPDH	GAACGGGAAGCTCACTGGC	GACAACCTGGTCCTCAGTGT

1.7.5 Evaluation de l'inflammation et de la sénescence cellulaire

Afin d'étudier l'effet anti-inflammatoire et anti-sénescence des huiles (HA et HO), nous avons évalué l'expression relative des ARNm des marqueurs d'une part, de l'inflammation (Cyclooxygénase (COX-2), Interleukine-6 (IL-6), Facteur de nécrose tumorale (TNF α)) et Interleukine-1 β (IL-1 β). Et d'autre part, des marqueurs de la sénescence cellulaire p16 et p21 (**Tableau 13**).

Tableau 13: Séquences des différentes amorces utilisées pour la qPCR.

Amorces	Séquence sens	Séquence antisens
COX-2	CCAGCACTTCACCCATCAGTT	ACCCAGGTCCTCGCTTATGA
IL-6	TGTATGAACAACGATGATGCACTT	ACTCTGGCTTTGTCTTTCTTGTTATCT
TNF-α	ACGTGGAAGTGGCAGAAGA	CTCCTCCACTTGGTGGTTTG
IL-1β	ACGAATCTCCGACCACCACT	CCATGGCCACAACAACACTGAC
p16	CCCAACGCCCGAACT	GCAGAAGAGCTGCTACGTGAA
p21	GCCTTAGCCCTCACTCTGTG	AGCTGGCCTTAGAGGTGACA

2. Etude *in vitro* sur le protozoaire *Tetrahymena pyriformis*

2.1 Culture cellulaire

T.pyriformis a été fournie par le Laboratoire de Physiologie et de Génétique Moléculaire, Département de Biologie, Faculté des Sciences Ain Chock, Université Hassan II-Ain Chock, Casablanca, Maroc. Le milieu de culture (PPYG) de *T. pyriformis* contient 0,4 % de protéose peptone, 0,2 % d'extrait de levure et 1 % de glucose (Mori et al., 2011). Le milieu de culture et les consommables sont stérilisés à 120 °C avant l'utilisation. Pendant la croissance, les cellules entrent dans la phase exponentielle avec une densité élevée, puis une phase de croissance pré-stationnaire suivie d'une phase stationnaire (Nilsson, 1981). Dans notre étude, les cultures cellulaires ont toujours été réalisées en phase exponentielle dans un nouveau milieu frais avant chaque traitement. Les tests commencent toujours avec des densités initiales d'au moins 10^4 cellules par ml.

2.2 Traitements

2.2.1 Traitement et détermination de l'IC50 du fer

La courbe de croissance de *T. pyriformis* a été réalisée pour obtenir des densités cellulaires adéquates pour le traitement avec différentes concentrations de sulfate de fer. La densité cellulaire a été déterminée à l'aide d'un hémocytomètre et d'un microscope optique.

Après 24h de culture, différentes concentrations de sulfate de fer (de 0,3 à 4 mM préparé dans l'eau distillée stérile) ont été ajoutées au milieu. L'eau distillée stérile a été utilisée comme témoin, et les cellules ont été conservées dans l'étuve à 28 °C pendant 24 heures, et l'IC₅₀ a été déterminée.

2.2.2 Traitement par les huiles

Une solution mère d'HA et d'HO a été préparée à 10% (v/v) dans l'éthanol absolu. Pour le traitement cellulaire, la concentration finale de l'huile et de l'éthanol dans le milieu était de 0,1 % et de 0,9 % respectivement (**Badreddine et al., 2017**). Les cellules ont été traitées en présence de sulfate du fer à l'IC₅₀ dans le milieu enrichi par HA ou HO, ajouté 2 h avant le traitement avec FeSO₄.

2.2.3 Evaluation du stress oxydant

a. Préparation de l'homogénat

Pour mesurer le stress oxydatif au niveau cellulaire, la récupération des cellules s'effectue par centrifugation à 6000 g pendant 10 min à 4°C, Ensuite, 1ml de tampon phosphate (KH₂PO₄ ; K₂HPO₄; pH7,4) à 50mM est ajouté au culot contenant les cellules. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un homogénéiseur (Heidolph DIAX 600). La solution est ensuite centrifugée à 15000g pendant 5 min à 4°C. Le surnageant obtenu représente l'extrait protéique brut qui est stocké à -80°C. L'extrait protéique brut servira aux dosages éventuels des activités enzymatiques

b. Dosage des protéines, mesure de l'activité enzymatique de la SOD et la GPx, dosage de MDA et de GSH

Le dosage des protéines a été réalisé comme précédemment décrit dans la partie III-1-1.5-1.5.1.

L'activité enzymatique de la SOD et de la GPx a été mesurée comme précédemment décrite dans les parties III-1-1.5-1.5.2-a et III-1-1.5-1.5.2-b respectivement.

Le dosage de MDA et de GSH a été réalisé comme précédemment décrit dans les parties III-1-1.5-1.5.2-d et III-1-1.5-1.5.2-e respectivement.

3. Etude *in vitro* sur les fibroblastes pulmonaires humains MRC5

3.1 Culture cellulaire

Les cellules MRC-5 sont le deuxième modèle cellulaire *in-vitro* utilisé dans cette étude. Cette lignée cellulaire est largement utilisée dans les études cytotoxiques. Les cellules MRC-5 ont été cultivées dans le milieu de culture DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF), pénicilline/ streptomycine et 2 mM de glutamine (**Ahmed et al., 2008**). Ce milieu de base DMEM contient des nutriments indispensables à la survie cellulaire, des ions minéraux, des cofacteurs, des vitamines, des acides aminés et du glucose. Le SVF est un sérum largement utilisé en culture cellulaire favorisant la survie et la multiplication cellulaire. Les composants majeurs de SVF sont les protéines albumine de sérum. Afin d'éviter la contamination bactérienne, un mélange d'antibiotiques (pénicilline/ streptomycine) a été rajouté au milieu de culture. La culture cellulaire se réalise dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. L'incubation se fait dans un incubateur permettant le contrôle et le réglage de la température (37°C), la concentration de CO₂ (5%) et d'O₂ (40%).

3.2 Traitement

Des solutions mères de l'huile d'argane et d'olive ont été préparées à 10% (v/v) dans de l'éthanol absolu. Pour le traitement cellulaire, la concentration finale dans le milieu des huiles et de l'éthanol est 0,1% et 0,9% respectivement (**Badreddine et al., 2017**). Cette condition de dilution permet une solubilisation maximale de l'huile et n'affecte pas l'activité cellulaire (viabilité cellulaire, statut Redox et l'activité organelle (**Leoni et al., 2017**)). Après 24 heures de culture cellulaire, les huiles ont été ajoutées à 0,1% et les cellules sont cultivées pendant une semaine sous des conditions d'hyperoxie (40% d'oxygène). Après une semaine du traitement, les cellules ont été fixées avec 4% de paraformaldéhyde pendant 10 minutes à température ambiante.

3.3 Evaluation de l'intégrité de l'ADN

3.3.1 Immunofluorescence

Après avoir été lavées dans le PBS, les cellules ont été bloquées avec 5 % de sérum de chèvre normal (NGS) et 1 % de BSA dans le PBS pendant 30 minutes à température ambiante. Les échantillons ont été incubés avec un anticorps primaire monoclonal de lapin dirigé contre γ H2A.X (#9718, Cell Signaling Technologies, USA) dilué dans la solution de blocage pendant

1 heure à température ambiante. Ils ont été lavés 3 fois dans PBS pendant 5 minutes chacun. Les échantillons ont été incubés avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin (Alexa Fluor 488) (A11008, Molecular Probes, UK) dilué dans une solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante dans l'obscurité. Ils ont été lavés 3 fois dans le PBS pendant 5 minutes chacun. Les noyaux ont été marqués avec DAPI (Partec, Allemagne) pendant 10 minutes à température ambiante. Les échantillons ont été lavés dans le PBS pendant 10 minutes. Une solution anti-décoloration Vectashied (Vector Laboratories, États-Unis) a été appliquée et le couvre-lame a été déposé. Les lames ont été placées à plat au réfrigérateur à 4°C jusqu'à la lecture. Les images ont été visualisées et capturées sous un microscope à fluorescence (Leica DMI8, Leica Microsystems, Allemagne), puis analysées à l'aide d'Image J.

3.3.2 Comptage des foyers de dommages d'ADN

Le comptage des foyers de dommages d'ADN par Image J a été fait comme précédemment décrit dans la partie de comptage des foyers *in vivo*.

3.3.3 Mesure des peroxydes intracellulaires

La mesure des peroxydes intracellulaire a été faite par la cytométrie en flux qui permet la mesure des caractéristiques individuelles de chaque particule. 2 types de signaux sont mesurés par le cytomètre. Le 1^{er} signal renseigne sur les propriétés optiques intrinsèques des particules telles que la taille, la forme et la complexité. Le 2^{ème} signal renseigne sur les propriétés optiques induites de fluorescence par des marquages spécifiques de structures ou fonctions cellulaires (Hézarid et al., 2007). Les peroxydes intracellulaires sont détectés par la dihydrorhodamine 123 (DHR 123) qui s'oxyde en rhodamine 123 en présence des peroxydes. La sonde ne peut plus alors traverser la membrane plasmique et reste piégée dans la cellule. Les cellules ont été trypsinées, centrifugées et remises en suspension dans un milieu sans sérum (SF) DHR 123 de 30 µM. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, les cellules ont été recueillies par centrifugation, le surnageant a été rejeté et les cellules ont été remises en suspension dans 3 ml de milieu SF. Des cellules non colorées ont été préparées comme témoins négatifs pour mesurer l'autofluorescence. Les cellules ont été mesurées par un cytomètre en flux (Partec, Muenster, Allemagne) étalonné avec des billes de Polybrite de 3 µm (Sysmex, Muenster) au filtre 1 (FL1). Les cellules non traitées sont considérées comme témoins positifs et ont été fixées à 100% (Saretzki et al., 2008).

3.3.4 Analyse morphologique

La morphologie des cellules MRC5 a été étudiée en plaques de 6 puits après 3 et 7 jours d'addition des huiles à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Leica) équipé d'une caméra afin de digitaliser les images. Ce microscope permet d'observer des échantillons avec un contraste faible ou nul qui ne peuvent être observés avec un microscope à fond clair. Le contraste permet d'observer les organismes à l'état vivant sans les colorer.

IV. Analyse statistique

Les analyses statistiques des données ont été faites par le test t-test et ANOVA (Tukey ou Dunn comme post-hoc). Les différences sont considérées significatives si la valeur du p-value est inférieure ou égale à 0,05 (* pour une p-value ≤ 0.05 ; ** pour une p-value ≤ 0.01 ; *** pour une p-value ≤ 0.001). L'analyse statistique a été effectuée avec le logiciel informatique GraphPad Prism 8.

RESULTATS

I. Dosage des polyphénols et des pigments de l'huile d'argane

L'huile d'argane est une huile naturelle caractérisée par une composition particulière, avec une prédominance des acides gras insaturés ainsi qu'une fraction insaponifiable très riche en antioxydant tels que les stérols, les tocophérols, les phénols, les pigments caroténoïdes et chlorophylliens (**Badreddine et al., 2017; Ben Mansour et al., 2018; El Kharrassi et al., 2018; Guillaume et al., 2019**).

L'huile d'argane contient deux principaux pigments qui sont: les chlorophylles et les caroténoïdes qui sont connus par leur potentiel antioxydant (**El Monfalouti et al., 2012**).

De plus, la fraction phénolique de l'huile d'argane est caractérisée par la présence de quatre principaux polyphénols, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide férulique et le tyrosol (**Rueda et al., 2016**). En raison de leur nature chimique, ces composés ont des propriétés antioxydantes (**Marfil et al., 2011**).

Vu la composition particulière de l'huile d'argane en composés phénoliques et pigments connus par leur capacité antioxydante. Nous nous sommes focalisés dans cette partie de thèse à mesurer la teneur en pigments et en polyphénols dans l'huile d'argane et aussi d'évaluer le potentiel antioxydant de ces derniers par trois différents tests (FRAP, DPPH, ABTS).

1. Chlorophylles et caroténoïdes

Les chlorophylles et les caroténoïdes sont les principaux pigments des huiles végétales. Leur teneur totale dans l'huile d'argane est un paramètre de qualité important, car elle est corrélée avec la couleur, qui est l'une des premières caractéristiques évaluées par les consommateurs. Ces pigments agissent comme pro-oxydants en présence de lumière et comme antioxydants dans l'obscurité (**Psomiadou & Tsimidou, 2002**).

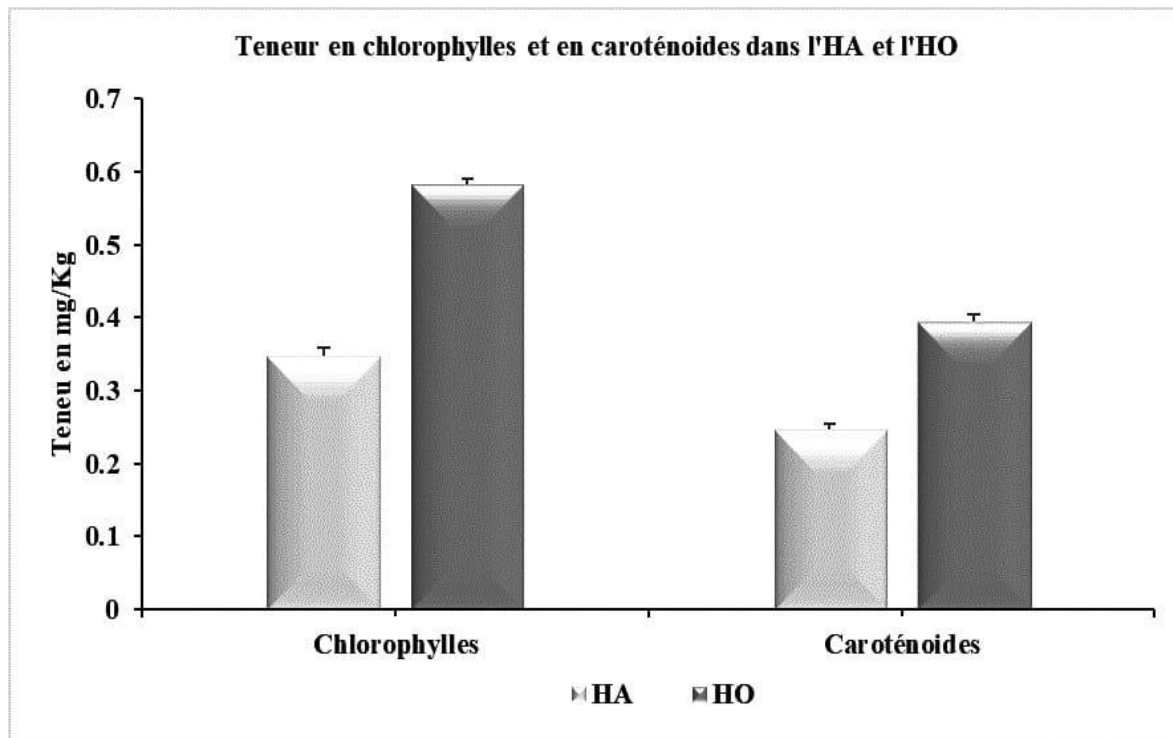


Figure 19: Mesure de la teneur en chlorophylles et caroténoïdes dans l'huile d'argane et d'olive.

Les données représentent la moyenne \pm écartype de trois essais différents.

Les résultats de l'évaluation de la teneur en chlorophylles et caroténoïdes (**Figure 19**) ont montré que l'HO contient des quantités plus élevées avec 0,58 et 0,39 mg/Kg respectivement que HA avec 0,34 et 0,24 mg/Kg.

2. Polyphénols

Le dosage des polyphénols a été évalué par la méthode de Folin-Ciocalteu. C'est une méthode souvent conçue pour la détermination de la teneur en polyphénols dans les huiles. La lecture de la densité optique permet de déterminer la teneur en polyphénols en se référant à la courbe d'étalon tracée à partir des concentrations connues de l'acide gallique (exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique/ Kg de l'huile). L'acide gallique est le standard le plus souvent utilisé dans cette méthode (**Mikolajczak et al., 2021**).

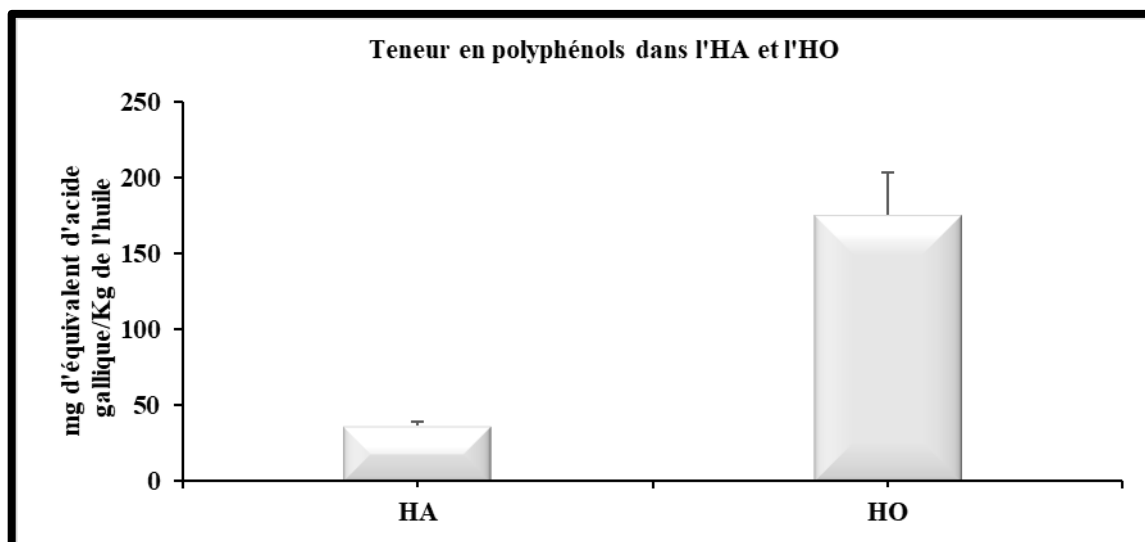


Figure 20: Mesure de la teneur en polyphénols totaux dans l'huile d'argane et d'olive. L'acide gallique a été utilisé comme standard. La teneur en polyphénols a été représentée en mg d'équivalent d'acide gallique par kg de l'huile (GAE/kg d'huile). Les données représentent la moyenne \pm écartype de trois essais différents.

L'évaluation de la teneur en polyphénols a révélé (**Figure 20**) la richesse de l'HO en polyphénols avec une teneur (175,911 mg de GAE/kg) de 5 fois plus par rapport à l'HA (36,237 mg de GAE/kg).

Au vu des résultats obtenus lors de ces deux essais, l'HO est riche en chlorophylles, caroténoïdes et en polyphénols par rapport à l'HA. Tous ces composés ont des propriétés antioxydantes (**Marfil et al., 2011; El Monfalouti et al., 2012**). Dernièrement, il y a un intérêt croissant dans les études de l'activité antioxydante des aliments en raison des implications connues des radicaux libres dans le développement des maladies (**Garcia, 2008**). A cet égard, nous avons décidé d'évaluer et confirmer leur propriété antioxydante par 3 tests : FRAP, DPPH et ABTS.

3. Activité antioxydante des huiles

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. En effet, les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) et superoxydes ($\text{O}_2\bullet$). L'activité antioxydante ne peut pas être mesurée directement, mais plutôt par les effets de l'antioxydant contre l'oxydation (**Antolovich et al., 2002**). Pour évaluer les propriétés antioxydantes des huiles utilisées dans notre étude, nous avons choisi trois méthodes : les tests

FRAP, DPPH et ABTS. Ces dernières sont standardisées par rapport au Trolox qui est un analogue hydrophile de la vitamine E, il s'agit d'un antioxydant largement utilisé pour lutter contre les dommages induits par le stress oxydant.

3.1 FRAP

Cette méthode mesure la capacité de l'antioxydant à réduire le fer ferrique en forme ferreuse (Moharram & Youssef, 2014).

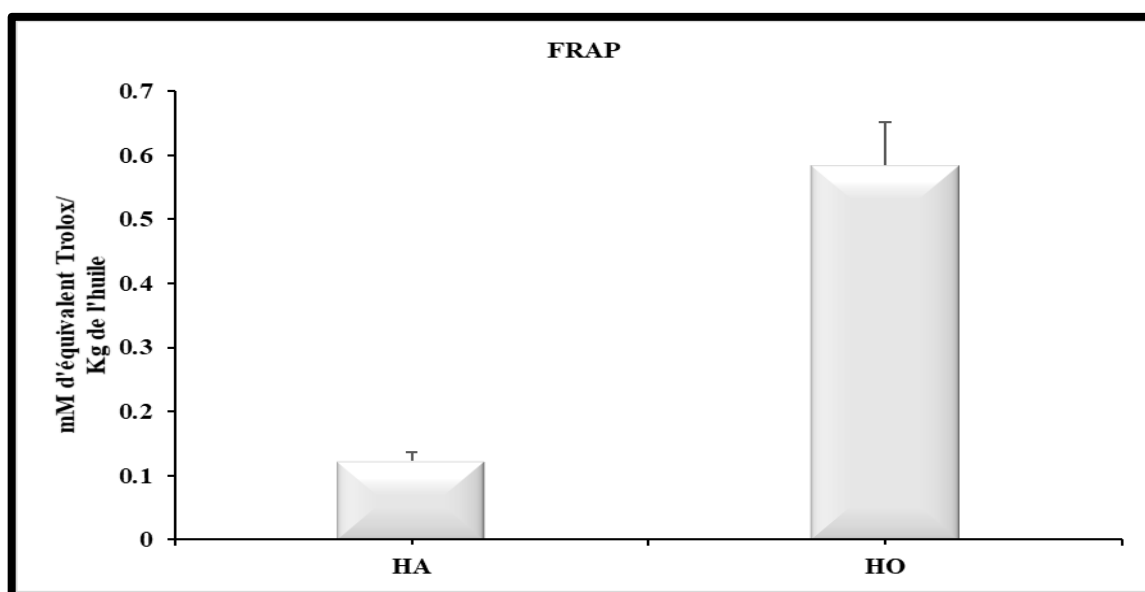


Figure 21: Mesure du pouvoir réducteur du fer par le test FRAP dans l'huile d'argane et d'olive.

Le test FRAP utilise Trolox comme standard. Les données sont exprimées en mmol d'équivalent Trolox par kg de l'huile (TE/kg d'huile), FRAP : Le pouvoir antioxydant/ réducteur du fer. Les données représentent la moyenne \pm écartype de trois essais différents.

L'évaluation du potentiel réducteur du fer par le test FRAP (**Figure 21**) a montré que l'HO (0,683) est dotée d'un pouvoir chélateur du fer beaucoup plus par rapport à l'HA (0,123) soit 5,6 fois plus élevé.

En comparant les résultats de la teneur en polyphénols avec ceux du test FRAP, on constate une corrélation positive puisqu'il s'agit de la même tendance de variation. En effet, l'HO contient 5 fois plus de polyphénols et elle a un pouvoir antioxydant 5,6 fois plus élevé par rapport à l'HA.

3.2 DPPH

C'est une méthode spectrophotométrique permet de mesurer le pouvoir antiradicalaire des antioxydants à réduire le radical DPPH (Moharram & Youssef, 2014).

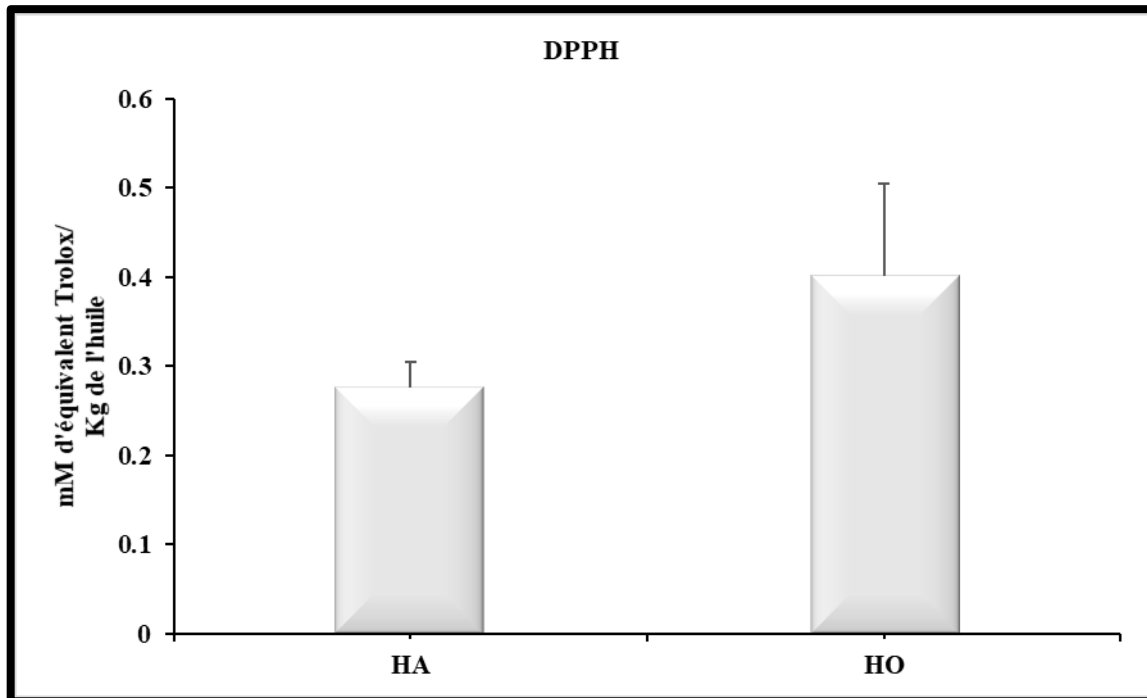


Figure 22: Mesure de l'activité de piégeage des radicaux libres par le test DPPH dans l'huile d'argane et d'olive.

Le test DPPH utilise Trolox comme standard. Les données sont exprimées en mmol d'équivalent Trolox par kg de l'huile (TE/kg d'huile), pour cette méthode DPPH : 2,2'-diphényl-1- picrylhydrazyl. Les données représentent la moyenne \pm écartype de trois essais différents.

Les résultats obtenus (**Figure 22**) montrent que l'HO a une activité de piégeage du radical DPPH plus élevée avec 0,401 mM TE/kg d'huile que celle de l'HA avec 0,275mM TE/kg d'huile.

3.3 ABTS

Cette méthode se base sur la mesure de potentiel des antioxydants à réduire le radical chimique ABTS^{•+} (Moharram & Youssef, 2014).

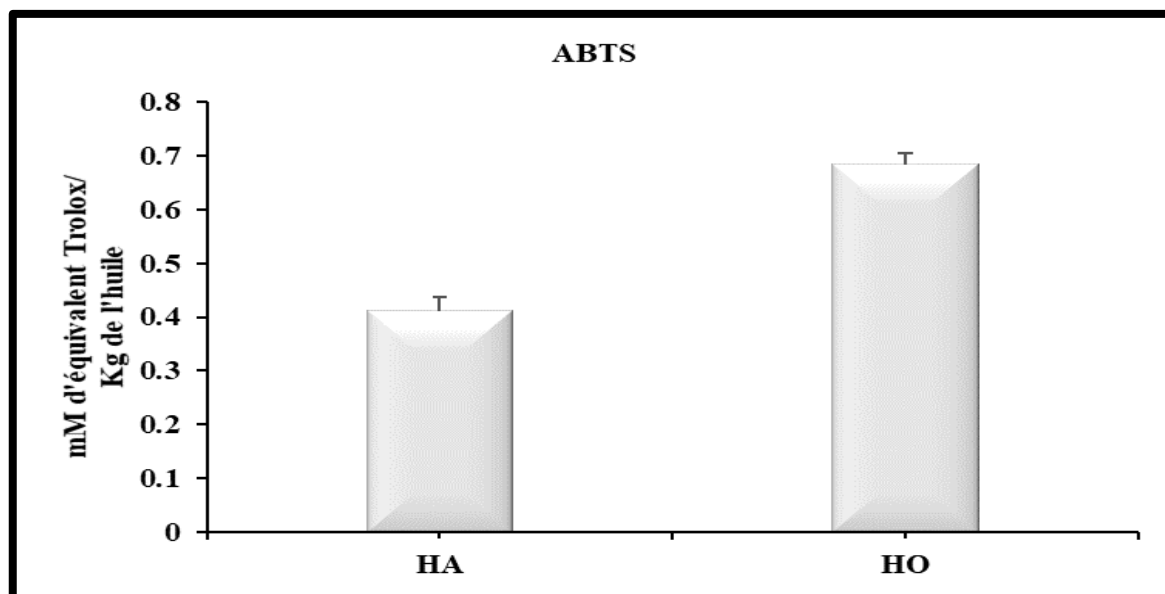


Figure 23: Mesure de l'activité de piégeage des radicaux libres par le test ABTS dans l'huile d'argane et d'olive.

Le test ABTS utilise Trolox comme standard. Les données sont exprimées en mmol d'équivalent Trolox par kg de l'huile (TE/kg d'huile), ABTS: 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonate). Les données représentent la moyenne \pm écartype de trois essais différents.

La mesure de l'activité de piégeage des radicaux libres (**Figure 23**) a suivi la même logique des résultats précédents avec une forte activité de l'HO (0,683 Mm TE/kg d'huile) par rapport à l'HA (0,411 Mm TE/kg d'huile).

Vue d'ensemble des résultats de la teneur en polyphénols des huiles et leurs activités antioxydantes par les 3 méthodologies citées précédemment. On note une corrélation positive entre le pouvoir chélateur du fer (FRAP) et la teneur en polyphénols. En effet, le rapport HO à HA calculé par essai FRAP (5,6 fois) semble être plus corrélé au rapport de la teneur totale en polyphénols (5 fois). Pendant que la teneur en polyphénols de HO était 5 fois plus élevée que celle de HA, son pouvoir antioxydant n'était que de 1,5 (DPPH) et 1,7 (ABTS) fois supérieur par rapport à l'HA. Les résultats de DPPH et ABTS ne sont pas corrélés aux ceux des polyphénols. La conclusion qu'on peut tirer c'est que l'HA a un potentiel antioxydant puissant (DPPH et ABTS) même en présence d'une faible teneur de polyphénols.

Les données précédentes rapportent que l'HA et l'HO ont des propriétés antioxydantes du fer vu leur teneur en composés phénoliques. Par conséquence, la susceptibilité d'avoir un effet antioxydant augmente ce qui nous a poussé à évaluer et à confirmer ces effets *in-vivo* et *in vitro*.

II. Etude *in vivo*

Le fer est un métal connu par sa capacité à induire le stress oxydatif via la formation des ERO (**Khalid et al., 2020**) en stimulant des dommages oxydatifs aux protéines, lipides et acides nucléiques. On peut penser aussi que le fer est un inducteur de sénescence cellulaire puisqu'il existe une relation entre la sénescence cellulaire et le stress oxydatif (**Nakamura et al. 2019**). Également, l'effet inflammatoire du fer a été bien rapporté (**Das et al., 2016**). Pour contrer l'effet délétère du fer, un apport en antioxydant est demandé car l'effet bénéfique des antioxydants contre l'effet nocif des ERO a été bien établi (**El-Mostafa et al., 2014**).

Dans le contexte de notre étude, les souris ont été traitées par le fer. Simultanément, l'huile d'argane et l'huile d'olive sont ajoutées au régime alimentaire. Ces deux huiles naturelles sont riches en acides gras mono et polyinsaturés et ont un pouvoir antioxydant. Par conséquent, l'administration de ces huiles est susceptible d'avoir des effets antioxydants, anti inflammatoires et anti-sénescences contre la toxicité du fer chez les souris.

1. Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'évolution de la masse corporelle des souris

Les changements de la masse corporelle sont des indicateurs de sensibilité pour la détection des effets indésirables des médicaments et des produits chimiques (**Bailey et al., 2004; Tofovic & Jackson, 1999**). Pour évaluer les effets du fer ainsi que les huiles sur la masse corporelle, les souris ont été pesées 6 fois au cours de 28 jours du traitement. Les masses corporelles individuelles ont été enregistrées avant, pendant et à la fin de l'expérience. Au jour du sacrifice, tous les animaux ont été observés afin d'évaluer la présence des signes cliniques de la mortalité et/ou de la toxicité aigüe. En plus, les changements dans la posture, la marche et la présence d'un comportement anormal (par exemple, l'automutilation, marche arrière) ont été enregistrés.

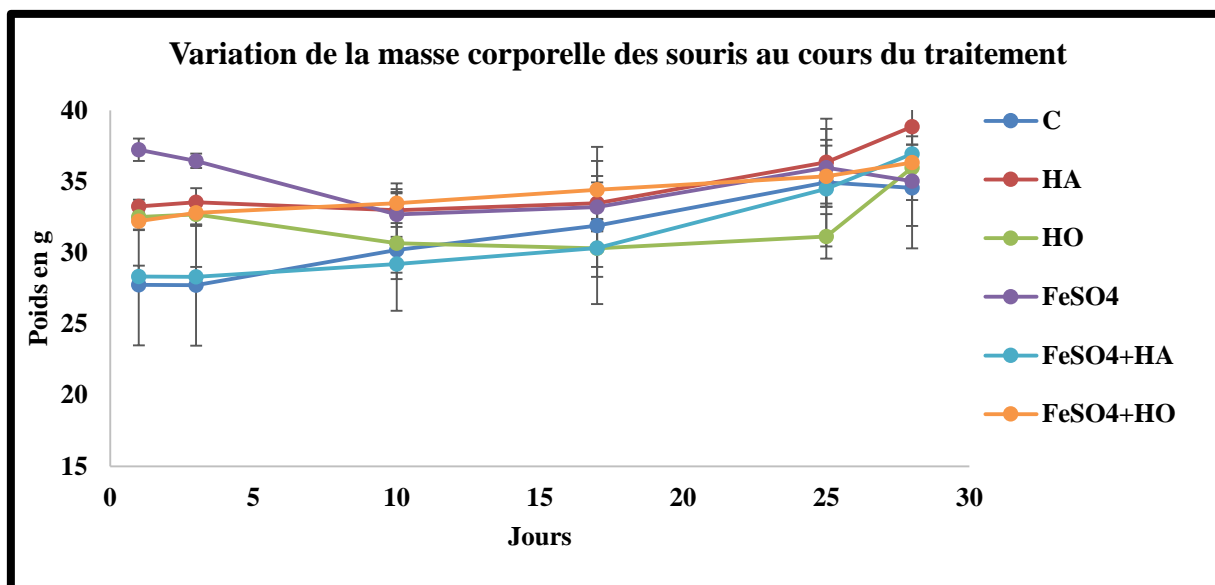


Figure 24: Effet du fer associé ou non à l'huile d'argane et d'olive sur la variation de la masse corporelle des souris.

Les résultats représentent la moyenne \pm écart type de la moyenne.

Les données (**Figure 24**) de l'effet de l'administration quotidienne du fer et des huiles pendant 28 jours n'ont produit aucun signe apparent de toxicité et/ou mortalité. Pendant la période du traitement, l'évaluation de la masse corporelle des souris des 6 lots n'a pas été influencée positivement ou négativement par le régime alimentaire. En plus, aucun changement dans la posture et/ou la marche n'a été visualisé.

2. Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'évolution de la masse relative des organes des souris

Pour évaluer l'effet du sulfate du fer ainsi des 2 huiles. D'abord, un examen macroscopique a été mené sur tous les animaux avant le prélèvement des organes. Les critères d'examen pathologiques bruts étaient fondés sur la position, la forme, la taille, la couleur et la consistance des organes. Ensuite, les organes (Foie, cerveau et reins) de chaque souris ont été pesés au jour du sacrifice et la masse relative a été calculée. La masse relative des organes correspond à la masse de l'organe divisée par la masse corporelle de la souris. Les résultats sont exprimés en g par 100 g de la masse corporelle.

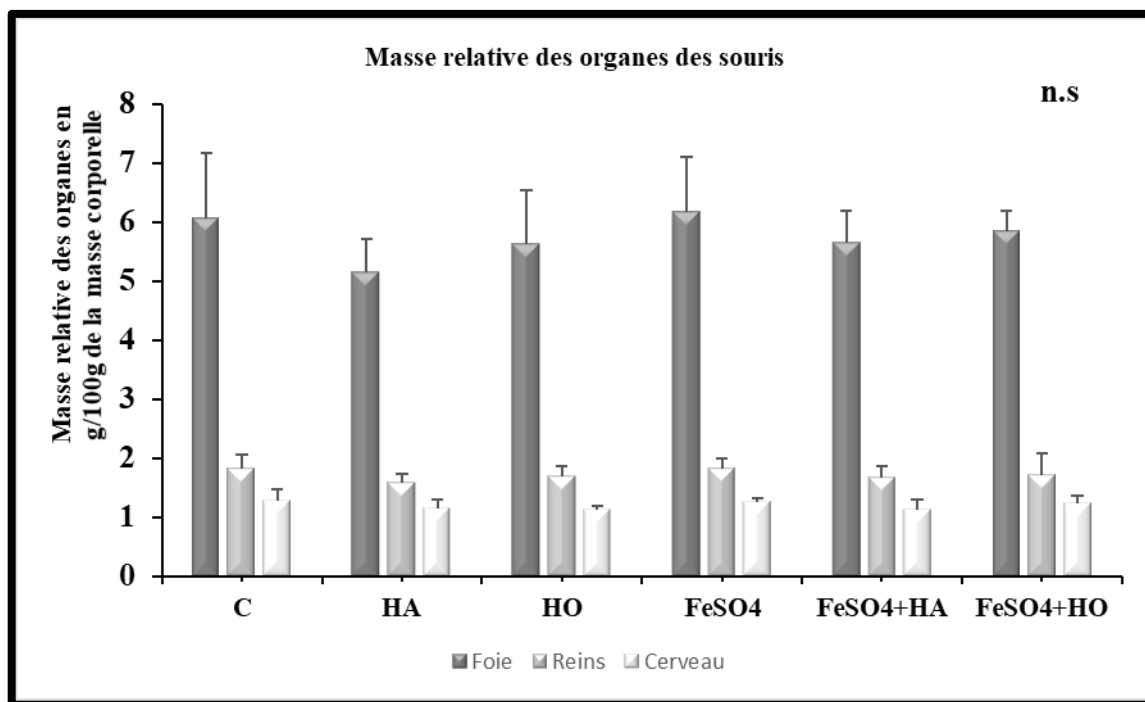


Figure 25: Effet du fer associé ou non à l'huile d'argane et d'olive sur la variation de la masse relative des organes des souris.

Les résultats représentent la moyenne \pm écart type.

Les résultats de l'effet du fer et de l'huile d'argane sur la variation de la masse relative des organes des souris (**Figure 25**) ont montré qu'il n'y a pas eu de changement significatif sur la masse relative des 3 organes (Foie, Reins et Cerveau) entre les différents traitements. Ainsi qu'aucun changement dans la position, la taille ou la couleur des organes n'a été visualisé.

Au vu des résultats obtenus lors de ces deux expériences, la croissance physiologique des souris et de leurs organes n'a pas été affectée par le fer, les huiles ou les deux types de combinaisons. Le régime n'a pas changé durant la période de traitement et les animaux ont maintenus un appétit normal, ce qui n'a pas retenu leur croissance. Autrement dit, la dose du fer (3,5 mg Fe^{2+} /litre) et celle des huiles (6%) administrée ne semblent pas avoir un effet toxique ou bénéfique sur l'évolution de la masse corporelle de l'animal ou relative des organes.

3. Evaluation de l'effet de fer et de l'huile d'argane au niveau du foie des souris

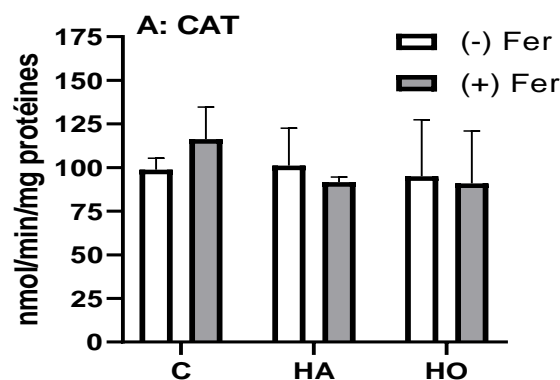
3.1 Evaluation de l'effet de fer et de l'huile d'argane sur le stress oxydant

Le fer en excès est impliqué dans l'apparition des pathologies comme les dommages hépatiques chroniques (**Xie et al., 2019**) car le foie est l'organe responsable du stockage et de l'homéostasie de fer (**Rishi and Subramaniam, 2017**). Étant donné que l'hépatotoxicité induite par une surcharge en fer est connue pour perturber l'équilibre redox intracellulaire et

causer un stress oxydatif (Al-Basher, 2019), Pour se protéger des effets délétères du stress oxydatif, l'organisme dispose d'un ensemble complexe de défenses antioxydantes. On distingue les enzymes de stress : la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPx) et la superoxyde dismutase (SOD). Les SOD sont des enzymes qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydatif, assurent l'élimination de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ par une réaction de dismutation, en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. La catalase est un enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation du peroxyde d'hydrogène. La GPx réduit les peroxydes aux dépens de son substrat spécifique, le glutathion réduit (GSH). A cela s'ajoutent les produits marqueurs du stress : le malondialdéhyde (MDA) et le glutathion (GSH). A cet égard, nous avons décidé de mesurer l'activité des enzymes antioxydantes : CAT, GPx et la SOD, ainsi que les marqueurs de stress oxydatif : MDA et GSH pour évaluer l'effet oxydatif du fer et la capacité de l'huile d'argane à contrer ces effets nuisibles.

3.1.1 Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'activité des enzymes de stress

Les résultats (Figure 26) de l'activité enzymatique de la CAT n'ont montré aucune différence significative dans aucun groupe. Alors que les activités enzymatiques de la SOD et la GPx ont enregistrées des variations dans le foie de souris aux dépens des traitements. Les activités de la SOD et de la GPx dans le groupe du fer ont considérablement diminué par rapport au contrôle. L'ajout de l'huile d'argane ou l'huile d'olive a entraîné une augmentation significative de l'activité de GPx comparativement au lot fer. L'activité de la SOD a suivi la même tendance que la GPx. Les huiles ont pu rétablir la situation normale.



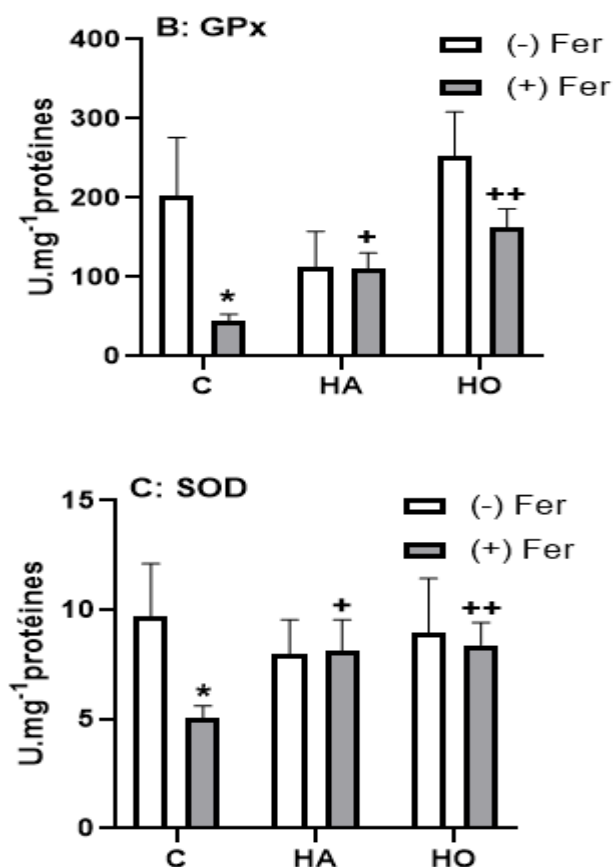


Figure 26: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes du foie des souris suite à la toxicité induite par le fer.

(A) Activité de la Catalase (CAT) ; (B) Activité de la glutathione peroxydase (GPx) ; (C) Activité de la superoxyde dismutase (SOD). Souris reçues, pour 28 jours, une alimentation standard (Contrôle : C) ; une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'argane (HA) ; une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'olive (HO) ; une alimentation standard avec le médicament de référence Tardyferon (sulfate du fer 3.5 mg Fe²⁺ /litre) a été solubilisé dans l'eau potable ; les animaux reçoivent le fer et aussi HA ; les animaux reçoivent le fer et aussi HO. Toutes les valeurs présentent la moyenne± écartype sur 3 différents essais. (*p<0.05) comparé au contrôle, (**p<0.01, +p<0.05) comparé au FeSO₄ représentent les probabilités de significativité statistique.

3.1.2 Effet du fer et de l'huile d'argane sur les marqueurs du stress

Concernant les deux marqueurs du stress étudiés, les résultats (**Figure 27**) rapportent que les produits de peroxydation lipidique, exprimés en équivalents de MDA, étaient plus élevés chez les souris surchargées de fer par rapport au groupe témoin (C). L'addition de l'HA et l'HO dans l'administration des souris traitées au fer corrige avec succès ce paramètre en diminuant sa concentration jusqu'au retour à la normale. La conclusion qu'on peut tirer c'est

que les deux huiles sont fortement aptes à bloquer la peroxydation lipidique. Par ailleurs, aucune variation des moyennes de GSH n'a pu être observée entre les différents groupes.

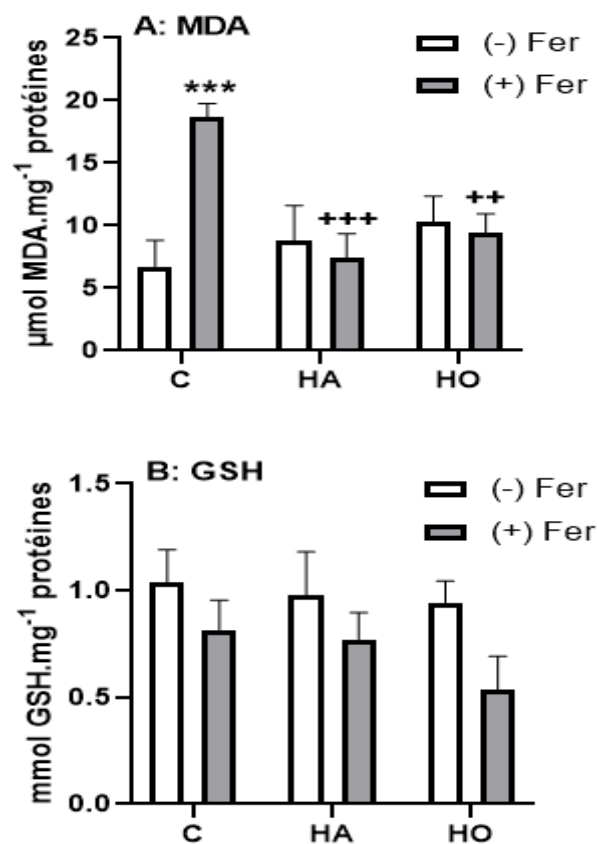


Figure 27: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes du foie de souris suite à la toxicité induite par le fer.

(A) Niveau de malondialdéhyde (MDA) et (B) Niveau de glutathion (GSH). Souris reçues, pour 28 jours, une alimentation standard (Contrôle : C) ; une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'argane (HA) ; une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'olive (HO) ; une alimentation standard avec le médicament de référence Tardyferon (sulfate du fer 3.5 mg Fe²⁺ /litre) a été solubilisé dans l'eau potable ; les animaux reçoivent le fer et aussi HA ; les animaux reçoivent le fer et aussi HO. Toutes les valeurs présentent la moyenne ± écartype sur 3 différents essais. (***)p<0.001) comparé au contrôle, (++)p<0.001, (++)p<0.01) comparé au FeSO₄ représentent les probabilités de significativité statistique.

3.2 Evaluation des dommages d'ADN (γ H2A.X)

Il est bien connu que la surcharge en fer entraîne la formation de cassures d'ADN à double brin (Hermes-Lima et al. , 1998) et en réponse à cette formation, l'histone H2AX devient phosphorylée (γ H2A.X). Cette histone est utilisée comme marqueur des dommages d'ADN. Afin de détecter les dommages d'ADN, une immunomarquage gamma H2AX a été réalisée sur des coupes de foie paraffinées. La distribution spatiale et le nombre moyen de foyers de

dommages d'ADN dans le noyau cellulaire ont été observés et le nombre des foyers a été compté.

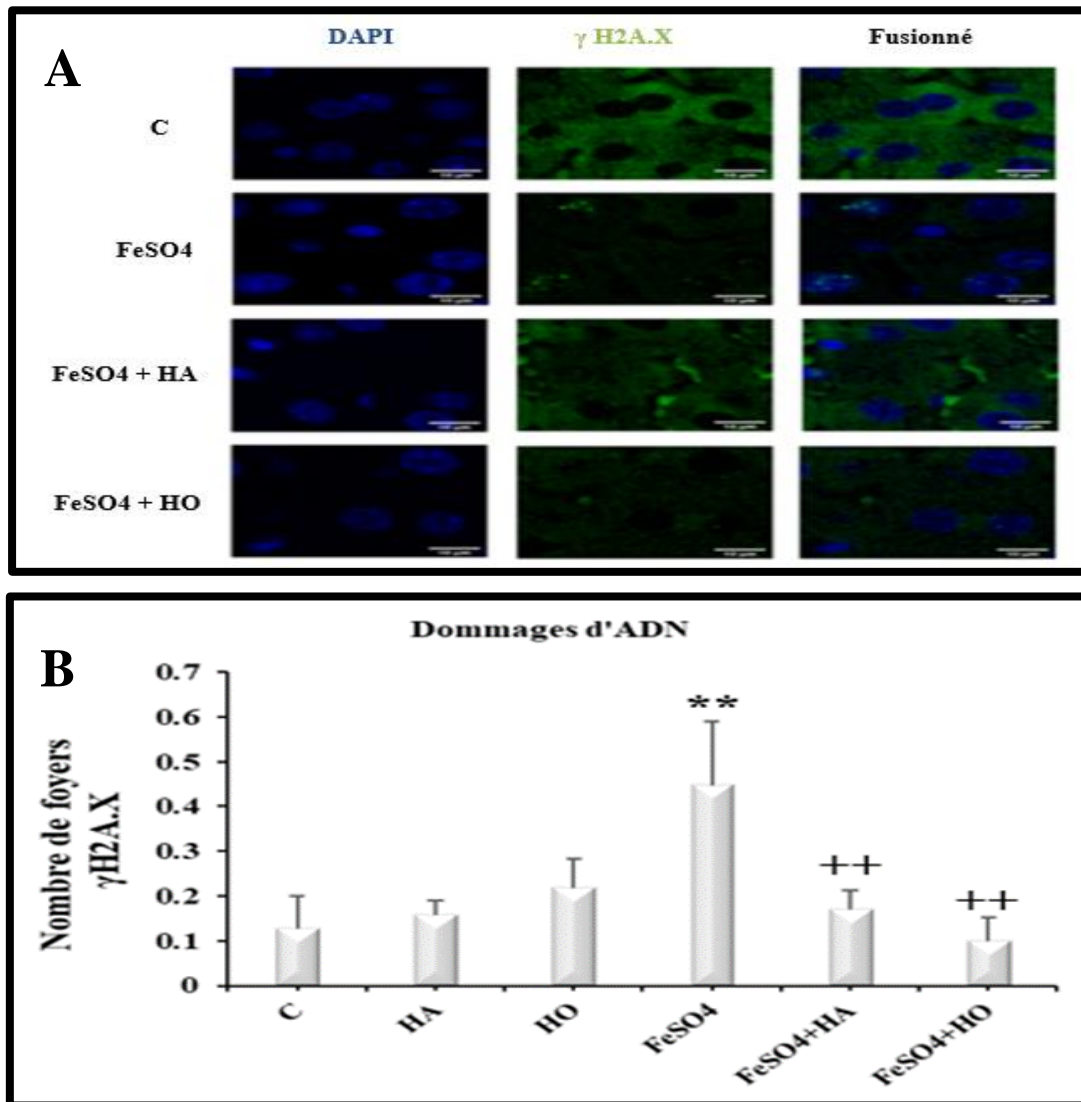


Figure 28: Mesure des dommages d'ADN au niveau du foie des souris.

A : Images représentatives des foyers γ H2A.X dans le tissu hépatique (x400). Vert : foyers γ H2A.X, Bleu : DAPI.
 B : Nombre moyen des foyers γ H2A.X. Toutes les valeurs présentent la moyenne \pm écartype de la moyenne sur 3 différents essais. (** $p < 0.01$) comparé au contrôle, (++ $p < 0.01$) comparé au FeSO₄ représentent les probabilités de significativité statistique.

Les résultats (**Figure 28**) montrent que le traitement par l'HA et l'HO n'a pas donné d'effet significatif sur le nombre de foyers γ H2A.X par rapport aux témoins non traités. En revanche, le traitement par le fer a induit des dommages d'ADN avec un nombre plus élevé (environ 2 fois) de foyers γ H2A.X comparativement aux sections témoins. Par contre la supplémentation de l'HA et L'HO avec le fer a montré un effet préventif illustré par la diminution significative du nombre de foyers γ H2A.X dans les groupes HA + Fer et HO + Fer,

par rapport au groupe traité seulement par le fer. Donc les résultats de l'immunomarquage ont mis en évidence la capacité des deux huiles à restaurer le taux des dommages d'ADN à des niveaux normaux.

3.3 Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'expression du marqueur du stress oxydatif mn SOD

Dans cette étude, nous ne sommes pas arrêtés à mesurer le stress oxydant via la mesure de l'activité enzymatique des enzymes du stress (CAT, SOD et GPx) et le dosage des marqueurs de stress (MDA et GSH). Nous sommes allés plus loin et nous avons étudié l'expression relative des ARN du gène connu pour coder le marqueur de stress oxydatif (mn SOD) par PCR quantitative en temps réel (qPCR) afin d'évaluer l'effet oxydant du fer et l'effet antioxydant de l'huile d'argane.

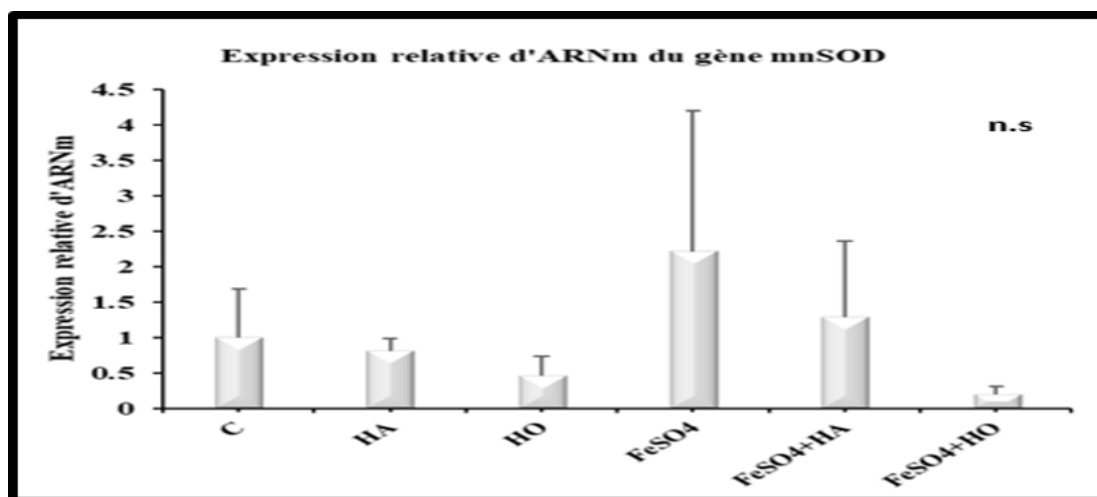


Figure 29: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur l'expression relative des ARNm du marqueur du stress oxydatif mnSOD suite à la toxicité induite par le fer au niveau du foie des souris.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour la mnSOD. Les valeurs de Ct obtenues après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence GAPDH, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour le taux d'expression relatif. Toutes les valeurs présentent la moyenne \pm écartype de la moyenne sur 3 différents essais.

Sur les six lots étudiés (**Figure 29**), les variations de l'expression relative de l'ARNm de la mn SOD montre des différences. Une légère chute du niveau d'expression a été constatée dans le lot HA et HO comparativement au groupe contrôle. En revanche, le fer a augmenté cette expression. En plus, le niveau de l'expression revient vers la normale chez les souris traitées par les deux types de combinaisons. Ces résultats intensifient les effets bénéfiques de neutraliser le potentiel pro-oxydatif induit par le fer et renforcer le gène anti-oxydant hépatique.

3.4 Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'expression des marqueurs de l'inflammation COX-2, IL-6, TNF α et IL-1 β

L'inflammation est une réponse de l'organisme à une infection ou une blessure. Ces réponses inflammatoires sont contrôlées pour éviter des dommages excessifs à l'organisme. Le fer est l'un des métaux connus par son induction de l'inflammation, par l'activation de la voie de signalisation du facteur nucléaire NF- κ b (She et al., 2002) et la sécrétion des cytokines telles que le facteur de nécrose tumorale α (TNF α), l'interleukine 1 β (IL-1 β) et l'interleukine 6 (IL-6) (Das et al., 2016). Pour faire face à l'effet inflammatoire du fer, une source d'anti-inflammatoires serait efficace. Une étude récente a montré que l'huile d'argane est capable de moduler la réponse inflammatoire (El Kamouni et al., 2017).

Dans ce contexte, nous voulons évaluer la réponse de défense du foie, suite à la toxicité du fer. L'HA a été utilisée pour évaluer son effet anti-inflammatoire, l'expression des gènes connus pour coder des protéines anti-inflammatoires a été étudiée par qPCR en temps réel. IL-6, IL-1 β , TNF α et COX-2 ont été utilisés comme marqueurs inflammatoires.

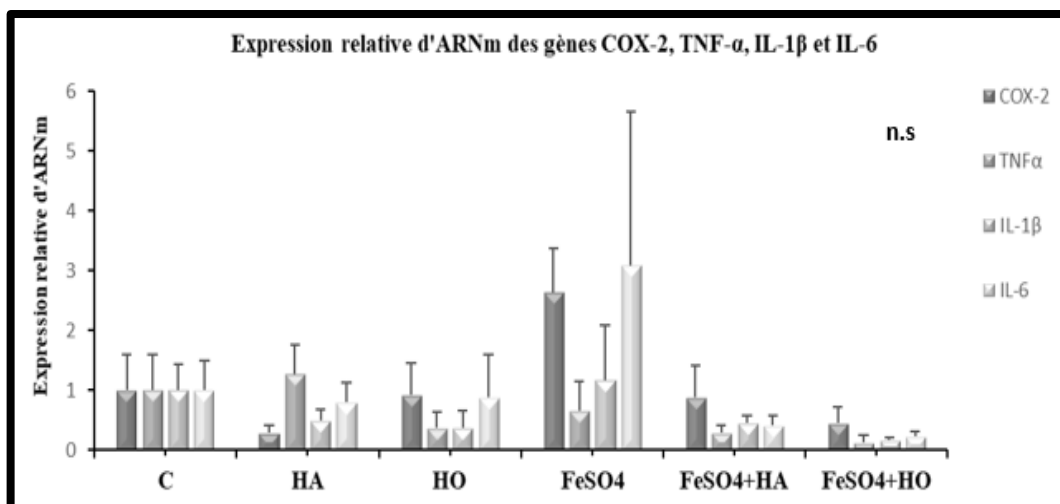


Figure 30: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur l'expression relative des ARNm des marqueurs de l'inflammation suite à la toxicité induite par le fer au niveau du foie des souris.

A : Cyclo-oxygénase-2 (COX-2) B : Interleukine-6 (IL-6) C :Facteur de nécrose tumorale (TNF- α) D : Interleukine-1 β (IL-1 β). Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour COX-2, IL-6, TNF- α et IL-1 β . Les valeurs de Ct obtenues après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence GAPDH, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour le taux d'expression relatif. Toutes les valeurs présentent la moyenne \pm écartype de la moyenne sur 3 différents essais.

L'ensemble des résultats obtenus (**Figure 30**) souligne des variations entre les souris de tous les lots mis à l'épreuve. Nos résultats montrent qu'en présence du fer, l'expression génique augmente pour les deux marqueurs de l'inflammation (IL-6 et COX-2) par rapport au groupe contrôle, bien que ce changement n'ait pas été significatif. Par ailleurs, aucun changement n'a pu être observé sur le niveau d'expression d'IL-1 β et de TNF- α sous l'effet du fer par rapport au témoin. Les deux huiles étaient aptes à faire diminuer l'expression des 4 gènes pro-inflammatoires (IL-6, COX-2, TNF α et IL-1 β) comparativement au groupe fer et groupe témoin.

3.5 Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'expression des marqueurs de la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire est l'arrêt irréversible de la division cellulaire. Le stress oxydatif et les dommages d'ADN sont des inducteurs de la sénescence (**de Magalhães & Passos, 2018**). On peut penser alors que le fer peut induire la sénescence cellulaire puisqu'il s'agit d'un oxydant fort. De plus, il a été démontré dans la littérature que l'huile d'olive est impliquée dans l'accroissement de la longévité (**López-Miranda et al., 2010**). Cet effet a été attribué non seulement aux acides gras monoinsaturés mais aussi à la présence des composés phénoliques (**López-Miranda et al., 2010; Visioli & Galli, 2002**). Les résultats de la teneur de l'huile d'argane en composés phénoliques ont montré que la fraction insaponifiable contient ces composés mineurs. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'effet anti-sénescence de l'huile d'argane suite à la surcharge ferrique.

Pour évaluer l'effet anti-sénescence de l'HA, l'expression des gènes connus pour être des marqueurs de sénescence (p16 et p21) a été étudiée par qPCR en temps réel. Le choix des deux gènes n'est pas arbitraire car p21 et p16 s'agissent des principaux médiateurs de la sénescence. Les signaux de sénescence se traduisent par l'activation indirecte de p21 qui stimule par la suite l'expression de p16 (**Bischof et al., 2009**).

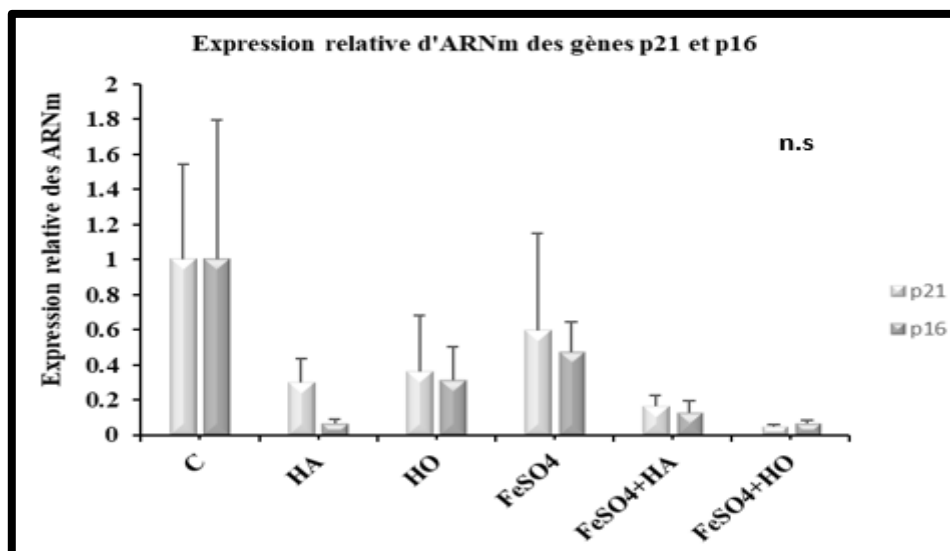


Figure 31: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur l'expression relative des ARN des marqueurs de la sénescence p16 et p21 suite à la toxicité induite par le fer au niveau du foie des souris.

Les ARNm ont été extraits à partir du foie puis analysés par RT-qPCR en utilisant des amorces spécifiques pour p16 et p21. Les valeurs de Ct obtenues après qPCR ont été normalisées par rapport au gène de référence GAPDH, ensuite ces valeurs normalisées ont été rapportées à celle du contrôle pour le taux d'expression relatif. Toutes les valeurs présentent la moyenne \pm écartype de la moyenne sur 3 différents essais.

Les résultats fournis (**Figure 31**) des six différents groupes de souris mis à l'épreuve, montrent que le fer n'a aucun effet significatif sur l'expression des deux marqueurs de sénescence analysés p16 et p21. Par ailleurs, nos résultats soulignent également que les deux types de combinaisons (Fer + HA et Fer + HO) affichent un niveau d'expression (p16 et p21) inférieur à la normale. Ce qui suggère l'effet anti-sénescence des deux huiles.

A la lumière des résultats de cette partie, nous pouvons dire que la toxicité induite par le fer a été exprimée par des modifications importantes des paramètres du stress oxydatif et surtout SOD, GPx et MDA. Globalement, il paraît que l'effet du fer a entraîné une baisse de l'activité enzymatique (SOD et GPx) et une augmentation du niveau du marqueur de stress MDA. En revanche, les deux types de co-traitements ont pu contrer les effets oxydants du fer en faisant retourner les moyennes à des niveaux normaux. Nous constatons aussi que la supplémentation en fer a causé des dommages à l'ADN par l'induction du nombre de foyers. Ce type de dommages a été renversé par la consommation de HA et HO. Ce qui intensifie l'effet antioxydant de l'HA et l'HO. Une surexpression des marqueurs de l'inflammation (IL-6, COX-2, TNF α et IL-1 β) a été constatée chez le groupe fer par rapport au témoin. Par contre, aucune

différence des deux marqueurs de la sénescence n'a été enregistrée entre le groupe fer et le contrôle. En revanche, nous nous apercevons que les deux types de combinaisons ont pu retourner le taux d'expression à des niveaux normaux. L'effet putatif des huiles contre l'inflammation et la sénescence cellulaire lui confère les propriétés d'anti-inflammatoires et d'anti-sénescents.

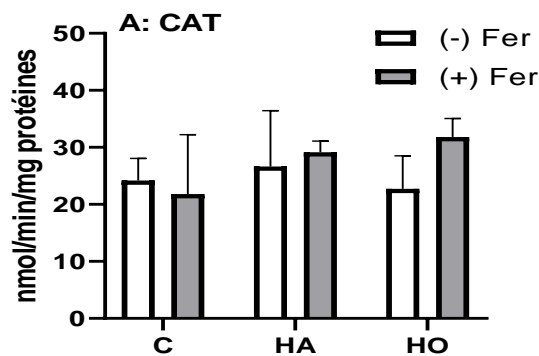
4. Evaluation de l'effet du fer et de l'huile d'argane au niveau des reins des souris

4.1 Evaluation de l'effet de l'huile d'argane sur le stress oxydatif induit par le fer

Les reins assurent plusieurs fonctions essentielles pour l'organisme. Ils permettent d'une part d'éliminer les déchets endogènes ou exogènes. D'autre part, il joue un rôle dans le maintien de l'équilibre homéostatique. Les ERO produites suite à la surcharge en fer sont impliquées dans l'apparition de nombreuses pathologies rénales (Dev & Babitt, 2017). Dans notre étude, le stress oxydatif a été évalué par la mesure de l'activité des enzymes de stress (CAT, GPx et SOD) et par le dosage des marqueurs de stress (MDA et GSH).

4.1.1 Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'activité des enzymes de stress oxydatif

Selon les résultats déterminés (Figure 32), une variation paradoxale de l'activité GPx et SOD a été soulignée. Globalement, une diminution significative de la GPx a été affichée et une augmentation hautement significative de la SOD a été enregistrée comparativement au groupe contrôle. Les variations de la GPx et SOD induites par le fer ont été fortement normalisées par l'addition des deux huiles aux régimes alimentaires. Seules les variations de la CAT entre les lots ne sont pas différentes puisqu'un niveau normal de l'activité CAT a été gardé.



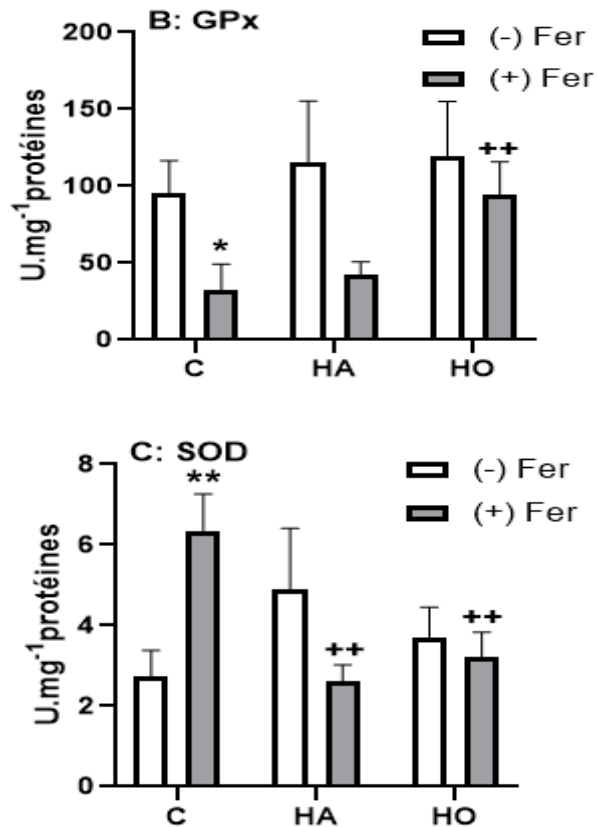


Figure 32: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes des reins de souris suite à la toxicité induite par le fer au niveau des reins des souris.

(A) Catalase (CAT); (B) Activité de la glutathione peroxydase (GPx); (C) Activité de la superoxyde dismutase (SOD). Souris reçues, pour 28 jours, une alimentation standard (contrôle : C); une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'argane (HA); une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'olive (HO); une alimentation standard avec le médicament de référence Tardyferon (sulfate du fer 3.5 mg Fe²⁺ /litre) a été solubilisé dans l'eau potable; les animaux reçoivent le fer et aussi HA; les animaux reçoivent le fer et aussi HO. Toutes les valeurs présentent la moyenne± écartype sur 3 différents essais. (**p<0.01, *p<0.05) comparé au contrôle, (**p<0.01, *p<0.05) comparé au FeSO₄ représentent les probabilités de significativité statistique.

4.1.2 Effet du fer et de l'huile d'argane sur les marqueurs du stress oxydatif

D'après les résultats illustrés (**Figure 33**), les changements du taux de MDA et de GSH entre les groupes ne sont pas différents puisqu'ils ont conservé le même niveau et seuil de variation par rapport au contrôle. Seule la baisse du taux de GSH suite au co-traitement par le fer et l'HA par rapport au lot fer a été observée. Ce résultat laisse suggérer que la réduction de GSH est peut être due à l'augmentation du statut antioxydant de l'HA.

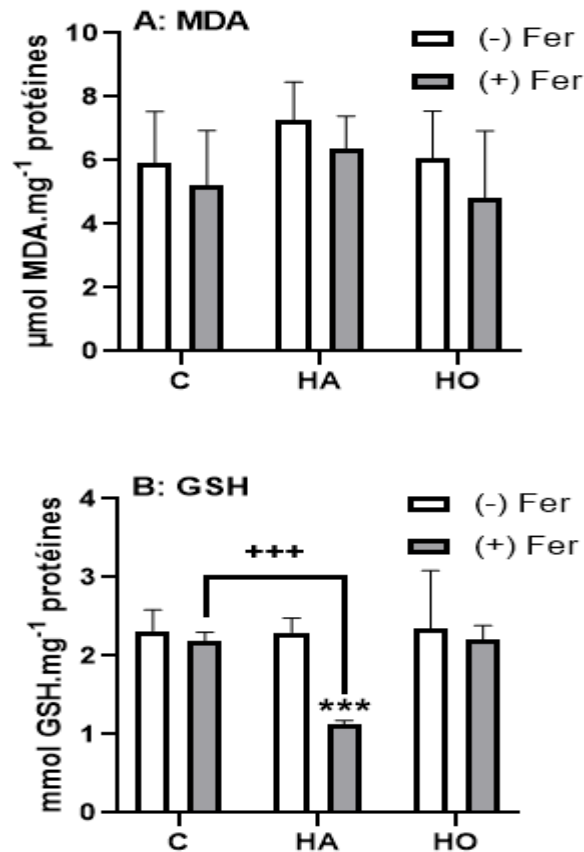


Figure 33: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes des reins de souris suite à la toxicité induite par le fer.

(A) Niveau de malondialdéhyde (MDA) et (B) Niveau de glutathion (GSH). Souris reçues, pour 28 jours, une alimentation standard (contrôle : C); une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'argane (HA); une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'olive (HO); une alimentation standard avec le médicament de référence Tardyferon (sulfate du fer 3.5 mg Fe²⁺ /litre) a été solubilisé dans l'eau potable; les animaux reçoivent le fer et aussi HA; les animaux reçoivent le fer et aussi HO. Toutes les valeurs présentent la moyenne± écartype sur 3 différents essais. (**p<0.01, *p<0.05) comparé au contrôle, (**p<0.01, *p<0.05) comparé au FeSO₄ représentent les probabilités de significativité statistique.

A la lumière des résultats de cette partie, nous pouvons dire que le stress oxydant induit par le fer a été exprimé par des modifications importantes de deux paramètres marqueurs du stress oxydatif (SOD et GPx). Globalement, il paraît que l'effet du fer a entraîné une baisse de l'activité enzymatique de la GPx et une augmentation de la SOD. Le résultat de l'activité de SOD et GPx semble paradoxal puisqu'il ne va pas dans le même sens de variation. En revanche, les huiles s'opposent à la variation de la SOD et GPx induite par le fer. Par ailleurs la CAT, le GSH et le MDA n'ont pas changé dans les différents groupes. Ces résultats suggèrent que les

huiles étudiées ont une capacité considérable à réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne de réactions radicalaires.

5. Evaluation de l'effet du fer et de l'huile d'argane au niveau du cerveau des souris

5.1 Evaluation de l'effet de l'huile d'argane sur le stress oxydatif induit par le fer

Le cerveau est l'un des organes le plus important et le plus complexe dans le corps humain. La fonction principale du cerveau est de contrôler les actions de l'organisme à partir des informations sensorielles qui lui parviennent. Le cerveau est le tissu le plus sensible au stress oxydant car il produit une grande quantité des ERO vu son besoin constant d'oxygène. De ce fait, il est très important de voir la réponse du cerveau au traitement par l'huile d'argane ainsi qu'au stress induit par le fer en mesurant l'activité des marqueurs de stress.

5.1.1 Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'activité des enzymes de stress oxydatif

Les résultats (**Figure 34**) enregistrent une altération de l'activité de la CAT dans le cerveau des souris exposées au sulfate de fer. En comparaison avec le contrôle, une chute induite par le fer est marquée dans l'activité CAT. Le co-traitement par le fer et l'HA ou l'HO a retourné l'activité CAT vers l'état normal ce qui suggère l'effet antioxydant puissant des deux huiles étudiées. En plus, aucune variation des moyennes de SOD n'a pu être observée entre les différents lots, cela signifie que le niveau normal a été préservé. Un effet différentiel de l'administration de l'HA et l'HO soit observé sur l'activité de la GPx seul puisqu'elles ont baissé l'activité à un niveau inférieur à la normale. Par ailleurs, une réduction significative de l'activité GPx a été enregistrée dans le groupe co-traité par le fer et l'HA comparativement au groupe fer et témoin.

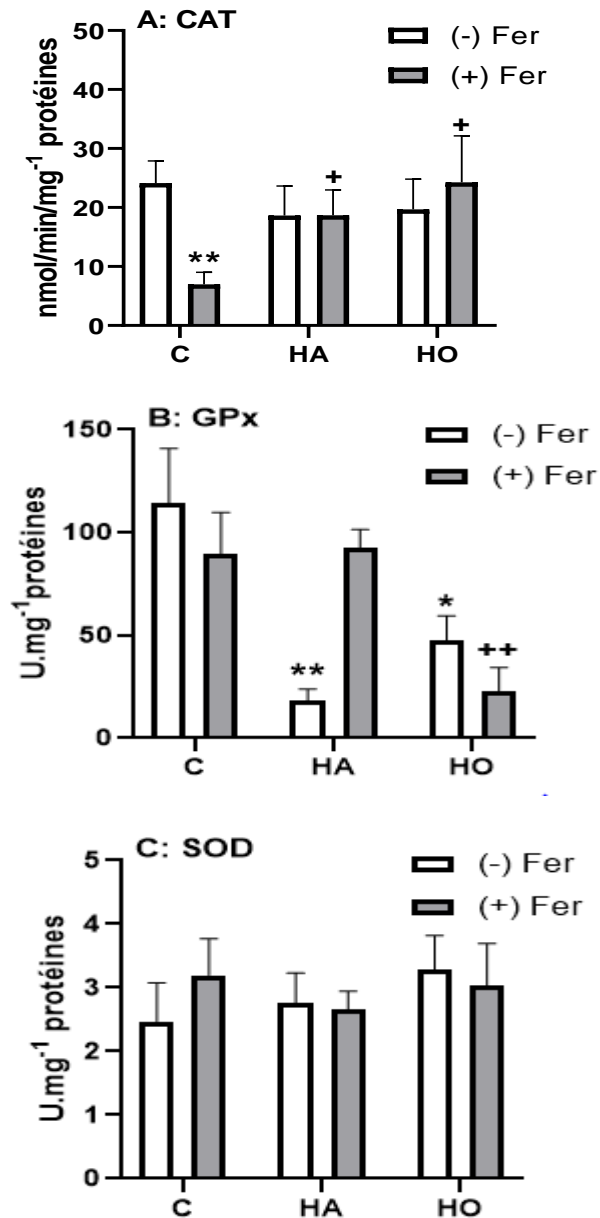


Figure 34: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes de cerveau de souris suite à la toxicité induite par le fer au niveau de cerveau des souris.

(A) Catalase (CAT); (B) Activité de la glutathione peroxydase (GPx); (C) Activité de la superoxyde dismutase (SOD). Souris reçues, pour 28 jours, une alimentation standard (contrôle : C); une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'argane (HA); une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'olive (HO); une alimentation standard avec le médicament de référence Tardyferon (sulfate du fer 3.5 mg Fe²⁺ /litre) a été solubilisé dans l'eau potable; les animaux reçoivent le fer et aussi HA; les animaux reçoivent le fer et aussi HO. Toutes les valeurs présentent la moyenne± écartype sur 3 différents essais. (**p<0.01, *p<0.05) comparé au contrôle, (+p<0.05) comparé au FeSO₄ représentent les probabilités de significativité statistique.

5.1.2 Effet du fer et de l'huile d'argane sur les marqueurs du stress oxydatif

Les données (**Figure 35**) illustrent les variations des taux des marqueurs du stress (GSH et MDA) sous l'effet du fer, de l'HA et l'HO au niveau du cerveau. Par rapport au C, une chute hautement significative de GSH a été constatée chez les animaux nourris au fer. Le régime alimentaire contenant l'HA ou l'HO aident à préserver un taux normal de ce paramètre. Par ailleurs, un niveau normal de la concentration de MDA dans le cerveau a été enregistré sur les six différents lots de souris mis à l'épreuve.

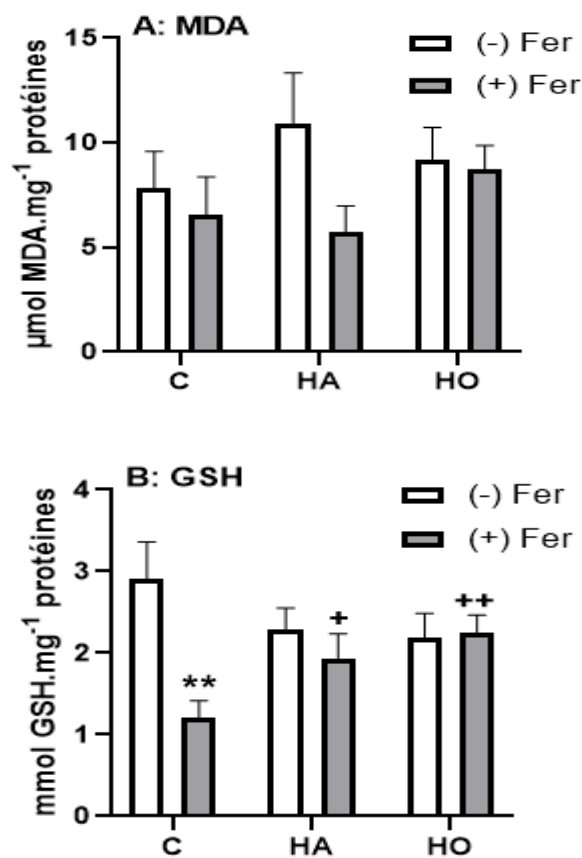


Figure 35: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes de cerveau de souris suite à la toxicité induite par le fer au niveau de cerveau des souris.

(A) Niveau de malondialdéhyde (MDA) et (B) Niveau de glutathion (GSH). Souris reçues, pour 28 jours, une alimentation standard (contrôle : C); une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'argane (HA); une alimentation standard enrichie avec 6% (w/w) de l'huile d'olive (HO); une alimentation standard avec le médicament de référence Tardyferon (sulfate du fer 3.5 mg Fe²⁺ /litre) a été solubilisé dans l'eau potable; les animaux reçoivent le fer et aussi HA; les animaux reçoivent le fer et aussi HO. Toutes les valeurs présentent la moyenne± écartype sur 3 différents essais. (**p<0.001) comparé au contrôle, (**p<0.01, +p<0.05) comparé au FeSO₄ représentent les probabilités de significativité statistique.

Nos résultats sur le cerveau ont révélé que le fer a pu varier l'activité de la CAT et du marqueur GSH sans toucher les activités enzymatiques de la SOD et GPx ainsi que le taux de MDA. Cela signifie que l'HA et l'HO étaient apte à faire retourner à un niveau normal l'activité CAT et le taux de GSH. Ces résultats révèlent l'effet antioxydant puissant de l'HA et l'HO à préserver l'état normal du stress oxydatif.

A la lumière de tous les résultats de la partie *in vivo* réalisée sur le foie, les reins et le cerveau des souris. Nous notons que le fer à une concentration de 3,5 mg Fe²⁺ par litre de l'eau de boisson et les huiles à 6% n'ont produit aucun signe de toxicité ou de mortalité sur les souris après les avoir traitées pendant 28 jours avec le fer et les huiles (huiles d'argane et l'huile d'olive). En effet, la masse corporelle des souris et la masse des organes n'ont pas varié durant la période de traitement. Par ailleurs, selon les résultats déterminés (**Tableau 14**), il paraît que le foie vient en premier en termes de degré de stress oxydatif induit par le fer, suivi par le cerveau et les reins en second lieu. Globalement, le fer au niveau du foie a pu altérer 3 principaux marqueurs du stress oxydatif à citer SOD, GPx et MDA. Tandis que juste 2 paramètres ont été changés au niveau des reins (SOD et GPx) et au niveau du cerveau (CAT et GSH). Ces données intensifient l'effet oxydant du fer. Toutes ces variations ont été corrigées avec succès par l'administration de l'HA et l'HO, ces deux huiles ont modéré le stress oxydatif en faisant retourner l'activité des enzymes et le taux des marqueurs du stress à un niveau normal. La normalisation du niveau de stress oxydatif pourrait-être due à l'augmentation du statut antioxydant de l'HA et l'HO. Pour confirmer le potentiel oxydant du fer et le potentiel antioxydant des huiles, nous avons étudié et évalué l'expression relative des ARNm du gène de la mn SOD dans le foie (**Tableau 15**). Les résultats ont montré que le fer tend à augmenter l'expression de ce paramètre et les huiles, comme toujours, ont apaisé l'expression de la mn SOD. Cela suggère que les huiles étudiées ont une capacité considérable à réagir avec les radicaux libres pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne des réactions radicalaires. D'un autre côté, les résultats de l'immunomarquage ont révélé que le traitement par le fer a engendré des dommages à l'ADN en augmentant le nombre de l'histone phosphorylée (γ H2A.X) qui est utilisée comme marqueur des dommages d'ADN. Le fer alors à la dose utilisée est un inducteur puissant des dommages d'ADN via l'induction du stress oxydatif. En revanche, le traitement avec les 2 huiles (HA et HO) a corrigé ce paramètre en diminuant le nombre de foyers vers la normale. Cela est peut-être dû aux statuts antioxydants des huiles à piéger les radicaux libres et interrompre les dommages d'ADN. Ces données

confèrent aux huiles la propriété d'agents anti-dommages d'ADN. L'évaluation de l'effet du fer sur l'expression des marqueurs de l'inflammation au niveau du foie (**Tableau 15**) a révélé que le fer tend à augmenter l'expression de IL-6 et COX-2 sans varier les 2 autres paramètres marqueurs de l'inflammation (TNF α et IL-1 β). Les deux huiles étaient aptes à diminuer l'expression des 4 gènes pro-inflammatoires (IL-6, COX-2, TNF α et IL-1 β) à un niveau subnormal ce qui intensifie fortement l'effet anti-inflammatoire de l'HA et l'HO. L'évaluation de l'effet du fer et des huiles sur les deux principaux marqueurs de la sénescence p16 et p21 (**Tableau 15**) a révélé que le fer à la dose 3,5 mg Fe²⁺ n'a pas pu induire la sénescence cellulaire. Par contre, les deux huiles ont diminué l'expression de p16 et p21 à des niveaux subnormaux. L'HA et l'HO semblent avoir un effet puissant anti-sénescence.

Nos résultats sur la partie *in vivo* fournissent des données encourageantes sur les effets de l'HA et l'HO sur les dommages d'ADN, le stress oxydatif, l'inflammation et la sénescence cellulaire.

Tableau 14: Tableau récapitulatif de l'effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes du foie, des reins et du cerveau chez les souris suite à la toxicité induite par le fer.

Paramètre	Foie				Reins				Cerveau			
	C	FeSO4	FeSO4+HA	FeSO4+HO	C	FeSO4	FeSO4+HA	FeSO4+HO	C	FeSO4	FeSO4+HA	FeSO4+HO
CAT	98,8 ± 6,6	116,3 ± 18,3	91,7 ± 2,9	90,1 ± 30,1	24,2 ± 3,9	21,8 ± 10,4	29,1 ± 1	31,8 ± 3,2	24,2 ± 3,8	7 ± 2,1 ^{**}	18,8 ± 4,3 ⁺	24,3 ± 7,9 ⁺
SOD	9,7 ± 2,4	5,0 ± 0,5 [*]	8,1 ± 1,4 ⁺	8,4 ± 1,0 ⁺⁺	2,7 ± 0,6	6,3 ± 1 ^{**}	2,6 ± 0,4 ⁺⁺	3,2 ± 0,6 ⁺⁺	2,5 ± 0,6	3,2 ± 0,6	2,7 ± 0,3	3,0 ± 0,7
GPx	541,2 ± 195	120,2 ± 21,6 [*]	295,6 ± 52,8 ⁺	435,5 ± 61,2 ⁺⁺	190,4 ± 42,8	64,2 ± 34,2 [*]	145,9 ± 14,7 ⁺	186,3 ± 51,3 ⁺⁺	228,7 ± 53	179,3 ± 40,3	184,7 ± 18,15	46,0 ± 22,5
MDA	6,7 ± 2,0	18,63 ± 1,1 ^{***}	7,4 ± 1,9 ⁺⁺⁺	9,5 ± 1,5 ⁺⁺	6 ± 1,6	5,2 ± 1,7	6,4 ± 1	4,8 ± 2,1	7,8 ± 1,7	6,6 ± 1,8	5,7 ± 1,2	8,7 ± 1,1
GSH	12,5 ± 1,8	9,8 ± 1,7	9,3 ± 1,5	6,4 ± 1,9	27,8 ± 2,7	26,3 ± 1,3	13,6 ± 0,5	26,5 ± 2,3	17,4 ± 2,7	7,2 ± 1,7 ^{***}	11,6 ± 1,8 ⁺	13,5 ± 1,3 ⁺⁺

(***p<0,001, (**p<0,01, (*p<0,05) comparé au contrôle, (++p<0,001, +p<0,01, +p<0,05) comparé au FeSO₄ représentent les probabilités de significativité statistique.

Tableau 15: Tableau récapitulatif de l'effet de l'huile d'argane et d'olive sur l'expression génique du marqueur du stress oxydatif (mnSOD), des marqueurs de l'inflammation (IL-6, COX-2, TNF α et IL-1 β) et des marqueurs de la sénescence cellulaire (p16 et p21) au niveau du foie de souris suite à la toxicité induite par le fer.

Paramètre	mnSOD	COX-2	IL-6	TNF- α	IL-1 β	p16	p21
C	1 \pm 0,7	1 \pm 0,6	1 \pm 0,5	1 \pm 0,6	1 \pm 0,4	1 \pm 0,8	1 \pm 0,5
FeSO4	2,2 \pm 2	2,6 \pm 0,7	3,1 \pm 2,6	0,7 \pm 0,5	1,2 \pm 0,9	0,5 \pm 0,2	0,6 \pm 0,5
FeSO4 + HA	1,3 \pm 1	0,9 \pm 0,5	0,4 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,1 \pm 0,07	0,2 \pm 0,06
FeSO4 + HO	0,2 \pm 0,1	0,5 \pm 0,3	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,2 \pm 0,01	0,1 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01

III. Etude *in vitro* sur le protozoaire *Tetrahymena pyriformis*

Le fer causait l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire des fibroblastes humains cultivés *in vitro* (Campo et al., 2003) en conséquence d'un déséquilibre entre la production des ERO et des antioxydants. Les résultats de mesure de l'activité antioxydante (FRAP, DPPH et ABTS) obtenus dans notre étude ont montré que l'huile d'argane et l'huile d'olive ont un pouvoir antioxydant. En revanche, le dosage des polyphénols totaux a montré la richesse des huiles en polyphénols avec une fraction importante dans l'huile d'olive par rapport à l'huile d'argane. Par conséquence, la susceptibilité d'avoir un effet antioxydant au niveau cellulaire augmente ce qui nous a poussé à évaluer ces effets *in-vitro* chez le protozoaire *Tetrahymena pyriformis*. Les cellules de *T. pyriformis* ont été choisies dans cette étude afin d'évaluer l'effet cytotoxique du chlorure de fer (FeSO_4) et le potentiel protecteur des 2 huiles (HA et HO). Ce type cellulaire est largement utilisé dans les études toxicologiques grâce à sa culture en milieu axénique, son temps de génération et sa capacité à atteindre des densités cellulaires élevées (Maurya et al., 2019; Nilsson, 1989). Ce protozoaire combine la complexité des fonctions eucaryotes cellulaires et des structures comparables à celles trouvées dans les cellules humaines (Yao et al., 2007). En outre, il est très sensible, même une très petite quantité de contaminants ou d'impuretés dans les milieux de culture, affecte la croissance de ce protozoaire (Maurya & Pandey, 2020). Pour cela, le test de suivi de la viabilité cellulaire a été effectué afin d'évaluer l'effet toxique du fer et les tests de mesure de stress oxydatif ont été réalisés pour évaluer la toxicité de fer et la protection des huiles.

1. Caractérisation de la toxicité du fer

Afin d'évaluer la cytotoxicité du fer, nous avons choisi la concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) étant donné que le concept de la IC_{50} est largement utilisé pour étudier l'inhibition des réactions enzymatiques (Caldwell et al., 2012). Cette dose correspond à la concentration de fer pouvant causer la mort de 50% de la population cellulaire après 24 heures de culture cultivée en présence de l'agent toxique dans un milieu PPYG.

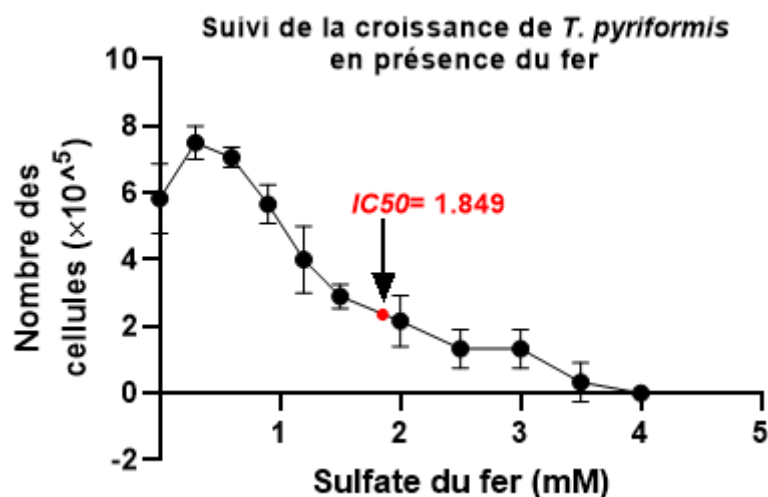


Figure 36: Effet de l'huile d'argane et d'olive et du fer sur la croissance de *Tetrahymena pyriformis*.

Le nombre de cellules est déterminé en présence de différentes concentrations de fer. Les données représentent la moyenne \pm écartype de trois essais différents. La valeur d'IC 50 est déterminée par le logiciel Graph Pad Prism.

Le comportement de *T.pyriformis* a été suivi dans un environnement stressant causé par le FeSO_4 qui génère du stress oxydatif chez les protozoaires. Les résultats de la densité cellulaire de *T. pyriformis* en présence des concentrations croissantes du fer (**Figure 36**) rapporte qu'à de faibles concentrations, inférieures à 0,5 mM, le fer semble stimuler la croissance cellulaire de *T.pyriformis* de près de 30 % (de $5,8 \times 10^5$ sans fer à $7,5 \times 10^5$ cellules par ml en présence de 0,3 mM de FeSO_4). Bien que les concentrations de fer de 1 mM à 4 mM nuisent à la croissance de *T.pyriformis* en fonction de la dose utilisée. Les concentrations de fer supérieures à 0,3 mM sont toxiques ou létales, ce qui a réduit la croissance des cellules et a entraîné une diminution du nombre de cellules de $7,5 \times 10^5$ cellules par ml jusqu'à la mort de toutes les cellules. La concentration de 4 mM de fer inhibe complètement la croissance cellulaire. Ainsi, le fer à haute concentration pourrait être un agent anti-croissance en raison de sa toxicité. Dans ces conditions et d'après la courbe de la croissance cellulaire, l'IC50 déterminée de FeSO_4 a été fixée à 1,85 mM pour créer l'environnement de stress oxydatif.

2. Evaluation de l'effet de l'huile d'argane sur le stress oxydatif induit par le fer

Lors d'un stress oxydant, les ERO non détoxiquées par le système antioxydant attaquent par oxydation les macromolécules à leur contact. Donc, une source d'antioxydants est indispensable pour se protéger. Nos résultats précédemment cités ont montré que les 2 huiles disposent d'un potentiel antioxydant. Pour tester l'effet protecteur de l'HA contre le stress

oxydatif généré par le fer, nous avons évalué la défense antioxydante chez *T.pyriformis*. En conséquence, les activités enzymatiques antioxydantes, y compris la GPx et la SOD, ainsi que les marqueurs de stress oxydatifs, y compris les niveaux de GSH et MDA, ont été analysés après un traitement au fer en présence et en absence d'HA ou d'HO.

2.1 Effet du fer et de l'huile d'argane sur l'activité des enzymes de stress oxydatif

Une induction dans les activités SOD et de GPx a été constatée chez les cellules *T.pyriformis* sous le traitement du fer (**Figure 37**). En plus, l'HA et l'HO ont montré une réduction significative de l'activité du GPx par rapport aux groupe fer. En outre, le traitement des cellules par les deux huiles a modéré le stress en préservant son niveau normal comparativement au groupe de fer. Ces résultats ont montré que l'HA et l'HO empêchent les cellules de protozoaires de modifier leurs capacités antioxydantes.

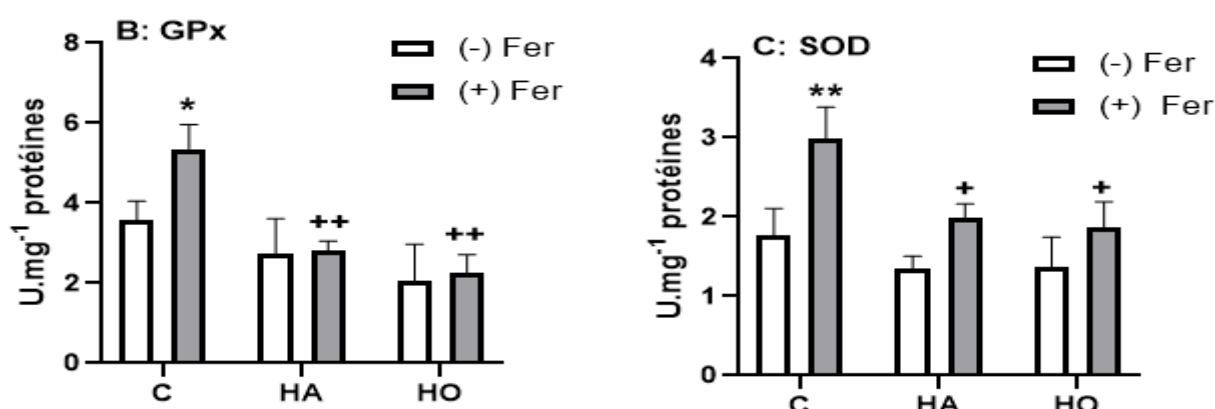


Figure 37: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les capacités antioxydantes de *Tetrahymena pyriformis* suite à la toxicité induite par le fer.

(A) Activité de la glutathione peroxydase (GPx); et (B) Activité de la superoxyde dismutase (SOD). Après 24 heures de culture dans le milieu PPYG, cellules sans fer ou huiles (Contrôle : C); cellules supplémentées avec 1849 μM du fer (FeSO_4); 0.9% de l'éthanol (Et), 0.1% de l'huile d'argane (HA) ou l'huile d'olive (HO), fer plus HA ($\text{FeSO}_4 + \text{HA}$) or HO ($\text{FeSO}_4 + \text{HO}$) ont été incubés pendant encore 24 heures. Toutes les valeurs présentent la moyenne \pm écartype sur 3 différents essais ; ($p < 0.05$ comparé au contrôle, $^{++}p < 0.01$, $^+p < 0.05$ comparé à FeSO_4 représentent les probabilités de significativité statistique.

2.2 Effet du fer et de l'huile d'argane sur les marqueurs de stress oxydatif

Selon les résultats déterminés (**Figure 38**), une induction significative de la teneur de GSH chez les cellules du protozoaire a été observée sous l'effet du fer par rapport au groupe représentant le contrôle. En revanche, chez les cellules sous l'effet du fer, l'HA et l'HO ont

allégé le stress par la diminution du taux de GSH à son niveau normal. Ces résultats laissent suggérer que la réduction de GSH est peut être due à l'augmentation du statut antioxydant. Par ailleurs, le niveau de MDA n'est pas influencé ni par le fer ni par les huiles puisque tous les groupes ont gardé un niveau normal de MDA. Des effets différentiels de l'HA et l'HO ont été enregistré sur le taux de GSH et l'éthanol a baissé le niveau de MDA comparativement au groupe représentant le contrôle.

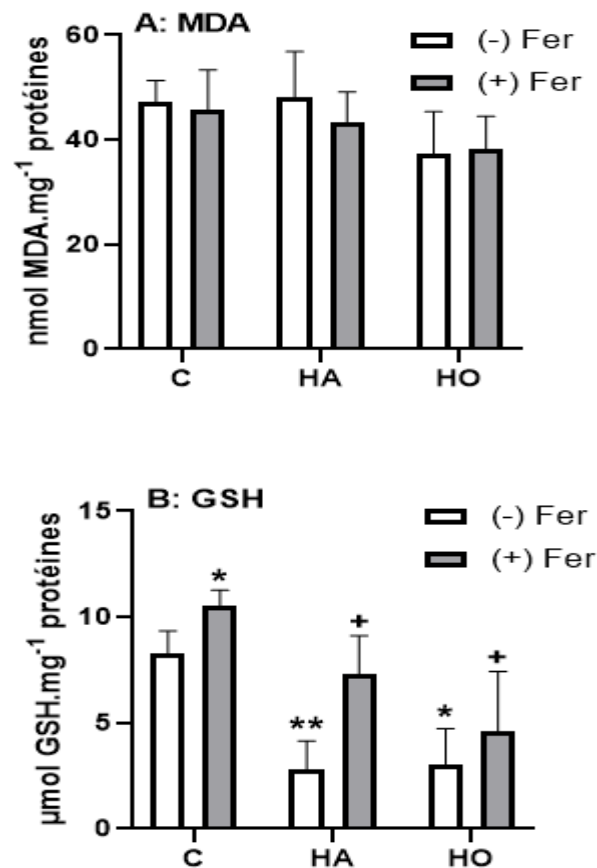


Figure 38: Effet de l'huile d'argane et d'olive et du fer sur les capacités antioxydantes de *Tetrahymena pyriformis* suite à la toxicité induite par le fer.

(A) Niveau de la peroxydation lipidique (MDA); (B) Niveau du glutathion (GSH). Après 24 heures de culture dans le milieu PPYG, cellules sans fer ou huiles (Contrôle : C) ; cellules supplémentées avec 1849 μM du fer (FeSO_4); 0.9% de l'éthanol (Et), 0.1% de l'huile d'argane (HA) ou l'huile d'olive (HO), fer plus HA (FeSO_4 + HA) or HO (FeSO_4 + HO) ont été incubés pendant encore 24 heures. Toutes les valeurs présentent la moyenne \pm écartype sur 3 différents essais. * $p < 0.01$, $p^* < 0.05$ comparé au contrôle, + $p < 0.05$ comparé à FeSO_4 représentent les probabilités de significativité statistique.

A la lumière des résultats de la partie *in vitro* sur les cellules de protozoaire *Tetrahymena pyriformis*. Nous notons que le fer a influencé la croissance des cellules d'une manière dose-

dépendante. En effet, à des concentrations inférieures à 0,5 mM, il a favorisé la croissance cellulaire, le fer semble jouer un rôle stimulateur de la croissance. Au-delà de cette dose, le fer inhibe la croissance du protozoaire. Le suivi de la croissance en fonction des différentes concentrations du fer nous a permis de déterminer la dose IC50 utilisée par la suite dans le traitement des cellules. Le fer à IC50 a influencé le statut redox cellulaire. Globalement, il a engendré une induction significative de l'activité des enzymes de stress (SOD et GPx) ainsi que du produit marqueur du stress oxydatif (GSH). Tandis qu'il n'a pas pu varier la teneur de MDA. Les deux huiles testées ont prouvé leur potentiel antioxydant contre l'effet oxydant du fer. En effet, elles ont atténué le niveau de stress par le retour des activités enzymatiques (SOD et GPx) et du taux de GSH vers la normale.

IV. Etude *in vitro* sur les fibroblastes embryonnaires humains MRC5

1. Evaluation de l'intégrité de l'ADN chez les cellules MRC5 cultivées sous des conditions d'hyperoxie

Le fer génère les ERO via les réactions de Fenton et d'Haber Weiss en stimulant des dommages oxydatifs aux structures cellulaires à citer les acides nucléiques en causant des cassures doubles brins (Milic et al., 2016).

Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet protecteur de l'huile d'argane contre les dommages à l'ADN dans le tissu hépatique, nous avons effectué un essai similaire dans des cellules MRC-5 *in vitro* en cultivant des cellules sous un stress oxydatif accru : l'hyperoxie ($\geq 40\% O_2$). Nous avons détecté le paramètre des dommages à l'ADN (nombre de foyers $\gamma H2A.X$) à l'aide de l'immunomarquage $\gamma H2A.X$.

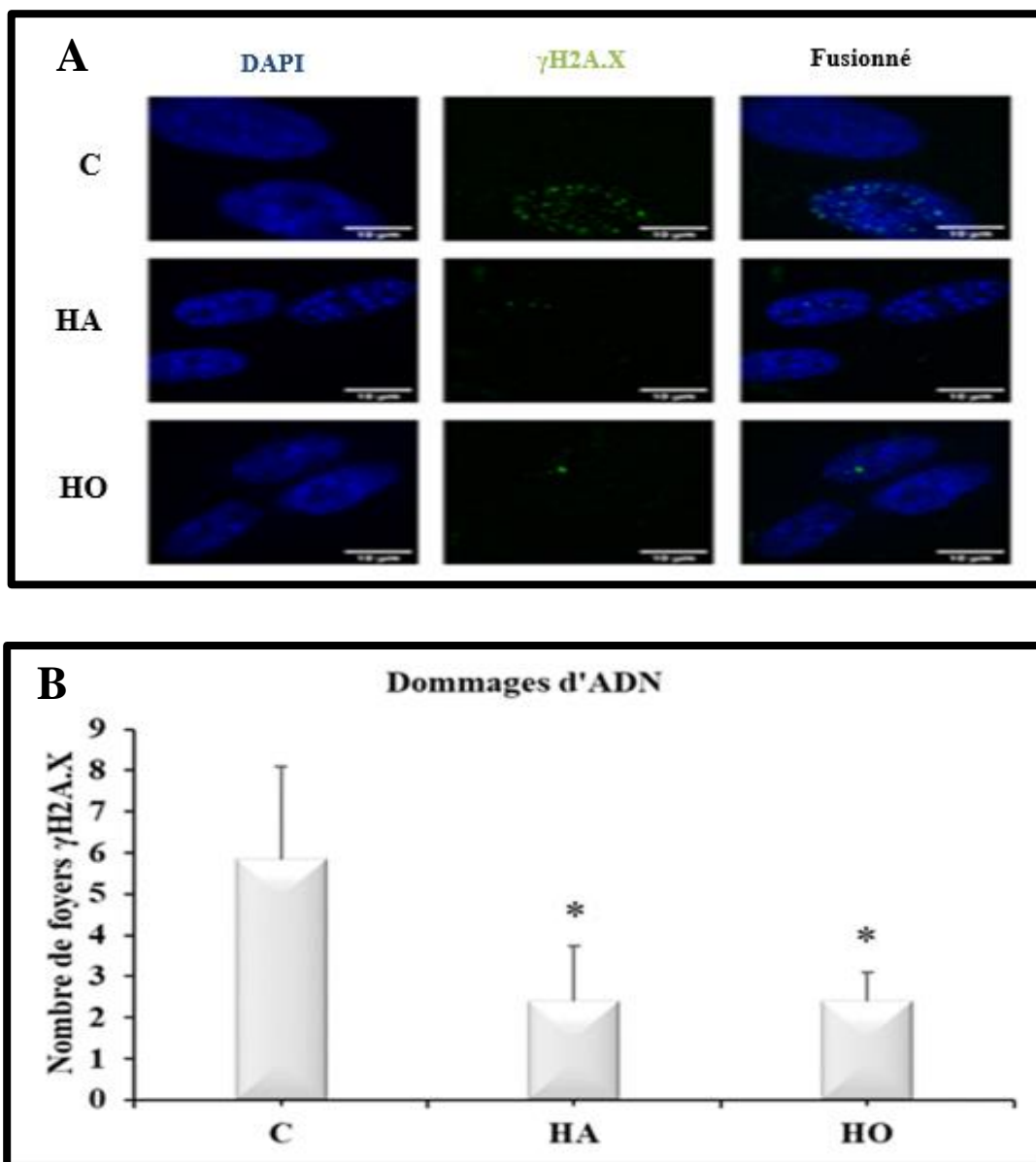


Figure 39: Mesure des dommages d'ADN chez les fibroblastes humains cultivés sous les conditions d'hyperoxie.

A : Images représentatives des foyers γ H2A.X dans le tissu hépatique (x400). Vert : foyers γ H2A.X, Bleu : DAPI.
 B : Nombre moyen des foyers γ H2A.X. Toutes les valeurs présentent la moyenne \pm écart type de la moyenne sur 4 différents essais. (** $p < 0.05$) comparé comparé au contrôle représente les probabilités de significativité statistique.

La **Figure 39 B** rapporte que l'HA a un effet similaire à celui de l'HO par rapport au contrôle. En effet, les deux huiles ont réduit le nombre de foyers γ H2A.X de manière significative à environ la moitié chez les cellules traitées par l'HA et l'HO et exposées à une

forte concentration de l'oxygène comparé au groupe contrôle cultivé sous l'hyperoxie. Ces résultats intensifient l'effet bénéfique de l'huile d'argane et l'huile d'olive contre les dommages d'ADN.

2. Evaluation de la morphologie cellulaire des MRC5 sous la microscopie à contraste de phase

Les fibroblastes humains MRC5 ont été cultivés dans des plaques de 6 puits. Après 24 heures de culture, l'HA ou l'HO ont été ajoutées aux cellules à une concentration finale de 0,1%. Après 3 et 7 jours de culture sous des conditions d'hyperoxie (40% d'oxygène), les cellules ont été observées sous microscope à contraste de phase et des images ont été capturées pour chaque condition de traitement afin d'évaluer qualitativement l'adhérence et la morphologie des cellules. La présence de cellules non adhérentes (cellules arrondies réfringentes) constitue un critère de toxicité.

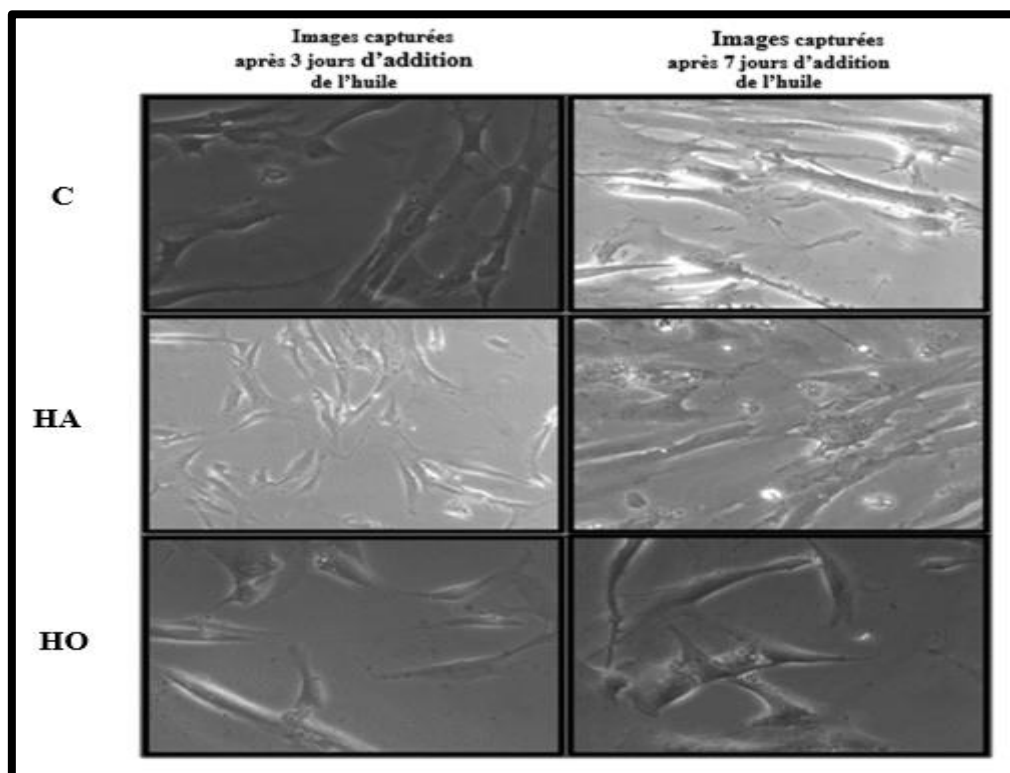


Figure 40: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur les fibroblastes humains cultivés sous des conditions d'hyperoxie.

Les images représentatives des fibroblastes capturées sous microscopie à contraste de phase. Les cellules MRC5 sont traitées pendant 7 jours en présence ou absence de l'huile d'argane ou d'olive (0,1%). L'observation a été réalisée par microscopie en contraste de phase. Grossissement *20.

Les images (**Figure 40**) montrent que la morphologie des cellules contrôles et des cellules traitées avec les 2 huiles ne présente pas des changements morphologiques marqués. Autrement dit, pas de cellules rondes ou non adhérentes ont été visualisées. La morphologie ronde des cellules correspond aux cellules flottantes et mourantes ce qui est caractéristique de la cytotoxicité. Au vu de ces observations, on peut conclure que la culture des MRC5 sous des conditions d'hyperoxie en présence 0,1% de l'HA ou l'HO n'ont aucun effet toxique sur la croissance cellulaire.

3. Effet de l'huile d'argane sur le piégeage des peroxydes intracellulaires

Les tests colorimétriques FRAP, DPPH et ABTS suggéraient que HA et HO ont un potentiel antioxydant. Nous avons investigué ces résultats pour vérifier leur effet sur la production des peroxydes intracellulaires dans les MRC 5. Nous avons utilisé la sonde DHR 123 (**Berkelhamer et al., 2013**) afin de mesurer la fluorescence à l'aide d'un cytomètre en flux dans les MRC-5 cultivées dans des conditions d'hyperoxie connue par l'induction du stress oxydant et par conséquent la production des ERO.

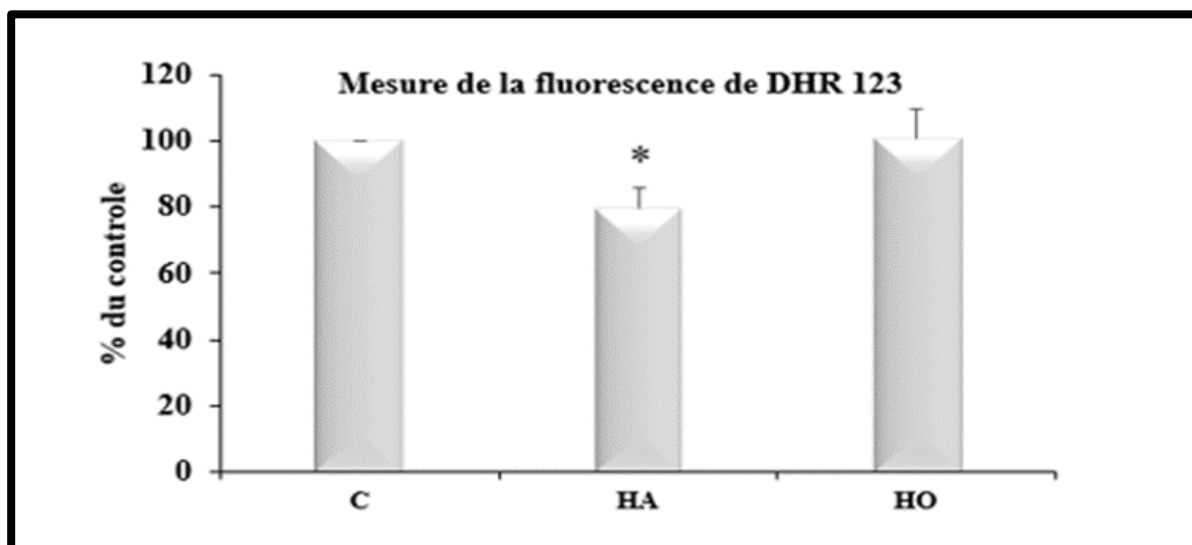


Figure 41: Effet de l'huile d'argane et d'olive sur le piégeage des peroxydes intracellulaires chez les fibroblastes humains cultivés sous les conditions d'hyperoxie.

Toutes les valeurs présentent la moyenne \pm écartype de la moyenne sur 9 différents essais. (* $p < 0.05$) comparé au contrôle représente la probabilité de significativité statistique.

Nous avons constaté une diminution significative de la fluorescence au niveau du filtre 1 (FL1) en présence de l'huile d'argane comparativement aux cellules témoins dans des conditions d'hyperoxie. En revanche, aucune différence significative n'a été observée entre les cellules témoins et les cellules traitées à l'huile d'olive pour les niveaux des ERO (**Figure 41**).

A lumière des résultats de l'étude *in vitro* effectuée sur la lignée cellulaire de type fibroblastes MRC 5. Nous notons que l'HA et l'HO a montré une amélioration importante où le taux des dommages d'ADN est revenu à un niveau plus bas. Ce résultat est en accord avec celui de l'étude *in vivo* réalisée sur les hépatocytes des souris. Les deux études (*in vivo et in vitro*) vont dans le même sens de variation ce qui confère aux deux huiles la propriété d'agent anti-dommages d'ADN. Par ailleurs, seule l'HA était apte à piéger les peroxydes d'hydrogènes chez les fibroblastes cultivées sous les conditions d'hyperoxie ce qui confère à l'HA la propriété d'un antioxydant puissant au piégeage des radicaux libres de type peroxydes d'hydrogènes. En plus, l'HA et l'HO à la concentration de 0,1% n'avait aucun effet toxique ou léthale sur les fibroblastes.

A la lumière de tous les résultats obtenus dans cette thèse, nous notons que l'HA et l'HO contiennent les chlorophylles, les caroténoïdes et les polyphénols à des degrés divers. Ces derniers promeuvent des propriétés antioxydantes et chélatrices du fer. Cet effet est confirmé par trois tests chimiques à savoir FRAP, DPPH et ABTS.

Les résultats de la partie *in vivo* réalisée sur le foie, les reins et le cerveau des souris ont montré que le fer à une concentration de 3,5 mg Fe^{2+} et les huiles à 6% n'ont aucun effet toxique ou mortel sur les souris. Le fer comme agent oxydant a touché les trois organes testés. Il paraît que le foie vient en premier en termes de degré de stress oxydatif induit par le fer, suivi par le cerveau et les reins en second lieu. D'autre part, les huiles ont modéré le stress oxydatif en faisant retourner le stress à un niveau normal. En outre, l'expression relative des ARNm du gène de la mnSOD dans le foie a montré que le fer tend à augmenter l'expression de la mnSOD les huiles, comme toujours, ont apaisé l'expression de la mnSOD. L'immunomarquage a révélé que le fer est un inducteur puissant des dommages d'ADN. En revanche, le traitement avec les 2 huiles a corrigé ce paramètre en diminuant le nombre de foyers vers la normale. Ces données suggèrent que les huiles étudiées ont une capacité considérable à réagir avec les radicaux libres

pour les convertir en espèces non réactives et interrompre la chaîne des réactions radicalaires. Le fer tend à augmenter l'expression d'IL-6 et COX-2. Les deux huiles étaient aptes à normaliser l'expression des marqueurs inflammatoires. Par contre, le fer n'avait aucun effet sénescence et les deux huiles comme toujours ont diminué l'expression de p16 et p21 à des niveaux subnormaux. Cela intensifie l'effet anti-inflammatoire et anti-sénescence des huiles.

Chez le protozoaire *Tetrahymena pyriformis*, le fer à la concentration de 1,85 mM (IC50) a engendré une induction de l'activité des enzymes de stress (SOD et GPx) ainsi que du produit marqueur du stress oxydatif (GSH). En revanche, les deux huiles testées ont prouvé leur potentiel antioxydant contre l'effet oxydant du fer.

Finalement, l'effet des huiles contre les dommages d'ADN a été reconfirmé chez les fibroblastes MRC5. Par ailleurs, seule l'HA était apte à piéger les peroxydes d'hydrogène chez les fibroblastes cultivées sous les conditions d'hyperoxie ce qui confère à l'HA la propriété d'un antioxydant puissant au piégeage des radicaux libres de type peroxydes d'hydrogène.

Tous nos résultats fournissent des données encourageantes sur les effets de l'HA et l'HO sur les dommages d'ADN, le stress oxydatif, l'inflammation et la sénescence cellulaire.

DISCUSSION

I. Caractérisation de l'huile d'argane

La quasi-totalité de l'huile d'argane est exclusivement marocaine, par contre peu d'études ont été réalisées sur l'huile d'argane comparativement aux autres huiles notamment l'huile d'olive. Donc, il est de notre responsabilité en tant que Marocains afin d'étudier profondément l'huile d'argane à tous les niveaux possibles. Nous avons également pour devoir d'évaluer ses vertus préventives, cosmétiques et nutritionnelles pour faire d'elle un excellent produit dans la gamme des huiles végétales. Dans cette thèse, nous avons :

- Etudier les paramètres physicochimiques de l'huile d'argane et de l'huile d'olive : en termes de leurs compositions en chlorophylles, caroténoïdes et polyphénols.

- Evaluer leur potentiel antioxydant par les tests chimiques : FRAP, DPPH et ABTS.

Par ailleurs, le potentiel antioxydant a été évalué aussi :

- *In-vivo* sur les souris : le potentiel antioxydant a été évalué sur le foie, cerveau et reins, le potentiel anti-inflammatoire et anti-sénescence a été évalué sur le foie des souris.

- *In-vitro* sur deux modèles cellulaires tels que les fibroblastes (MRC5) et la *Tetrahymena pyriformis*.

Tout d'abord, nous avons commencé par une étude comparative des paramètres de l'huile d'argane par rapport à l'huile d'olive qui a servi pour contrôle positif. Les données de la littérature ont montré que HA est une huile naturelle caractérisée par une composition particulière, avec une prédominance des acides gras insaturés ainsi qu'une fraction insaponifiable très riche en antioxydant tels que les polyphénols, les pigments caroténoïdes et chlorophylliens (**Badreddine et al., 2017; Ben Mansour et al., 2018; El Kharrassi et al., 2018; Guillaume et al., 2019**). Pour nous s'assurer de la qualité protectrice de HA et HO utilisées dans cette étude, nous avons caractérisé les deux huiles et par la suite nous avons évalué leur pouvoir antioxydant. Les résultats obtenus de la caractérisation des huiles ont montré que l'HO est riche en chlorophylles, caroténoïdes et en polyphénols par rapport à l'HA. Nos résultats sont en concordance avec la littérature, en fait, il a été démontré la présence des pigments caroténoïdes et chlorophylliens dans l'HA et l'HO (**Ben Mansour et al., 2018; Laincer et al., 2016**). La variabilité de la teneur en pigments pourrait s'expliquer par l'influence de plusieurs facteurs tels que la torréfaction des graines, la température, le temps, le processus d'extraction et les conditions de stockage (**Ben Mansour et al., 2018**). Par ailleurs, notre résultat de la teneur en polyphénols montre que l'HO contient 5 fois plus de polyphénols par

rapport à l'HA. L'HO se situait dans la même fourchette des résultats obtenus sur des HO de différentes régions d'Italie (**Del Carlo et al., 2004**) ce qui suggère que la teneur en polyphénols dans l'HO n'est pas influencée par l'origine de l'huile. De même, la quantité de phénols trouvée dans l'HA se situait dans la même fourchette des résultats obtenus par Marfil (**Marfil et al., 2011**). La variabilité des quantités de polyphénols peut varier selon le degré de maturité (**Elbir et al., 2015**), le temps de stockage des fruits avant la mouture (**Haouhay et al., 2015**), la période de récolte, le stade de développement de la plante, le patrimoine génétique (**Miliauskas et al., 2004**) et la méthode de quantification peut aussi influencer l'estimation de la quantité des phénols (**Lee et al., 2003**).

D'après la littérature, les polyphénols, les chlorophylles et les caroténoïdes sont doués d'un potentiel antioxydant (**Badreddine et al., 2020; Pérez-Gálvez et al., 2020**). Différentes méthodes antioxydantes ont été introduites pour mesurer et étudier la propriété antioxydante des antioxydants commerciaux, aliments, médicaments, produits pharmaceutiques et des échantillons biologiques (**Gulcin, 2020**). Le concept de la capacité antioxydante est issu de la chimie et par la suite a été adapté à la biologie, la médecine, l'épidémiologie et la nutrition (**Floegel et al., 2011**). Dans les dernières décennies, il y a un intérêt croissant dans les études de l'activité antioxydante des aliments et des régimes alimentaires en raison des implications connues des radicaux libres dans le développement de plusieurs maladies (**Garcia, 2008**). Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile d'argane et l'huile d'olive. Trois différents essais ont été réalisés : FRAP, DPPH et ABTS.

Le test FRAP est une méthode typique basée sur le transfert d'électron (**Gulcin, 2020**). Il est initialement appliqué au dosage du plasma plus tard à d'autres fluides biologiques, aliments et extraits de plantes (**Gülçin, 2012**). L'évaluation du potentiel réducteur du fer par le test FRAP a montré que l'HO est dotée d'un pouvoir chélateur du fer beaucoup plus par rapport à l'HA soit 5,6 fois plus élevé. Il a été signalé presque le même potentiel pour l'huile d'olive extra vierge d'Espagne (**Borges et al., 2017**). Nous pouvons conclure que même en changeant l'origine de l'huile, l'HO conserve sa capacité antioxydante. En ce qui concerne l'HA, des résultats similaires ont été trouvés dans l'HA de la même origine que l'huile testée (**Seiquer et al., 2015**). Ce qui suggère que le potentiel réducteur du fer de l'HA n'est pas influencé par la période de récolte. En comparant les résultats de la teneur en polyphénols avec ceux du test FRAP, on constate une corrélation positive puisqu'il s'agit de la même tendance de variation. En effet, l'HO contient 5 fois plus de polyphénols et a un pouvoir antioxydant 5,6 fois plus élevé par rapport à l'HA.

La méthode de piégeage du radical DPPH est l'une des méthodes les plus fréquemment utilisées et offre la première approche pour évaluer l'activité antioxydante (Gülçin et al., 2002). Elle a d'abord été utilisée pour déterminer le potentiel antioxydant des composés phénoliques. Plus tard, l'essai a été fait pour déterminer le potentiel antioxydant des échantillons biologiques (Köksal et al., 2009). Les résultats obtenus du piégeage du radical DPPH montrent que l'HO a une activité plus élevée que celle de l'HA. Nos résultats de l'HO et l'HA se situent dans la même fourchette des valeurs obtenues par Samaniego et Marfil respectivement (Marfil et al., 2011; Samaniego Sánchez et al., 2007). Les résultats de DPPH ne sont pas corrélés aux ceux des polyphénols. Pendant que la teneur en polyphénols de HO était 5 fois plus élevée que celle de HA, son pouvoir antioxydant n'était que de 1,5 fois supérieure par rapport à l'HA. La conclusion qu'on peut tirer c'est que l'HA a un potentiel antioxydant puissant (DPPH) même en présence d'une faible teneur de polyphénols.

Le test ABTS est un test de mesure de l'activité antioxydante. Il est trop sensible car les réactions avec les radicaux $ABTS^{\cdot+}$ impliquent le transfert d'atomes d'hydrogènes et transfert d'un seul électron (Köksal et al., 2009). Cette méthode peut s'appliquer sur les extraits et les liquides corporels (Awika et al., 2003). La mesure de l'activité de piégeage des radicaux libres a suivi la même logique des résultats précédents de FRAP et DPPH avec une forte activité de l'HO par rapport à l'HA. La valeur de piégeage du radical $ABTS^{\cdot+}$ de l'HA est plus grande que celle indiquée dans la littérature (Seiquer et al., 2015). Tandis que l'HO présente une valeur proche à celle rapportée dans la littérature (Bouarroudj et al., 2016). Comme mentionné dans le test DPPH, le pouvoir antioxydant de l'HO est de 1,7 (ABTS) fois supérieur par rapport à l'HA. On peut conclure que l'HA a un potentiel antioxydant puissant ABTS même en présence d'une faible quantité de polyphénols. L'activité antioxydante, évaluée par les trois tests, puissante pourrait s'expliquer par la composition des huiles qui dépend de la teneur en polyphénols (acide férulique, acide vanilique et tyrosol), tocophérols (α -tocophérol, β -tocophérol et γ - tocophérol) et stérols (spinastérol, scotténol et lupéol pour l'HA et $\Delta 5$ avénastérol et campestréol pour l'HO), une forte corrélation positive a été trouvée entre la quantité de phénols et le potentiel antioxydant (Seiquer et al., 2015).

Les trois tests de la mesure de l'activité antioxydante (FRAP, DPPH et ABTS) utilisés dans cette thèse présentent une vision globale sur le pouvoir antioxydant de l'huile puisque les résultats fournis sont complémentaires. Dans les trois tests, nous avons utilisé le même standard

qui est le trolox pour qu'on puisse comparer le potentiel antioxydant des deux huiles entre les trois différents tests. Les résultats obtenus par l'étude de la composition en pigments et en polyphénols, l'activité antioxydante et antiradicalaire de l'huile d'argane et l'huile d'olive nous ont permis de conclure, que les huiles contiennent des composés doués d'activités antioxydantes vis-à-vis des radicaux libres et de la réduction du fer. La raison pour laquelle nous avons testé leur effet protecteur contre le stress oxydatif induit par le fer *in vivo* sur de souris et *in vitro* sur *Tetrahymena* et par l'hyperoxie sur les fibroblastes.

II. Evaluation de l'effet de l'huile d'argane *in vivo*

Les réactions redox sont importantes pour la vie aérobie (Halliwell, 2006). Donc, le maintien d'un équilibre redox cellulaire est aussi important. Le maintien peut être réalisé par des facteurs tels que les antioxydants qui neutralisent les radicaux libres (comme les espèces réactives d'oxygène (ERO)) (Nogueira et Hay, 2013). Les ERO se forment dans des cellules vivantes à la suite du métabolisme normale de la cellule à citer les anions superoxydes, les radicaux hydroxyles et les peroxydes d'hydrogène. Les ERO au niveau physiologique sont considérées comme un signal régulant divers processus physiologiques (He et al., 2017) et jouent un rôle dans le maintien de la prolifération cellulaire et l'homéostasie. En revanche, à un niveau élevé, ils induisent le stress oxydatif entraînant des dommages oxydatifs (Xue et al., 2020). De nombreux métaux peuvent induire un stress oxydatif en conséquence de la formation des ERO (Khalid et al., 2020). Parmi ces métaux on trouve le fer, qui est un composant essentiel des cellules vivantes et à la santé humaine. Cependant, une quantité excessive conduit à une surcharge qui pourrait causer diverses maladies tels que les dommages hépatiques chroniques (Xie et al., 2019) sachant que le foie est l'organe responsable du stockage et de la régulation du fer (Rishi et Subramaniam, 2017). Dans la présente étude, nous avons visé l'évaluation des effets antioxydants et/ou protecteurs de l'huile d'argane contre la toxicité de la surcharge ferrique, chez les souris, provoquée par l'administration du médicament Tardyferon 80mg qui représente un apport en fer appartenant à la classe pharmacothérapeutique : préparations antianémiques. L'étude *in-vivo* examine le potentiel antioxydant et/ou protecteur de l'huile d'argane ou d'olive sur des souris qui ont été exposées au fer à une concentration de 3,5 mg Fe²⁺/ litre par accès libre pendant 28 jours. À cet effet, la masse corporelle des souris, la masse relative des organes et le stress oxydatif au niveau du foie, du cerveau et des reins ont été mesurés. Par ailleurs, les dommages d'ADN, l'inflammation et la sénescence cellulaire ont été évalués sur le foie.

Le traitement des souris par le sulfate du fer a causé une diminution non significative (à peu près de 5%) de la masse corporelle des souris alors que les souris des groupes contrôles ont gagné du poids à la fin de la période du traitement. L'absence du gain de la masse corporelle chez le groupe traité par le fer suggère un degré de toxicité causé par le métal soit lié à l'appétit ou à la toxicité. Concernant les souris surchargées de fer après le traitement à l'huile d'argane et d'olive, elles ont montré une augmentation de la masse corporelle ce qui suggère que les deux huiles à la concentration de 6% n'ont aucun effet toxique. En fait, ce gain est dû probablement à la stimulation de l'appétit par les huiles, à la chélation du fer ou à l'apport énergétique des acides gras contenus dans les deux huiles. Les résultats sont en concordance avec la littérature, il a été démontré que l'huile d'argane induit une amélioration significative de la masse corporelle (**Bnouham et al., 2008**). En plus, le fer et/ou les huiles n'ont aucun effet toxique sur la masse relative des organes à savoir le foie, le cerveau et les reins puisque aucun changement n'a été observé.

Le fer conduit à la production des ERO via les réactions de Fenton et d'Haber Weiss (**Milic et al., 2016**). Le pouvoir antioxydant de l'huile d'argane est bien décrit dans cette étude en utilisant des essais chimiques. Cependant, peu d'articles ont discuté l'effet préventif de l'huile d'argane sur le stress oxydatif en utilisant le modèle animal *in vivo*. Dans notre approche multi-cible de la prévention de l'huile d'argane, nous avons essayé de se concentrer sur les potentiels protecteurs et/ou antioxydants. Les enzymes antioxydants (CAT, GPx et SOD) constituent la première ligne de défense pour éliminer ou prévenir la production des ERO. En effet, l'activité de la SOD catalyse la dismutation des anions superoxydes en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le produit de la dismutation (H₂O₂) est éliminé par l'enzyme CAT (**Ighodaro & Akinloye, 2018**). Au contraire, la GPx réduit le H₂O₂ en H₂O et réduit les hydroperoxydes lipidiques en alcools, le GSH endogène neutralise les ERO et les radicaux libres (**Rajendran et al., 2014**). L'augmentation ou la diminution des activités des enzymes antioxydantes dans divers organes reflète une adaptation des cellules au stress oxydatif induit par la surcharge en fer par la formation des ERO. Comme on le sait, le stress oxydatif est une conséquence de déséquilibre entre la production de radicaux libres et des défenses antioxydantes (**Lobo et al., 2010**) qui attaquent les acides gras polyinsaturés des membranes des cellules causant la peroxydation lipidique (**Taso et al., 2019**). Cette dernière entraîne l'augmentation de la rigidité, le changement de la perméabilité de la membrane, l'endommagement des récepteurs et la diminution des enzymes situés à la membrane (**Guéraud et al., 2010; Sultana et al., 2013**). Par ailleurs, le malondialdéhyde (MDA) s'agit du produit terminal de la peroxydation lipidique

et reflète du stress oxydant (Terrier-Lenglet et al., 2011). Cette peroxydation lipidique peut être accélérée par le fer (Ryan & Aust, 1992) et elle est proposée comme une étape par laquelle le fer induit des lésions cellulaires (Bonkowsky et al., 1981).

Le stress oxydant est impliqué dans plusieurs maladies du cerveau à cause de la sensibilité de celui-ci aux dommages médiés par les ERO (Antoine, 2016), vu son besoin constant d'oxygène (Césarini, 2004). Dans cette étude, nous avons montré que l'activité de la CAT dans le cerveau a montré une baisse dans le groupe enrichi en fer, alors que le niveau de la CAT augmente habituellement au niveau cellulaire en présence de H₂O₂ (Vetrano et al., 2005). Au contraire, il n'y avait aucune différence significative dans le cerveau sur les activités de la GPx et la SOD chez les souris traitées au fer. Dans notre cas, la diminution de l'activité de la CAT et l'activité normale de la GPx sont probablement liés à la non production de leur substrat H₂O₂ normalement produit par la SOD qui n'a pas aussi eu de modification. Dans le cas normal du stress oxydant, les ERO oxydent les principaux résidus de cystéine de Keap1 qui entraînent des changements conformationnels et l'incapacité de lier Nrf2 (voie de signalisation) (Scapagnini et al., 2011). Ce dernier se transfère ensuite au noyau (Ashrafizadeh et al., 2020) dans lequel il s'hétérodimérise avec une petite protéine Maf (Bellezza et al., 2018) où il cible l'élément de réponse antioxydante (ARE) (Bhakkiyalakshmi et al., 2018). Une fois activé, ARE déclenche par la suite l'expression des gènes comme la CAT, la GPx (Lakhan et al., 2009) et la SOD (Ashrafizadeh et al., 2020). Dans notre cas, il paraît que les cellules neuronales n'ont pas emprunté la voie de défense normale (voie Nrf2) pour faire face au stress oxydant qui se traduit normalement par l'élévation de l'activité des enzymes de stress. Cela peut s'expliquer par un affaiblissement des cellules dû au stress oxydatif accru causé par le fer, de sorte que les cellules neuronales n'avaient pas la capacité d'autodéfense face à la menace. En effet, l'affaiblissement des fonctions antioxydantes des cellules est traduit par la diminution de l'activité de la CAT et la stabilité des activités de la SOD et la GPx. D'autre part, la concentration de MDA dans le cerveau n'a pas été affectée par le traitement au fer dans la présente étude, ce qui suggère qu'il n'y a eu aucun effet sur la teneur en MDA dans le cerveau. Néanmoins, le marqueur du stress oxydatif GSH est significativement diminué dans le cerveau. Comme décrit dans la littérature, la diminution du niveau de GSH est le premier indicateur du stress oxydatif en relation avec la maladie de Parkinson (Dringen, 2000). Dans le même sens, chez les parkinsoniens on trouve un niveau de fer élevé (Ndayisaba et al., 2019). Ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour les travaux de recherche dans ce domaine. Pour remédier aux effets néfastes du fer, nous avons constaté que la supplémentation des huiles ont pu les contrer de manière à normaliser l'activité

CAT et le niveau du GSH. En plus de leur richesse en acides gras, tocophérols et en stérols, l'HA et l'HO sont riches aussi en polyphénols (acide vanillique, acide syringique, acide férulique et tyrosol) avec la prédominance de l'acide férulique dans l'HA et le tyrosol dans l'HO. Les polyphénols sont connus comme régulateurs de la voie de signalisation Nrf2 de manière à déclencher l'expression des enzymes de stress comme décrit précédemment. Il paraît que ces composés ont consolidé et renforcé les défenses antioxydantes des cellules en déclenchant l'expression de la CAT et par la suite l'augmentation de son activité au niveau de cerveau. Non seulement ça, mais aussi ils ont induit la synthèse de GSH puisque même à des concentrations relativement faibles, les polyphénols stimulaient la transcription du gène pour la synthèse du GSH dans les cellules (**Rodrigo et al, 2012**). En conclusion, il paraît que les deux huiles ont réussi à renforcer les cellules neuronales afin de neutraliser le déséquilibre en ERO induit par le fer.

Non seulement le cerveau qui est sensible aux ERO mais ces dernières sont impliquées aussi dans l'apparition de nombreuses pathologies rénales (**Dev & Babitt, 2017**). Les reins assurent plusieurs fonctions essentielles pour l'organisme. Ils permettent d'une part d'éliminer les déchets endogènes ou exogènes. D'autre part, ils jouent un rôle dans le maintien de l'équilibre homéostatique (**George P. Hemstreet, 1998**). Contrairement aux résultats du cerveau, l'évaluation du stress oxydatif au niveau rénal a montré qu'il y ait eu une diminution significative de la GPx et une augmentation de l'activité de la SOD au niveau des reins des souris surchargées en fer. Par contre, l'activité de la CAT au niveau des reins n'a pas été affectée par le traitement au fer dans la présente étude. Nos résultats corroborent avec des études antérieures (**Guan et al., 2013; Pari et al., 2015; Toblli et al., 2011; Toblli et al., 2017; Yatmark et al., 2016**). La diminution de l'activité de la GPx et l'activité normale de la CAT montrent que le H₂O₂ produit par la SOD n'est pas pris par la GPx et la CAT afin de le décomposer. L'augmentation de l'activité de la SOD est due probablement à l'activation de la voie de signalisation Nrf2 par les ERO générées par l'agent stressant le fer. Cette activation est traduite par l'expression de l'enzyme du stress SOD et par la suite l'augmentation de son activité. La diminution de l'activité GPx et la stabilité de la CAT suggèrent que le fer a induit un stress oxydant traduit par un affaiblissement des fonctions antioxydantes à savoir la CAT et la GPx pour faire face au H₂O₂ produit par la SOD. Le H₂O₂ non neutralisé peut fortement provoquer des lésions cellulaires à des concentrations inappropriées causant la mort cellulaire (**Heo et al, 2020**). Par ailleurs, les concentrations de MDA et de GSH dans les reins n'ont pas été affectées par le traitement au fer dans la présente étude. Cela explique la stabilité des niveaux

de MDA et de GSH au niveau des reins. Tous ces effets négatifs du fer, l'HA et l'HO ont réussi à les contrer et les neutraliser. Les deux huiles ont normalisé l'activité des enzymes SOD et GPx. Cet effet probablement lié à leur teneur élevée en tocophérols, polyphénols et phytostérols (El Kharrassi et al., 2018). La plupart de ces composés peuvent agir en deux manières, la première consiste à l'activation du facteur de transcription Nrf2 (Martínez-Huélamo et al., 2017) et la deuxième s'agit de la capacité de ces composés d'émousser les dommages oxydatifs par des mécanismes de piégeage des radicaux libres (Visioli & Galli, 2001) qui sont prouvés par leurs activités antioxydantes (DPPH, ABTS et FRAP). Les acides gras oléiques en particulier et le 10-oxo-trans-11-octadécoïque (dérivé de l'acide linoléique) qui sont abondants en HA peuvent aussi fournir un environnement protecteur contre le stress oxydatif accru (Furumoto et al., 2016; Kinter et al., 1996).

En plus du cerveau et des reins, la surcharge ferrique est connue pour perturber l'équilibre redox intracellulaire et causer un stress oxydatif au niveau hépatique (Al-Basher, 2019) car le foie est l'organe responsable du stockage et de l'homéostasie de fer (Rishi and Subramaniam, 2017). Nos résultats montrent une diminution significative des activités de GPx et de SOD. Cependant, l'activité de la CAT n'a pas été affectée par le traitement au fer dans la présente étude. Ce changement des activités des enzymes est concomitant avec un niveau accru de MDA. D'autre part, la teneur en GSH dans le foie des souris chargées de fer n'a pas été affectée par le traitement au fer dans la présente étude. Dans notre cas, il paraît que les cellules hépatiques n'ont pas emprunté la voie de défense normale (voie Nrf2) pour faire face au stress oxydant qui se traduit normalement par l'élévation de l'activité des enzymes de stress. Cela peut s'expliquer par l'affaiblissement des fonctions antioxydantes par les ERO qui est traduit par une altération de l'activité de SOD et GPx et une augmentation du niveau de MDA. En d'autres termes, le système de défense antioxydant dans le foie était insuffisant pour offrir une protection complète contre les dommages induits par le fer. La réaction du foie au fer toxique a été une augmentation de la peroxydation lipidique, accompagnée de l'augmentation de la concentration de MDA ainsi que de la diminution des activités de SOD et de GPx. Cependant, le traitement par les deux huiles a pu augmenter la défense antioxydante au niveau du foie en limitant la teneur en MDA et en améliorant simultanément les activités GPx et SOD, diminuant ainsi la peroxydation lipidique. L'équilibre résultant de la peroxydation lipidique dans le foie a ensuite permis au système de défense antioxydant du foie de protéger efficacement l'organe contre les dommages dus aux ERO induits par la surcharge en fer. Dans notre cas, la protection par l'HA et l'HO est due à l'activation de la voie Nrf2 par les composés contenus dans les deux

huiles. Comme décrit précédemment, cette activation déclenche l'expression des enzymes de stress et par la suite l'augmentation de leur activité enzymatique.

Dans cette étude, les deux huiles utilisées, après vérification de leur potentiel de protection *in vivo*, ont montré la capacité à protéger le foie, le cerveau et les reins contre le stress oxydatif et à améliorer les défenses antioxydantes impliquant les enzymes CAT, GPx et SOD qui ont été très efficaces dans la préservation des niveaux de MDA et de GSH dans les trois organes étudiés. Dans ce contexte, les capacités de défense antioxydante doivent être considérées comme une réponse parallèle aux lésions antioxydantes, plutôt que comme une cause de la tolérance au stress oxydatif (El Kamouni et al., 2017). D'après les résultats de la mesure de l'activité des enzymes de stress (CAT, SOD et GPx) et l'évaluation des marqueurs du stress oxydatif (MDA et GSH), il paraît que le foie vient en premier en termes de degré de stress oxydatif induit par le fer, suivi par le cerveau et les reins en second lieu. Par ailleurs, le foie assure multiples fonctions, à savoir le stockage du fer, la désintoxication et l'homéostasie cellulaire (Stanger, 2015). Pour ces raisons, nous avons décidé de se focaliser sur le foie et d'étudier profondément autres paramètres liés à la surcharge en fer et au stress oxydant tels que les dommages d'ADN, l'expression génique de l'enzyme de stress (MnSOD), l'inflammation et la sénescence cellulaire.

Dans les hépatocytes surchargés de fer, ce dernier participe à la propagation des ERO via l'induction du stress oxydatif à savoir la réaction de Fenton qui provoque des lésions cellulaires et tissulaires (Milic et al., 2016; Xie et al., 2019) ainsi que la fragmentation d'ADN (Nakamura et al., 2019). Dans la réaction de Fenton catalysée par le fer, il y a production du radical hydroxyle. Ce dernier interagit avec les bases azotées de l'ADN à savoir adénine, guanine, cytosine et thymine. Le type d'interaction s'agit de l'ajout du radical hydroxyle aux carbones des bases ainsi qu'une abstraction de l'hydrogène de la fonction amine des bases. Ces altérations si elles ne sont pas réparées peuvent induire une instabilité génétique à savoir les cassures chromosomiques (Dizdaroglu & Jaruga, 2012; Koechlin-Ramonatxo, 2006). Dans la présente étude, l'intégrité de l'ADN a été évaluée par la technique d'immunomarquage en utilisant γ H2A.X comme marqueur. En raison de sa sensibilité, le test γ H2A.X est maintenant utilisé dans de nombreuses recherches par les chercheurs et les cliniciens. En plus d'être largement utilisé pour la recherche fondamentale (Étude de la stabilité du génome et la réparation de l'ADN) au cours de la dernière décennie (Redon et al., 2011). Dans notre étude actuelle, nous avons constaté que la surcharge ferrique induit des dommages

au niveau de l'ADN par l'augmentation de nombre de foyers nucléaires. Nos résultats corroborent avec des études antérieures (Abalea et al., 1998; Hartwig & Schlegel, 1995). Lorsqu'une cassure double brin de l'ADN est induite, il y a mise en place d'une cascade de signalisation puis de réparation du dommage. Un certain nombre de protéines sont donc mobilisées et co-localisées au niveau du site de la cassure. La détection par immunofluorescence de ces différentes protéines permet de visualiser de façon indirecte les cassures double-brin sous forme de foyers nucléaires. En fait, La protéine ATM a été montrée pour être activée par des dommages d'ADN, il a été démontré par la suite qu'elle était recrutée et activée par des ruptures à double brin d'ADN à travers le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN). L'ATM existe sous une forme homodimérique inactive dans des conditions normales, mais elle est libérée sous une forme monomère active lorsqu'elle est associée au complexe MRN et exposée aux cassures double brin, un événement qui coïncide avec l'autophosphorylation de l'ATM. Ce qui permet son recrutement aux sites de dommages (Lee & Paull, 2020). Une fois activé, ATM peut ensuite phosphoryler une multitude de protéines, et notamment la sérine 139 de l'histone H2A.X permettant l'accrochage de MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein 1) (Stucki et al., 2005) qui va guider le recrutement des protéines de la réparation (Celeste et al., 2002). On peut conclure que le fer génère les ERO qui endommagent l'ADN, ces dommages vont par la suite activer la voie de signalisation ATM ce qui explique le nombre élevé des foyers nucléaires dans le groupe traité par le fer seul. Les dommages d'ADN induits par la surcharge en fer ont été rétablis aux valeurs de contrôle après le traitement avec l'HA et l'HO suggérant un effet protecteur des 2 huiles utilisées. De plus, l'HA est capable de réduire l'augmentation des niveaux urinaires du marqueur des dommages oxydatifs à l'ADN (8- hydroxydésoxyguanosine) (Şekeroğlu et al., 2017) et diminue la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes (Allai et al., 2015). La réduction du nombre de foyers peut être expliquée par la capacité des antioxydants contenus dans les deux huiles à bloquer l'accumulation des ERO ce qui entraîne l'inactivation de la voie ATM qui se traduit par le nombre normal de foyers nucléaires (Lee & Paull, 2020).

En plus de la mesure de l'activité enzymatique des enzymes de stress (CAT, SOD et GPx), des marqueurs du stress (MDA et GSH) et des marqueurs des dommages d'ADN, nous avons réalisé une évaluation de l'expression relative des ARNm par qPCR pour la superoxyde liée au manganèse. La SOD est la première ligne de défense dans le répertoire des enzymes antioxydantes, catalysant la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène O₂ et en peroxyde d'hydrogène H₂O₂. Trois isoformes de la SOD ont été décrits : la SOD liée au fer, la SOD liée

au cuivre et au zinc et la SOD liée au manganèse. Il est à noter que chaque isoforme nécessite un métal de transition dans son site actif pour dismuter l'O₂ (**Bresciani et al., 2015**). La mnSOD est connue d'avoir des fonctions importantes dans un large éventail de maladies induites par le stress. La mnSOD est la seule enzyme essentielle à la survie dans un environnement aérobie. La mnSOD est essentielle à la vie avec une fonction critique peut être due à la localisation de la mnSOD dans les mitochondries. Les gènes MnSOD des humains, des bovins, des rats et des souris partagent plus de 90 % d'homologie dans la séquence de codage (**Borrelli et al., 2014**). Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'évaluer l'expression du gène mnSOD. Nous avons constaté que l'expression du gène de la superoxyde dismutase mitochondrial (mnSOD) a montré une tendance vers l'augmentation dans le groupe traité avec du fer par rapport au niveau de contrôle. Cette augmentation est concomitante avec les dommages à l'ADN, et donc vraisemblablement le stress oxydatif a augmenté dans cette condition. Il a été déjà montré que mnSOD peut être induite pour prévenir le stress oxydatif dans certaines tumeurs, au cours de l'ischémie / reperfusion ou le traitement de cytokine (**Cobbs et al., 1996; Dobashi et al., 2000; Liu et al., 2000**). En revanche, la mnSOD peut être réduite pendant le rejet de greffe, le vieillissement, l'asthme et le cancer (**Macmillan-Crow & Cruthirds, 2001; Taniguchi, 1992**). Dans cette étude, nous avons constaté une diminution significative de l'activité enzymatique totale de la SOD (CuZn-SOD, FeSOD et mnSOD). Tandis que l'expression du gène de la mnSOD montrait une augmentation. Cela peut s'expliquer par la régulation post-transcriptionnelle de l'expression du gène de la mnSOD.

En plus du stress oxydant et des dommages d'ADN. Les ERO peuvent aussi favoriser l'expression des gènes pro-inflammatoires incluant les cytokines TNF- α and IL-1 (**Jaeschke, 2000**). Les cytokines sont des facteurs solubles impliqués dans les réponses inflammatoires et sont connus comme les médiateurs inflammatoires. En plus, les cytokines sont des molécules de signalisation qui sont produits par différents types de cellules. De nombreuses fonctions cellulaires peuvent être contrôlées par des cytokines, y compris la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules. Ils possèdent des propriétés immunomodulatrices (**Tang et al., 2018**). Un point commun à ces gènes est le fait qu'ils sont tous régulés par le facteur nucléaire κ B (NF- κ B). NF- κ B est un facteur de transcription sensible à l'oxydoréduction, son activité peut être directement activée par les ERO. La plupart des études concernant l'activation NF- κ B induite par les ERO ont utilisé le H₂O₂ comme source directe des ERO. Il a été démontré que le NF- κ B peut être spécifiquement activé par l'ajout de H₂O₂ à de faibles concentrations (inférieures à 150 μ M) dans un milieu de culture (**Lepetsos et al.,**

2019). La surcharge ferrique est un facteur de modulation immunitaire (Olynyk & Clarke, 2001). Pour élucider l'effet inflammatoire du fer et l'effet anti-inflammatoire de l'huile d'argane et d'olive dans le foie, nous avons évalué le taux d'expression relative des ARNm des biomarqueurs de l'inflammation (IL-6, IL-1 β , TNF α et COX-2). Les résultats ont révélé que le fer tend à augmenter l'expression de IL-6 et COX-2 sans varier les 2 autres paramètres marqueurs de l'inflammation (TNF α et IL-1 β). En effet, le fer conduit à l'activation du facteur nucléaire KB (NF- κ B) dans les cellules Kupffer (She et al., 2002). L'activation de NF- κ B induit la sécrétion des cytokines proinflammatoires (Marcil et al., 2006). Néanmoins, les deux huiles étaient aptes à diminuer l'expression des 4 gènes pro-inflammatoires (IL-6, COX-2, TNF α et IL-1 β) à un niveau subnormal ce qui intensifie fortement l'effet anti-inflammatoire de l'HA et l'HO. Cette propriété protectrice pourrait être attribuée à l'activation de PPAR- α par les acides gras polyinsaturés de l'HA et l'HO qui sont des ligands du PPAR- α (El Kebbaj et al., 2015). Cette activation conduit à l'inhibition de NF- κ B qui reste séquestré dans le cytosol et abroge l'expression des gènes pro-inflammatoires à savoir l'IL-6 et le TNF α (El Kamouni et al., 2017; Kono et al., 2009; Zambon et al., 2006).

Il existe une relation étroite entre le stress oxydatif, les dommages à l'ADN et la sénescence cellulaire (Passos et al., 2007; Saretzki, 2010). La sénescence cellulaire est définie comme un arrêt irréversible du cycle cellulaire induit par de nombreuses variétés des stimuli comme les dommages à l'ADN. Considérant que le fer peut causer une accumulation des ERO et peut endommager l'ADN par la suite, on peut supposer que le fer est un puissant inducteur de la sénescence cellulaire. Parce que la sénescence cellulaire dépend de l'ampleur des dommages cellulaires, les cellules ne subissent probablement la sénescence cellulaire que lorsque la toxicité des ERO est à un niveau sublétal (Nakamura et al., 2019). La sénescence est un processus responsable du vieillissement. C'est un processus physiologique activé par les cellules en réponse à différents types de stress et conduisant à une dégradation des fonctions cellulaires puis de l'organisme. Il en existe deux types : la sénescence répliquative médiée par p53 et p21 ; et la sénescence prématurée induite par le stress oxydant et plutôt liée à l'activation de p16. En effet, les signaux de sénescence peuvent provoquer une réponse aux lésions de l'ADN (DDR) qui se traduit par l'activation de la p53 et de sa cible p21. Ces signaux stimulent aussi l'expression de p16 comme conséquence de la DDR. Les voies de signalisation de p16 et p21 convergent alors sur la protéine du rétinoblastome (Rb) grâce à l'inhibition des kinases dépendantes des cyclines (CDK) dont le rôle est d'inactiver Rb. L'activation de Rb en réponse à l'inhibition des CDK stimule fortement la sénescence en supprimant l'activité

transcriptionnelle du facteur de transcription E2F (**Bischof et al., 2009**). Les facteurs de transcription E2F constituent une famille de facteurs de transcription largement étudiés qui se lient à de multiples promoteurs de gènes cibles régulant leur expression et sont les plus connus pour leur fonction dans la progression du cycle cellulaire et la transition vers la phase S, synthèse de l'ADN et prolifération cellulaire (**Chen et al., 2009**). En effet, la surcharge ferrique conduit à l'apparition des ERO. L'accumulation des ERO est le déclencheur d'une grande variété de réponses de stress cellulaire, y compris les réponses des dommages à l'ADN. Il est bien connu que les dommages d'ADN activent la voie p53, ce qui conduit à la sénescence cellulaire (**Milic et al., 2016; Nakamura et al., 2019**). Dans cette étude, nous n'avons constaté aucun changement important dans l'expression de p16 et p21 chez les souris traitées au fer par rapport au témoin. Par ailleurs, le fer ne modifie pas la longueur du télomère hépatique (**Brown et al., 2007**). L'expression inchangée des gènes p16 et p21 chez les souris surchargées en fer dans notre cas pourrait être causée par la courte période de traitement (28 jours) chez de très jeunes souris, ces deux derniers paramètres pourraient ne pas être suffisants pour induire la sénescence malgré une augmentation significative des dommages à l'ADN qui est un inducteur bien connu de la sénescence. En outre, la quantité des dommages à l'ADN était plutôt petite chez le foie des souris traitées avec du fer. Par ailleurs, nos résultats soulignent également que les deux types de combinaisons (Fer + HA et Fer + HO) affichent un niveau d'expression inférieur à la normale. Ce qui suggère l'effet anti-sénescence des deux huiles. Cela peut s'expliquer par le fait que les deux huiles ont montré un effet contre les dommages d'ADN qui se traduit par l'inactivation de la voie p53 et p16 et par la suite la sénescence cellulaire (**Bischof et al., 2009**).

III. Evaluation de l'effet de l'huile d'argane *in vitro* chez *Tetrahymena pyriformis*

Le choix de protozoaire *Tetrahymena pyriformis* dans cette étude n'est pas arbitraire car l'utilisation de *Tetrahymena* comme organisme modèle présente divers avantages tels que c'est un organisme eucaryote microscopique unicellulaire approprié pour les expériences pharmacologiques permettant l'utilisation de marqueurs communs dans les expériences des animaux tels que les enzymes spécifiques et la croissance. La toxicité des produits chimiques sur *Tetrahymena* a été évaluée en fonction de la diminution de la croissance cellulaire (**Mortimer et al., 2010**). Le protozoaire *Tetrahymena* a été largement utilisé par de nombreux chercheurs pour évaluer le potentiel toxique des xénobiotiques dans l'environnement (**Mar et al., 2019**), mais également des médicaments et de la qualité de l'eau (**Mar et al., 2019**).

Un certain nombre d'études ont été effectuées en mesurant différents paramètres physiologiques tels que la croissance, densité cellulaire, morphologie, mobilité et biomarqueurs cellulaires. Dans des conditions optimales, la croissance de *Tetrahymena* est caractérisée par une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire. Ce comportement peut être utilisé pour les tests toxicologiques. Généralement, la densité cellulaire est déterminée automatiquement par un compteur électronique de particules ou sous un microscope par un hémocytomètre. *Tetrahymena* se distingue également par des changements dans la morphologie et la mobilité en présence des substances toxiques, ainsi qu'un changement dans l'expression des biomarqueurs qui sont très recherchés dans les études toxicologiques (Mar et al., 2019). *T. pyriformis* a une courbe de croissance typique dans des conditions normales. Cette courbe est modifiée dans des conditions de stress. Les résultats rapportés dans le présent travail montrent que FeSO₄ affecte nettement la courbe et inhibe la croissance du protozoaire. Il a été signalé que le fer causait l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire des fibroblastes humains (Campo et al., 2003). Par conséquent, cela pourrait s'expliquer par le déséquilibre entre la génération de radicaux libres et les antioxydants (Jain et al., 2011). La dysrégulation en fer des activités antioxydantes a été révélée par les activités modifiées des enzymes antioxydantes (SOD et GPx). Dans cette étude, une augmentation significative des activités SOD et GPx et des niveaux de GSH ont été observés, prouvant l'induction du stress oxydatif par le fer. Simultanément, aucun changement n'a été observé au niveau de MDA. La réaction de la SOD avec l'excès de superoxyde produit du peroxyde d'hydrogène. Il est bien connu que ni H₂O₂ ni superoxyde ne sont très toxiques; cependant, en présence de métal, ces espèces sont transformées en radicaux hydroxyles par la réaction de Haber-Weiss ou la réaction de Fenton (Shull et al., 1991). Ces résultats peuvent refléter une réaction de défense contre les effets oxydants des métaux au lieu d'une tolérance au stress oxydatif. Ainsi, comme décrit précédemment pour les cellules de mammifères (Allameh et al., 2010). Les effets toxiques du fer sur *T. pyriformis* peuvent résulter de sa capacité à perturber les fonctions mitochondriales et la division cellulaire, conduisant à la mort cellulaire. En outre, les enzymes antioxydantes sont considérés comme la première ligne de défense et participer au mécanisme de protection pour prévenir et réduire le stress oxydatif (Ighodaro & Akinloye, 2018). Dans ce contexte particulier, les traitements avec l'HA et l'HO ont montré une réduction du stress oxydatif par rapport au groupe stressé, comme en témoigne la conservation des activités normales dans les groupes des traitements combinés. Cette augmentation de l'activité de ces deux enzymes est capable de protéger les cellules contre la production du marqueur de stress oxydatif le MDA (Tosukhowong et al., 2003), ce qui explique son niveau normal même en présence de fer. Comme mentionné dans la partie *in vivo*

page 116, le facteur principal de transcription (Nucléaire érythroïde 2 (Nrf2)) joue un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes codant pour les enzymes antioxydants à savoir la CAT, la GPx et la SOD. Les caractéristiques antioxydantes de l'HA et de l'HO observées sur les cellules de *T.pyriformis* révèlent que le déséquilibre en ERO induit par le fer peut être neutralisé par l'HA, qui est probablement lié à sa forte teneur en polyphénols, tocophérols et stérols (schoténnol et spinastérol) (El Kharrassi et al., 2014) ce qui a permis à la cellule de développer un mécanisme compensatoire pour faire face au stress oxydatif au lieu d'emprunter le mécanisme normal qui se traduit généralement par l'élévation des activités de ces enzymes.

IV. Evaluation de l'effet de l'huile d'argane *in vitro* chez les fibroblastes humains MRC5

Afin d'évaluer et de confirmer l'effet antioxydant de l'huile d'argane, nous avons décidé de changer l'agent stressant le fer par l'hyperoxie comme source de stress oxydatif (Steinhorn & Lakshminrusimha, 2020) qui est induit par la production élevée ERO en causant des dommages à tous les composants de la cellule, y compris les protéines, les lipides et l'ADN (Li et al., 2018). L'hyperoxie est définie comme toute situation où des cellules, des tissus ou des organes sont exposés à l'oxygène à une pression partielle supérieure à la normale (Horncastle & Lumb, 2019). D'un point de vue formel, la réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner successivement sur O_2 , en conduisant aux intermédiaires respectifs $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 et OH^{\cdot} . Ces intermédiaires sont appelés ERO ou encore espèces activées de l'oxygène, car ils ont une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui leur a donné naissance (Gardès-Albert et al., 2003). Les fibroblastes embryonnaires humains MRC5 sont le meilleur modèle cellulaire utilisé pour induire le stress oxydant par l'hyperoxie car cette lignée est dérivée du tissu pulmonaire humain et le poumon est l'organe humain qui est exposé aux concentrations les plus élevées d'oxygène atmosphérique et, par conséquent, il s'est développé des systèmes complexes pour s'adapter aux changements dans les concentrations d'oxygène (Steinhorn & Lakshminrusimha, 2020). Il a été signalé que l'hyperoxie induit des dommages à l'ADN chez les fibroblastes pulmonaires fœtaux humains primaires par rapport aux fibroblastes cultivées dans des conditions de normoxie (Ahmed et al., 2008; You et al., 2019). Ces dommages d'ADN se traduisent par l'augmentation du nombre de foyers. Cette dernière est due à l'activation de la voie ATM par les dommages d'ADN (voir pages 151 et 152) induits par l'hyperoxie. D'autre part, les deux huiles ont contré efficacement les effets nuisibles de l'hyperoxie en diminuant le nombre de foyers marqueurs des dommages

d'ADN. L'HA et l'HO ont pu inverser *in vitro* les dommages d'ADN dans les MRC-5 cultivés dans des conditions d'hyperoxie. Ces résultats intensifient les effets bénéfiques de l'huile d'argane et l'huile d'olive contre les dommages d'ADN induits par l'hyperoxie. La réduction du nombre de foyers peut être expliqué par la capacité des antioxydants contenus dans les deux huiles à bloquer l'accumulation des ERO ce qui entraîne l'inactivation de la voie ATM qui se traduit par le nombre normal de foyers nucléaires (Lee & Paull, 2020). Le niveau du stress oxydatif *in vitro* a été mesuré par cytométrie en flux en utilisant la sonde dihydrorhodamine 123 (DHR) qui est une molécule non fluorescente qui, par oxydation, donne la rhodamine 123, une sonde cationique et lipophile. La lipophilie du DHR facilite sa diffusion à travers les membranes cellulaires. Le H₂O₂ oxyde la sonde DHR en présence des peroxydases en rhodamine fluorescente (Gomes et al., 2005). Les peroxydes intracellulaires tels que H₂O₂ peuvent être détectés par la coloration DHR123. L'HA a été capable de réduire les niveaux des ERO par rapport aux cellules témoins non traitées. Cependant, l'HO n'a pas montré un effet. Dans le même sens, une étude précédente sur le foie des souris traitées par la vitamine E et la toxine microcystine-LR (MC-LR) a montré que la vitamine E diminuait la fluorescence de la rhodamine123 par rapport aux animaux traités par MC-LR seul (Weng et al., 2007). D'après la littérature, l'HA contient trois principaux composés phénoliques à savoir l'acide férulique, l'acide syringique et l'acide vanillique. Ces derniers sont présents en faibles quantités dans l'HO. Les résultats pourraient être expliqués par le fait que les polyphénols contenus dans l'HA activent la voie Nrf2. Cette dernière déclenche l'expression de l'enzyme antioxydant la catalase qui dégrade le H₂O₂ intracellulaire en eau. Cela se traduit par la diminution de la fluorescence car l'oxydation de DHR123 par la catalase en rhodamine 123 reste minime. Il a été signalé que le traitement avec l'HA est tout à fait efficace pour améliorer l'état oxydatif (Er et al., 2020). Les résultats des dommages d'ADN au niveau des MRC5 confirment les résultats obtenus *in vivo* chez les souris dont le nombre de foyers était sensiblement plus élevé dans les fibroblastes humains cultivés sous les conditions d'hyperoxie. En outre, la quantité des dommages à l'ADN était plutôt petite au niveau hépatique des souris traitées avec le fer. Ces résultats intensifient les effets bénéfiques de l'huile d'argane et l'huile d'olive contre les dommages d'ADN induits par le fer ou l'hyperoxie.

Dans notre étude, on a pu montrer que l'HA et l'HO ont des propriétés antioxydantes du fer vu probablement à leur teneur en composés polyphénoliques et en pigments caroténoïdes et chlorophylliens. Notre étude suggère que l'HA et l'HO sont capables de contrecarrer le stress oxydant *in vivo* et *in vitro* et d'améliorer les dommages à l'ADN induits par la surcharge en fer

dans le foie des souris. De même, les deux huiles étaient capables de diminuer les dommages à l'ADN *in vitro* dans les fibroblastes humains pendant la culture en condition d'hyperoxie qui est connue pour augmenter le stress oxydatif. Tous ces résultats sont très probablement liés à leur composition et de leur potentiel antioxydant. Cependant, dans ce modèle, seule l'HA était capable de neutraliser les peroxydes intracellulaires. Notre étude a pu montrer une propriété protectrice présumée des deux huiles contre l'inflammation. Cet effet est probablement dû aux acides gras polyinsaturés et aux antioxydants. Par ailleurs, grâce aux antioxydants présents dans les deux huiles, une propriété protectrice présumée contre la sénescence a été montrée. Ensemble, nos données fournissent des données encourageantes sur les effets bénéfiques de l'HA et l'HO contre le stress oxydant et les dommages de l'ADN *in vitro* et *in vivo* ainsi que l'inflammation et la sénescence cellulaire *in vivo*

CONCLUSION GENERALE

L'alimentation figure parmi les facteurs susceptibles de jouer un rôle clé dans le développement ou la diminution du risque des maladies. L'huile d'argane est riche en acides gras mono et polyinsaturés et en antioxydants. Cette composition lui confère pour la santé humaine des propriétés bénéfiques se traduisant par des effets préventifs et antioxydants contre les maladies.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation d'une huile alimentaire endémique du milieu du Maroc : l'huile d'argane. Cette huile pourrait être utilisée dans le cadre de prévention nutritionnelle pour prévenir la progression des maladies où le stress oxydant est un élément clé. En effet, l'objectif de notre travail à chercher des substances, d'origine nutritionnelle, afin de protéger contre la toxicité induite par le fer et l'hyperoxie. L'huile d'argane a été choisie en raison de sa composition particulière et ses effets préventifs. L'effet éventuel de l'huile d'argane a été comparé à celui de l'huile d'olive comme huile de référence de consommation.

L'ensemble des résultats de la partie chimique ont montré que l'huile d'argane et d'olive contiennent des substances dotées d'un bon pouvoir chélateur du fer et antioxydant qui lui confèrent des propriétés préventives. Afin de prouver et confirmer les effets démontrés chimiquement.

Compte tenu des résultats susmentionnés, nous avons testé ces huiles sur un modèle animal (souris) et sur deux modèles cellulaires (*Tetrahymena pyriformis* et les fibroblastes embryonnaires humains MRC5) afin de prouver et confirmer les effets démontrés chimiquement.

Les résultats obtenus *in vivo* chez la souris traitée par l'huile d'argane ou l'huile d'olive supplémentée dans l'alimentation à raison de 6% ont montré que le fer à une concentration de 3,5 mg Fe²⁺ dans un litre d'eau de boisson a perturbé l'équilibre redox cellulaire en altérant les niveaux des paramètres marqueurs du stress oxydatif (SOD, GPx, CAT, MDA et GSH) au niveau du foie, des reins et du cerveau à des degrés divers. Ces résultats confèrent au fer un effet oxydant. Toutes ces altérations ont été modérées par les deux huiles en faisant retourner l'activité des enzymes et le taux des marqueurs du stress à un niveau normal. Ces données confèrent aux huiles des effets antioxydants en prouvant et confirmant les résultats démontrés dans la partie chimique. La surcharge ferrique est connue pour perturber l'équilibre redox intracellulaire et causer un stress oxydatif au niveau hépatique car le foie est l'organe responsable du stockage et de l'homéostasie de fer. Pour cette raison, nous avons décidé de se focaliser sur cet organe. Les données des enzymes (SOD, GPx et CAT) et des marqueurs de

stress (GSH et MDA) nous ont poussées à étudier et évaluer l'expression génique de la mnSOD dans le foie. Les résultats ont prouvé l'effet oxydant du fer et l'effet antioxydant des huiles. Par ailleurs, les dommages d'ADN peuvent résulter entièrement du stress oxydant. Cela a été confirmé dans notre étude. En effet, le fer a engendré des dommages d'ADN alors que les deux huiles, en raison de leur composition particulière à savoir les polyphénols, les tocophérols et les stérols ont clairement atténué les dommages d'ADN. Ce résultat confère un effet anti-dommage d'ADN aux deux huiles. La relation entre le stress oxydant et l'inflammation a été bien établie. Pour cette raison, l'expression des marqueurs de l'inflammation a été étudiée. En effet, les résultats ont révélé que le fer peut avoir un effet inflammatoire alors que les deux ont pu retourner avec succès les valeurs à un niveau normal. Ce qui prouve l'effet anti-inflammatoire de l'huile d'argane et d'olive, fortement, en raison de leur composition en acides gras. Par ailleurs, nous ne nous sommes pas arrêtés à ce niveau, nous avons évalué l'effet anti-sénescence de l'huile d'argane et d'olive contre la toxicité du fer au niveau du foie. En effet, les paramètres de sénescence cellulaire (p16 et p21) mesurés au niveau hépatique ont montré que le fer à la dose 3,5 mg Fe²⁺ n'a pas pu induire la sénescence cellulaire. Par contre, les deux huiles ont diminué l'expression de p16 et p21.

Les résultats obtenus *in vitro* sur le protozoaire *Tetrahymena pyriformis* ont montré que le fer est apte à influencer le statut redox cellulaire. Globalement, il a engendré une induction de l'activité des enzymes de stress ainsi que du produit marqueur du stress oxydatif. Les deux huiles testées ont prouvé leur potentiel antioxydant contre l'effet oxydant du fer ce qui prouve et confirme les résultats démontrés dans la partie chimique.

Les résultats obtenus *in vitro* sur les fibroblastes embryonnaires humains MRC5 ont montré que l'huile d'argane et l'huile d'olive ont un bon pouvoir à réduire le taux des dommages d'ADN. Par ailleurs, seulement l'HA a un potentiel à piéger les peroxydes d'hydrogènes chez les fibroblastes cultivés sous les conditions d'hyperoxie ce qui confère à l'HA la propriété d'un antioxydant.

Collectivement, nos données ont révélé les effets protecteurs de l'huile d'argane et l'huile d'olive contre le stress oxydatif induit par le fer *in vivo* (foie, reins et cerveau) et *in vitro* (*Tetrahymena pyriformis*) prouvant les résultats démontrés chimiquement. Nos résultats ont montré *in vivo* (Souris) et *in vitro* (MRC5) que les deux huiles ont un effet bénéfique contre les dommages d'ADN. En effet, les deux huiles ont révélé un grand pouvoir anti-sénescence. Par ailleurs, les deux huiles ont montré un potentiel anti-inflammatoire au niveau hépatique. Les données des dommages d'ADN et de la sénescence cellulaire font l'originalité de notre travail

ce qui a eu pour résultat, de faire passer le statut de cette huile d'un produit alimentaire diététique à celui d'un produit très prisé pour ces qualités préventives. L'huile d'argane pourrait être utilisée comme thérapie alternative aux composés synthétiques qui peuvent avoir des effets secondaires.

PERSPECTIVES

Compte tenu des résultats obtenus, plusieurs perspectives de travail peuvent être envisagées, à savoir :

L'étude physico-chimique :

Etude de l'effet biologique des molécules identifiées de l'huile d'argane.

En plus de l'huile d'argane, utilisation et évaluation des autres parties de l'arganier.

L'évaluation des effets protecteurs de l'huile d'argane *in vivo* sur les souris :

Evaluation de l'effet du fer à court et à long terme sur des souris. Avec l'âge le stress oxydatif augmente, un traitement par le fer dans des conditions de stress peut donner un meilleur modèle pour étudier les maladies où le fer et/ou le stress oxydant joue un rôle clé.

Choix et validation de la concentration et de la durée optimale de traitement par le fer, dans le but de déterminer la durée optimale qui permet de provoquer un dérèglement des paramètres biochimiques et des lésions au niveau des organes de foie, cœur, rein et cerveau.

Etude de l'effet du fer et de l'huile d'argane sur l'expression génique des marqueurs de stress oxydatif autre que la mn SOD à citer : la catalase et la glutathion peroxydase.

Evaluation du stress oxydant sur d'autres organes de la souris à citer le cœur.

Traitement à long terme des souris par l'huile d'argane et évaluation de son effet par l'étude des marqueurs de vieillissement à citer : p16 et p21.

L'évaluation des effets protecteurs de l'huile d'argane *in vitro* :

Evaluation de l'effet de l'huile d'argane sur les cellules humaine neuronales où le fer participe à l'apparition maladies chroniques à savoir la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson.

Mesure de l'activité enzymatique et le taux des marqueurs de stress oxydatif chez les fibroblastes MRC5.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-
- Abalea, V., Cillard, J., Dubos, M.-P., Anger, J.-P., Cillard, P., & Morel, I. (1998). Iron-induced oxidative DNA damage and its repair in primary rat hepatocyte culture. *Carcinogenesis*, *19*(6), 1053–1059.
- Abati, E., Bresolin, N., Comi, G., & Corti, S. (2020). Silence superoxide dismutase 1 (SOD1): A promising therapeutic target for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *24*(4), 295–310.
- Abbassi, A. E., Khalid, N., Zbakh, H., & Ahmad, A. (2014). Physicochemical Characteristics, Nutritional Properties, and Health Benefits of Argan Oil: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(11), 1401–1414.
- Abboud, S., & Haile, D. J. (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(26), 19906–19912.
- Adlouni, A. (2010). L’huile d’argan, de la nutrition à la santé. *Phytothérapie*, *8*(2), 89–97.
- Ahmad, G., Almasry, M., Dhillon, A., Abuayyash, M., Kothandaraman, N., & Cakar, Z. (2017). Overview and Sources of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Reproductive System. In *Oxidative Stress in Human Reproduction: Shedding Light on a Complicated Phenomenon*, 1–16.
- Ahmad, R., Ahmad, N., & Naqvi, A. A. (2017). “ Ziziphus oxyphylla”: Ethnobotanical, ethnopharmacological and phytochemical review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *91*, 970–998.
- Ahmed, S., Passos, J. F., Birket, M. J., Beckmann, T., Brings, S., Peters, H., ... Saretzki, G. (2008). Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *Journal of Cell Science*, *121*(7), 1046–1053.
- Ahsan, H., Ahad, A., Iqbal, J., & Siddiqui, W. A. (2014). Pharmacological potential of tocotrienols: A review. *Nutrition & Metabolism*, *11*(1), 52.

-
- Ahsan, H., Ahad, A., & Siddiqui, W. A. (2015). A review of characterization of tocotrienols from plant oils and foods. *Journal of Chemical Biology*, 8(2), 45–59.
- Ainane, T., Gharby, S., Talbi, M., Abourriche, A., Bennamara, A., Oukkache, N., ... Elkouali, M. (2016). *Moroccan Formulation of Oils for the Care of Hair: Chemical Composition and Antibacterial Activity*, 2(2), 8.
- Al-Basher, G. I. (2019). Green tea activity and iron overload induced molecular fibrogenesis of rat liver. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(3), 531–540.
- Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. *Journal of Food Biochemistry*, 44(3). 1-13.
- Allai, L., Druart, X., Contell, J., Louanjli, N., Moula, A. B., Badi, A., ... El Amiri, B. (2015). Effect of argan oil on liquid storage of ram semen in Tris or skim milk based extenders. *Animal Reproduction Science*, 160, 57–67.
- Allameh, A., Amini-Harandi, A., Osati-Ashtiani, F., & O'Brien, P. (2010). Iron overload induced apoptotic cell death in isolated rat hepatocytes mediated by reactive oxygen species. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7(2), 115–121.
- Anderson, E. R., & Shah, Y. M. (2013). Iron homeostasis in the liver. *Comprehensive Physiology*, 3(1), 315-330.
- Andrews, N. C. (1999). Disorders of iron metabolism. *New England Journal of Medicine*, 341(26), 1986–1995.
- Antoine, D. (2016). Quand le cerveau s'enflamme: Le rôle des enzymes NOX dans certaines maladies du cerveau. *Atout cerveau*, 110, 35-44
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183–198.

-
- Arosio, P., Elia, L., & Poli, M. (2017). Ferritin, cellular iron storage and regulation. *IUBMB Life*, *69*(6), 414–422.
- Ashrafizadeh, M., Ahmadi, Z., Samarghandian, S., Mohammadinejad, R., Yaribeygi, H., Sathyapalan, T., & Sahebkar, A. (2020). MicroRNA-mediated regulation of Nrf2 signaling pathway: Implications in disease therapy and protection against oxidative stress. *Life Sciences*, *244*, 117329.
- Aslani, B. A., & Ghobadi, S. (2016). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sciences*, *146*, 163–173.
- Awika, J. M., Rooney, L. W., Wu, X., Prior, R. L., & Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(23), 6657–6662.
- Badreddine, A., Zarrouk, A., Karym, E. M., Debbabi, M., Nury, T., Meddeb, W., Nury, T., Rezig, L., Debbabi, M., Nury, T., Meddeb, W., Sghaier, R., Bezine, M., Vejux, A., Martine, L., Grégoire, S., Bretillon, L., Prost-Camus, E., Durand, P., Prost, M., M., Moreau, T., Cherkaoui-Malki, M., Nasser, B., & Lizard, G. (2017). Argan Oil-Mediated Attenuation of Organelle Dysfunction, Oxidative Stress and Cell Death Induced by 7-Ketocholesterol in Murine Oligodendrocytes 158N. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(10), 2220.
- Badreddine, A., Zarrouk, A., Meddeb, W., Nury, T., Rezig, L., Debbabi, M., Bessam, F., Brahmi, F., Vejux, A., Mejri, M., Nasser, B., & Lizard, G. (2020). Antioxidant and neuroprotective properties of Mediterranean oils: Argan oil, olive oil, and milk thistle seed oil. In *Oxidative Stress and Dietary Antioxidants in Neurological Diseases*, 143–154.

- Bailey, J. K., Schweitzer, J. A., Rehill, B. J., Lindroth, R. L., Martinsen, G. D., & Whitham, T. G. (2004). Beavers as molecular geneticists: A genetic basis to the foraging of an ecosystem engineer. *Ecology*, 85(3), 603–608.
- Barkaoui, M., Katiri, A., Boubaker, H., & Msanda, F. (2017). Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes in Chtouka Ait Baha and Tiznit (Western Anti-Atlas), Morocco. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 338–350.
- Barrera, G., Pizzimenti, S., Daga, M., Dianzani, C., Arcaro, A., Cetrangolo, G. P., Giordano, G., Cucci, M., Graf, M., & Gentile, F. (2018). Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes, 4-Hydroxynonenal and Malondialdehyde in Aging-Related Disorders. *Antioxidants*, 7(8), 102-118.
- Beaumont, C., & Karim, Z. (2013). Actualité du métabolisme du fer. *La Revue de Médecine Interne*, 34(1), 17–25.
- Beguin, Y. (2002). Le métabolisme du fer. *Hématologie*, 8, S7–S11.
- Bellahcen, S., Hakkou, Z., Ziyat, A., Legssyer, A., Mekhfi, H., Aziz, M., & Bnouham, M. (2013). Antidiabetic and antihypertensive effect of Virgin Argan Oil in model of neonatal streptozotocin-induced diabetic and l-nitroarginine methylester (l-NAME) hypertensive rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 10(1), 1-8.
- Bellahcen, S., Mekhfi, H., Ziyat, A., Legssyer, A., Hakkou, A., Aziz, M., & Bnouham, M. (2012). Prevention of chemically induced diabetes mellitus in experimental animals by virgin argan oil. *Phytotherapy Research*, 26(2), 180–185.
- Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., & Donato, R. (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1865(5), 721–733.
- Ben Mansour, R., Ben Slema, H., Falleh, H., Tounsi, M., Kechebar, M. S. A., Ksouri, R., & Megdiche-Ksouri, W. (2018). Phytochemical characteristics, antioxidant, and health

- properties of roasted and unroasted Algerian argan (*Argania spinosa*) oil. *Journal of Food Biochemistry*, 42(6), e12562.
- Bennani, H., Drissi, A., Giton, F., Kheuang, L., Fiet, J., & Adlouni, A. (2007). Antiproliferative effect of polyphenols and sterols of virgin argan oil on human prostate cancer cell lines. *Cancer Detection and Prevention*, 31(1), 64–69.
- Bennani, Houda, Fiet, J., & Adlouni, A. (2009). Impact de l'huile d'argan sur le cancer de la prostate: Étude de l'effet antiprolifératif des polyphénols. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2009(416), 23–26.
- Bennett, B. D., & Gralnick, J. A. (2019). Mechanisms of toxicity by and resistance to ferrous iron in anaerobic systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 167–171.
- Berkelhamer, S. K., Kim, G. A., Radder, J. E., Wedgwood, S., Czech, L., Steinhorn, R. H., & Schumacker, P. T. (2013). Developmental differences in hyperoxia-induced oxidative stress and cellular responses in the murine lung. *Free Radical Biology and Medicine*, 61, 51–60.
- Berrougui, H., Ettaib, A., Gonzalez, M. H., De Sotomayor, M. A., Bennani-Kabchi, N., & Hmamouchi, M. (2003). Hypolipidemic and hypocholesterolemic effect of argan oil (*Argania spinosa* L.) in *Meriones shawi* rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(1), 15–18.
- Berrougui, Hicham, de Sotomayor, M. A., Pérez-Guerrero, C., Ettaib, A., Hmamouchi, M., Marhuenda, E., & Herrera, M. D. (2004). Argan (*Argania spinosa*) oil lowers blood pressure and improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Nutrition*, 92(6), 921–929.
- Beyer Jr, W. F., & Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: Some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, 161(2), 559–566.

-
- Bhakkiyalakshmi, E., Sireesh, D., & Ramkumar, K. M. (2018). Redox Sensitive Transcription via Nrf2-Keap1 in Suppression of Inflammation. In *Immunity and Inflammation in Health and Disease*, 149–161.
- Bhat, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A., & Ganie, S. A. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, 101–110.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19.
- Bischof, O., Dejean, A., & Pineau, P. (2009). Une re-vue de la sénescence cellulaire—Ami ou ennemi de la promotion tumorale ? *médecine/sciences*, 25(2), 153–160.
- Bloomer, S. A., & Brown, K. E. (2019). Iron-Induced Liver Injury: A Critical Reappraisal. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2132.
- Bnouham, M., Bellahcen, S., Benalla, W., Legssyer, A., Ziyat, A., & Mekhfi, H. (2008). Antidiabetic activity assessment of *Argania spinosa* oil. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 5(1). 1-12.
- Bonkowsky, H. L., Healey, J. F., Sinclair, P. R., Sinclair, J. F., & Pomeroy, J. S. (1981). Iron and the liver acute and long-term effects of iron-loading on hepatic haem metabolism. *Biochemical Journal*, 196(1), 57–64.
- Borch-Iohnsen, B., Hagve, T.-A., Hauge, A., & Thorstensen, K. (2009). Regulation of the iron metabolism. *Tidsskrift for Den Norske Laegeforening: Tidsskrift for Praktisk Medicin, Ny Raekke*, 129(9), 858–862.
- Borges, T. H., Pereira, J. A., Cabrera-Vique, C., & Seiquer, I. (2017). Study of the antioxidant potential of Arbequina extra virgin olive oils from Brazil and Spain applying combined models of simulated digestion and cell culture markers. *Journal of Functional Foods*, 37, 209–218.

-
- Borgna-Pignatti, C., Rugolotto, S., De Stefano, P., Zhao, H., Cappellini, M. D., Del Vecchio, G. C., ... Ghilardi, R. (2004). Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica*, 89(10), 1187–1193.
- Borrelli, A., Schiattarella, A., Bonelli, P., Tuccillo, F. M., Buonaguro, F. M., & Mancini, A. (2014). The functional role of MnSOD as a biomarker of human diseases and therapeutic potential of a new isoform of a human recombinant MnSOD. *BioMed Research International*, 2014, 1-11.
- Boshuizen, M., van der Ploeg, K., von Bonsdorff, L., Biemond, B. J., Zeerleder, S. S., van Bruggen, R., & Juffermans, N. P. (2017). Therapeutic use of transferrin to modulate anemia and conditions of iron toxicity. *Blood Reviews*, 31(6), 400–405.
- Bouarroudj, K., Tamendjari, A., & Larbat, R. (2016). Quality, composition and antioxidant activity of Algerian wild olive (*Olea europaea* L. subsp. *Oleaster*) oil. *Industrial Crops and Products*, 83, 484–491.
- Bouyahya, A., El Omari, N., Elmenyiy, N., Guaouguaou, F.-E., Balahbib, A., Belmehdi, O., ... Bakri, Y. (2021). Moroccan antidiabetic medicinal plants: Ethnobotanical studies, phytochemical bioactive compounds, preclinical investigations, toxicological validations and clinical evidences; challenges, guidance and perspectives for future management of diabetes worldwide. *Trends in Food Science & Technology*, 115, 147–254.
- Bresciani, G., da Cruz, I. B. M., & González-Gallego, J. (2015). Manganese Superoxide Dismutase and Oxidative Stress Modulation. In *Advances in Clinical Chemistry*, 68, 87–130.
- Brown, K. E., Mathahs, M. M., Broadhurst, K. A., Coleman, M. C., Ridnour, L. A., Schmidt, W. N., & Spitz, D. R. (2007). Increased hepatic telomerase activity in a rat model of

- iron overload: A role for altered thiol redox state? *Free Radical Biology and Medicine*, 42(2), 228–235.
- Buendia, I., Michalska, P., Navarro, E., Gameiro, I., Egea, J., & León, R. (2016). Nrf2–ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 157, 84–104.
- Büyükaşık, N. Ş., & Büyükaşık, Y. (2016). Chronic liver diseases and iron: A concise review with emphasis on hypotransferrinemia and hypohepcidinemia. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 46(5), 1281–1291.
- Cadet, E., Gadenne, M., Capron, D., & Rochette, J. (2005). Données récentes sur le métabolisme du fer: Un état de transition. *La Revue de Medecine Interne*, 26(4), 315–324.
- Cadi, R., Mounaji, K., Amraoui, F., & Soukri, A. (2013). Protective and antioxidant potential of the argan oil on induced oxidative stress in *Tetrahymena pyriformis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(27), 1961–1968.
- Cakaloglu, B., Ozyurt, V. H., & Otles, S. (2018). Cold press in oil extraction. A review. *Ukrainian Food Journal*, 7(4), 640–654.
- Campo, G. M., D'ascola, A., Avenoso, A., Campo, S., Ferlazzo, A. M., Micali, C., ... Calatroni, A. (2003). Glycosaminoglycans reduce oxidative damage induced by copper (Cu⁺²), iron (Fe⁺²) and hydrogen peroxide (H₂O₂) in human fibroblast cultures. *Glycoconjugate Journal*, 20(2), 133–141.
- Canhada, S., Castro, K., Perry, I. S., & Luft, V. C. (2018). Omega-3 fatty acids' supplementation in Alzheimer's disease: A systematic review. *Nutritional Neuroscience*, 21(8), 529–538.

- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M., Redon, C., Pilch, D., Olaru, A., Eckhaus, M., Daniel, C., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W., Nussenzweig, M., Nussenzweig, N., Nussenzweig, A., Difilippantonio, M. J. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, 296(5569), 922–927.
- Chakhchar, A., Lamaoui, M., Aissam, S., Ferradous, A., Wahbi, S., El Mousadik, A., ... El Modafar, C. (2018). Physiological and Biochemical Mechanisms of Drought Stress Tolerance in the Argan Tree. In *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*, 446, 311–322.
- Charrouf, Z. (2002). L'huile d'argane, une prodigieuse vitalité née au bord du désert.... *Espérance Médicale*, 9(87), 521–524.
- Charrouf, Z., & Guillaume, D. (2008). Argan oil: Occurrence, composition and impact on human health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(7), 632–636.
- Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y., & Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: An exit from cell cycle control. *Nature Reviews Cancer*, 9(11), 785–797.
- Cherki, M., Berrougui, H., Drissi, A., Adlouni, A., & Khalil, A. (2006). Argan oil: Which benefits on cardiovascular diseases? *Pharmacological Research*, 54(1), 1–5.
- Cilla, A., Alegria, A., Attanzio, A., Garcia-Llatas, G., Tesoriere, L., & Livrea, M. A. (2017). Dietary phytochemicals in the protection against oxysterol-induced damage. *Chemistry and Physics of Lipids*, 207, 192–205.
- Cobbs, C. S., Levi, D. S., Aldape, K., & Israel, M. A. (1996). Manganese superoxide dismutase expression in human central nervous system tumors. *Cancer Research*, 56(14), 3192–3195.

-
- Combe, N., & Rossignol-Castera, A. (2010). Vegetables oils and frying. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 45(6), S44–S51.
- Cornelissen, A., Guo, L., Sakamoto, A., Virmani, R., & Finn, A. V. (2019). New insights into the role of iron in inflammation and atherosclerosis. *EBioMedicine*, 47, 598–606.
- Crichton, R. . (2016). The Essential Role of Iron in Biology. In *Iron Metabolism*, 22–70.
- Darcy, P., Kelly, J. P., Leonard, B. E., & Henry, J. A. (2002). The effect of lofepramine and other related agents on the motility of *Tetrahymena pyriformis*. *Toxicology Letters*, 128(1–3), 207–214.
- Das, S. K., DesAulniers, J., Dyck, J. R., Kassiri, Z., & Oudit, G. Y. (2016). Resveratrol mediates therapeutic hepatic effects in acquired and genetic murine models of iron-overload. *Liver International*, 36(2), 246–257.
- De Magalhães, J. P., & Passos, J. F. (2018). Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 170, 2–9.
- Del Carlo, M., Sacchetti, G., Di Mattia, C., Compagnone, D., Mastrocola, D., Liberatore, L., & Cichelli, A. (2004). Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13), 4072–4079.
- Derouiche, A., Jafri, A., Driouch, I., Khasmi, M. E., Adlouni, A., Benajiba, N., ... Benouhoud, M. (2013). Effect of Argan and Olive Oil Consumption on the Hormonal Profile of Androgens Among Healthy Adult Moroccan Men. *Natural Product Communications*, 8(1), 51-53.
- Desvergne, B., & Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: Nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews*, 20(5), 649–688.
- Dev, S., & Babitt, J. L. (2017). Overview of iron metabolism in health and disease: Iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis International*, 21, S6–S20.

-
- Di Maggio, R., & Maggio, A. (2017). The new era of chelation treatments: Effectiveness and safety of 10 different regimens for controlling iron overloading in thalassaemia major. *British Journal of Haematology*, *178*(5), 676–688.
- Di Meo, F., Valentino, A., Petillo, O., Peluso, G., Filosa, S., & Crispi, S. (2020). Bioactive polyphenols and neuromodulation: Molecular mechanisms in neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), 2564.
- Dixon, S. J., & Stockwell, B. R. (2014). The role of iron and reactive oxygen species in cell death. *Nature Chemical Biology*, *10*(1), 9–17.
- Dizdaroglu, M., & Jaruga, P. (2012). Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, *46*(4), 382–419.
- Dobashi, K., Ghosh, B., Orak, J. K., Singh, I., & Singh, A. K. (2000). Kidney ischemia-reperfusion: Modulation of antioxidant defenses. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *205*(1), 1–11.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, *62*(6), 649–671.
- Drissi, A., Girona, J., Cherki, M., Godàs, G., Derouiche, A., El Messal, M., ... others. (2004). Evidence of hypolipemiant and antioxidant properties of argan oil derived from the argan tree (*Argania spinosa*). *Clinical Nutrition*, *23*(5), 1159–1166.
- Duan, X., Wen, Z., Shen, H., Shen, M., & Chen, G. (2016). Intracerebral Hemorrhage, Oxidative Stress, and Antioxidant Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 1–17.
- El Kamouni, S., El Kebbaj, R., Andreoletti, P., El Ktaibi, A., Rharrassi, I., Essamadi, A., El Kebbaj, M., Mandard, S., Latruffe, N., Vamecq, J., Nasser, B., & Cherkaoui-Malki, M. (2017). Protective effect of argan and olive oils against LPS-induced oxidative stress

- and inflammation in mice livers. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2181.
- El Kebbaj, R. (2012). *Base moléculaire des effets de l'huile d'Argan sur le métabolisme mitochondrial et peroxysomal des acides gras et sur l'inflammation* (PhD Thesis). Université Hassan I, FST Settat et Université de Bourgogne.
- El Kebbaj, R., Andreoletti, P., El Hajj, H. I., El Kharrassi, Y., Vamecq, J., Mandard, S., Saih, F., Latruffe, N., El Kebbaj, M., Lizard, G., Nasser, B., & Cherkaoui-Malki, M. (2015). Argan oil prevents down-regulation induced by endotoxin on liver fatty acid oxidation and gluconeogenesis and on peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , (PGC-1 α), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) and estrogen related receptor α (ERR α). *Biochimie Open*, 1, 51–59.
- El Kebbaj, R., El Kamouni, S., El Hajj, H. I., Andreoletti, P., Gresti, J., Latruffe, N., El Kebbaj, M., Vamecq, J., Lizard, G., Nasser, B., & Cherkaoui-Malki, M. (2013). Modulation of peroxisomes abundance by argan oil and lipopolysaccharides in acyl-CoA oxidase 1-deficient fibroblasts. *Health*, 5(01), 62.
- El Kharrassi, Y., Maata, N., Mazri, M. A., El Kamouni, S., Talbi, M., El Kebbaj, R., Moustaid, K., Essamadi, A., Andreoletti, P., El Mzouri, E., Cherkaoui-Malki, M., & Nasser, B. (2018). Chemical and phytochemical characterizations of argan oil (*Argania spinosa* L. skeels), olive oil (*Olea europaea* L. cv. Moroccan picholine), cactus pear (*Opuntia megacantha* salm-dyck) seed oil and cactus cladode essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(2), 747–754.
- El Kharrassi, Y., Samadi, M., Lopez, T., Nury, T., El Kebbaj, R., Andreoletti, P., El Hajj, H., Vamecq, J., Moustaid, K., Latruffe, N., El Kebbaj, M., Masson, D., Lizard, G., Nasser, B., & Cherkaoui-Malki, M. (2014). Biological activities of Schottenol and Spinasterol, two natural phytosterols present in argan oil and in cactus pear seed oil, on murine

- miroglial BV2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(3), 798–804.
- El Monfalouti, H., Charrouf, Z., Belviso, S., Ghirardello, D., Scursatone, B., Guillaume, D., Denhez, C., & Zeppa, G. (2012). Analysis and antioxidant capacity of the phenolic compounds from argan fruit (*Argania spinosa* (L.) Skeels). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(4), 446–452.
- Elbir, M., Es-Safi, N. E., Amhoud, A., & Mbarki, M. (2015). Characterization of phenolic compounds in olive stones of three moroccan varieties. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 17(3), 479–492.
- Ellman, G. L. (1959). Archs: Tissue sulfhydryl groups. *Biochem Biophys*, 82, 70–77.
- ELMostafi, H., Bahbiti, Y., Elhessni, A., Bousalham, R., Doumar, H., Ouichou, A., Benmhammed, H., Touil, T., & Mesfioui, A. (2020). Neuroprotective potential of Argan oil in neuropsychiatric disorders in rats: A review. *Journal of Functional Foods*, 75, 104233.
- Er, R., Aydın, B., Şekeroğlu, V., & Atlı Şekeroğlu, Z. (2020). Protective effect of Argan oil on mitochondrial function and oxidative stress against acrylamide-induced liver and kidney injury in rats. *Biomarkers*, 25(6), 458–467.
- Fargion, S., Valenti, L., & Fracanzani, A. L. (2011). Beyond hereditary hemochromatosis: New insights into the relationship between iron overload and chronic liver diseases. *Digestive and Liver Disease*, 43(2), 89–95.
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant. *L'actualité Chimique*, 108(10), 863–832.
- Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043–1048.

- Furumoto, H., Nanthirudjanar, T., Kume, T., Izumi, Y., Park, S.-B., Kitamura, N., Kishino, S., Ogawa, J., Hirata, T., & Sugawara, T. (2016). 10-Oxo-trans-11-octadecenoic acid generated from linoleic acid by a gut lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* is cytoprotective against oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 296, 1–9.
- Gaasch, J. A., Lockman, P. R., Geldenhuys, W. J., Allen, D. D., & Van der Schyf, C. J. (2007). Brain Iron Toxicity: Differential Responses of Astrocytes, Neurons, and Endothelial Cells. *Neurochemical Research*, 32(7), 1196–1208.
- Galanello, R., Piga, A., Forni, G. L., Bertrand, Y., Foschini, M. L., Bordone, E., Leoni, G., Lavagetto, A., Zappu, A., & Longo, F. (2006). Phase II clinical evaluation of deferasirox, a once-daily oral chelating agent, in pediatric patients with beta-thalassemia major. *Haematologica*, 91(10), 1343–1351.
- Galaris, D., Barbouti, A., & Pantopoulos, K. (2019). Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(12), 118535.
- Gandhi, S., & Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 428010.
- Ganz, T., & Nemeth, E. (2009). Iron sequestration and anemia of inflammation. *Seminars in Hematology*, 46(4), 387–393.
- Ganz, T., & Nemeth, E. (2012). Hepcidin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(9), 1434–1443.
- Garcia, P. M. C. (2008). Antioxidantes en la dietamediterranea. *Nutrición Clínica En Medicina*, 2(3), 129–140.
- Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., Abedinzadeh, Z., & Jore, D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène. *L'actualité Chimique*, 91-96.

- Gathwala, G., & Aggarwal, R. (2016). Selenium supplementation for the preterm Indian neonate. *Indian Journal of Public Health*, 60(2), 142.
- Glorieux, C., & Calderon, P. B. (2017). Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry*, 398(10), 1095–1108.
- Goik, U., Goik, T., & Załęska, I. (2019). The Properties and Application of Argan Oil in Cosmetology. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(4), 1800313.
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2–3), 45–80.
- Guan, S., Ma, J., Zhang, Y., Gao, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Wang, N., Xie, Y., Wang, J., Zhang, J., & Chu, L. (2013). Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) Injection Suppresses Kidney Injury Induced by Iron Overload in Mice. *PLoS ONE*, 8(9), e74318.
- Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P. M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., & Uchida, K. (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radical Research*, 44(10), 1098–1124.
- Guillaume, D., Pioch, D., & Charrouf, Z. (2019). Argan [*Argania spinosa* (L.) Skeels] Oil. In M. F. Ramadan (Ed.), *Fruit Oils: Chemistry and Functionality*, 317–352.
- Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Archives of Toxicology*, 86(3), 345–391.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Küfrevioğlu, Ö. İ., & Aslan, A. (2002). Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(3), 325–329.

-
- Hadzhieva, M., Kirches, E., & Mawrin, C. (2014). Review: Iron metabolism and the role of iron in neurodegenerative disorders: Iron in neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *40*(3), 240–257.
- Haimeur, A., Meskini, N., Mimouni, V., Ulmann, L., Messaouri, H., Pineau-Vincent, F., Abouakil, N., & Tremblin, G. (2019). A comparative study on the effect of argan oil versus fish oil on risk factors for cardio-vascular disease in high-fat-fed rats. *Nutrition*, *57*, 32–39.
- Haimeur, A., Messaouri, H., Ulmann, L., Mimouni, V., Masrar, A., Chraïbi, A., Tremblin, G., & Meskini, N. (2013). Argan oil prevents prothrombotic complications by lowering lipid levels and platelet aggregation, enhancing oxidative status in dyslipidemic patients from the area of Rabat (Morocco). *Lipids in Health and Disease*, *12*(1), 107.
- Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., & Chapelle, J.-P. (2007). Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, *62*(10), 628–638.
- Halliwell, B. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology*, *141*(2), 312-322.
- Haloui, R. B., Zekhnini, A., & Hatimi, A. (2015). Effects of extraction methods on chemical composition and oxidative stability of Argan oil. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, *7*(6):518-524.
- Hamäi, A., & Mehrpour, M. (2017). Homéostasie du fer et autophagie. *Médecine/Sciences*, *33*(3), 260–267.
- Haouhay, N. E., Samaniego-Sánchez, C., Asehraou, A., Villalón-Mir, M., & Serrana, H. L.-G. de la. (2015). Microbiological characterization of Picholine variety olives and analysis of olive oil produced in traditional oil mills in Morocco. *CyTA - Journal of Food*, *13*(1), 107–115.

-
- Harhar, H., Gharby, S., Guillaume, D., & Charrouf, Z. (2010). Effect of argan kernel storage conditions on argan oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(8), 915–920.
- Hartwig, A., & Schlegel, R. (1995). Induction of oxidative DNA damage by ferric iron in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 16(12), 3009–3013.
- He, H., Qiao, Y., Zhang, Z., Wu, Z., Liu, D., Liao, Z., Yin, D., & He, M. (2018). Dual action of vitamin C in iron supplement therapeutics for iron deficiency anemia: Prevention of liver damage induced by iron overload. *Food & Function*, 9(10), 5390–5401.
- Heo, S., Kim, S., & Kang, D. (2020). The Role of Hydrogen Peroxide and Peroxiredoxins throughout the Cell Cycle. *Antioxidants*, 9(4), 280.
- Hermes-Lima, M., Nagy, E., Ponka, P., & Schulman, H. M. (1998). The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) protects plasmid pUC-18 DNA against OH-mediated strand breaks. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(8), 875–880.
- Hézar, N., Simon, G., Droullé, A., & Nguyen, P. (2007). La cytométrie en flux dans un laboratoire d'hémostase. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2007(393), 63–71.
- Horncastle, E., & Lumb, A. B. (2019). Hyperoxia in anaesthesia and intensive care. *Bja Education*, 19(6), 176–182.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293.
- Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., & Yong, W. H. (2019). An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. In W. H. Yong (Ed.), *Biobanking*, 1897, 299–311.

-
- Isabel Minguez-Mosquera, M., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., SanchezGomez, A. H., & Garrido-Fernandez, J. (1991). Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(5), 332–336.
- Ishaq, A., Schröder, J., Edwards, N., von Zglinicki, T., & Saretzki, G. (2018). Dietary Restriction Ameliorates Age-Related Increase in DNA Damage, Senescence and Inflammation in Mouse Adipose Tissue. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 22(4), 555–561.
- Ishaq, Abbas, Dufour, D., Cameron, K., von Zglinicki, T., & Saretzki, G. (2018). Metabolic memory of dietary restriction ameliorates DNA damage and adipocyte size in mouse visceral adipose tissue. *Experimental Gerontology*, 113, 228–236.
- Issaoui, M., & Delgado, A. M. (2019). Olive oil properties from technological aspects to dietary and health claims. In *Fruit Oils: Chemistry and Functionality*, 85–129.
- Jaeschke, H. (2000). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 15(7), 718–724.
- Jain, S., Ahmed, R. S., Arora, V. K., & Banerjee, B. D. (2011). Biochemical and histopathological studies to assess chronic toxicity of triazophos in blood, liver and brain tissue of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(2), 182–186.
- Jeon, G.-C., Park, M.-S., Yoon, D.-Y., Shin, C.-H., Sin, H.-S., & Um, S.-J. (2005). Antitumor activity of spinasterol isolated from Pueraria roots. *Experimental & Molecular Medicine*, 37(2), 111.
- Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: Metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radical Biology and Medicine*, 72, 76–90.
- Khalid, M., Hassani, S., & Abdollahi, M. (2020). Metal-induced oxidative stress : An evidence-

- based update of advantages and disadvantages. *Current Opinion in Toxicology*, 20-21, 55-68.
- Khallouki, F., Younos, C., Soulimani, R., Oster, T., Charrouf, Z., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., & Owen, R. W. (2003). Consumption of argan oil (Morocco) with its unique profile of fatty acids, tocopherols, squalene, sterols and phenolic compounds should confer valuable cancer chemopreventive effects. *European Journal of Cancer Prevention*, 12(1), 67–75.
- Khallouki, F., Eddouks, M., Mourad, A., Breuer, A., & Owen, R. (2017). Ethnobotanic, Ethnopharmacologic Aspects and New Phytochemical Insights into Moroccan Argan Fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), 2277.
- Kinter, M., Spitz, D. R., & Robert, R. J. (1996). Oleic Acid Incorporation Protects Cultured Hamster Fibroblasts from Oxygen-Induced Cytotoxicity. *The Journal of Nutrition*, 126(12), 2952–2959.
- Kiritsakis, A., Kanavouras, A., & Kiritsakis, K. (2002). Chemical analysis, quality control and packaging issues of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9–10), 628–638.
- Kloprogge, J. T., Ponce, C. P., & Loomis, T. A. (2020). *The Periodic Table: Nature's Building Blocks—1st Edition*. 1-915.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20(4), 165–177.
- Köksal, E., Gülçin, I., Beyza, S., Sarikaya, O., & Bursal, E. (2009). In vitro antioxidant activity of silymarin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(2), 395–405.
- Kono, K., Kamijo, Y., Hora, K., Takahashi, K., Higuchi, M., Kiyosawa, K., Shigematsu, H., Gonzalez, & Aoyama, T. (2009). PPAR{alpha} attenuates the proinflammatory

- response in activated mesangial cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 296(2), F328-336.
- Kono, S. (2013). Aceruloplasminemia. *In International Review of Neurobiology*. 110,125–151.
- Kontoghiorghes, G. (1982). *The design of orally active iron chelators for the treatment of thalassaemia*. (PhD Thesis). University of Essex.
- Koprivnjak, O., Škevin, D., Valić, S., Majetić, V., Petričević, S., & Ljubenković, I. (2008). The antioxidant capacity and oxidative stability of virgin olive oil enriched with phospholipids. *Food Chemistry*, 111(1), 121–126.
- Kowaltowski, A. J., de Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., & Vercesi, A. E. (2009). Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), 333–343.
- Laincer, F., Iaccarino, N., Amato, J., Pagano, B., Pagano, A., Tenore, G., Tamendjari, A., Rovellini, P., Venturini, S., Bellan, G., Ritieni, A., Mannina, L., Novellino, E., & Randazzo, A. (2016). Characterization of monovarietal extra virgin olive oils from the province of Béjaïa (Algeria). *Food Research International*, 89, 1123–1133.
- Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., & Hofer, M. (2009). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: Therapeutic approaches. *Journal of Translational Medicine*, 7(1), 97.
- Lee, Jae-Hyeok, & Lee, M.-S. (2019). Brain Iron Accumulation in Atypical Parkinsonian Syndromes: In vivo MRI Evidences for Distinctive Patterns. *Frontiers in Neurology*, 10, 74.
- Lee, Ji-Hoon, & Paull, T. T. (2020). Mitochondria at the crossroads of ATM-mediated stress signaling and regulation of reactive oxygen species. *Redox Biology*, 32, 101511.
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7292–7295.

- Leoni, V., Nury, T., Vejux, A., Zarrouk, A., Caccia, C., Debbabi, M., Fromont, A., Sghaier, R., Moreau, T., & Lizard, G. (2017). Mitochondrial dysfunctions in 7-ketocholesterol-treated 158N oligodendrocytes without or with α -tocopherol: Impacts on the cellular profil of tricarboxylic cycle-associated organic acids, long chain saturated and unsaturated fatty acids, oxysterols, cholesterol and cholesterol precursors. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *169*, 96–110.
- Lepetsos, P., Papavassiliou, K. A., & Papavassiliou, A. G. (2019). Redox and NF- κ B signaling in osteoarthritis. *Free Radical Biology and Medicine*, *132*, 90–100.
- Li, P., Stetler, R. A., Leak, R. K., Shi, Y., Li, Y., Yu, W., Bennett, M., & Chen, J. (2018). Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology*, *134*, 208–217.
- Lin, T.-K., Zhong, L., & Santiago, J. L. (2017). Anti-Inflammatory and Skin Barrier Repair Effects of Topical Application of Some Plant Oils. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), E70.
- Liu, R., Buettner, G. R., & Oberley, L. W. (2000). Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF- α . *Free Radical Biology and Medicine*, *28*(8), 1197–1205.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, *4*(8), 118.
- López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., Ros, E., De Caterina, R., Badimón, L., Covas, M. I., Escrich, E., Ordovás, J. M., Soriguer, F., Abiá, R., de la Lastra, C. A., Battino, M., Corella, D., Chamorro-Quirós, J., Delgado-Lista, J., Giugliano, D., Esposito, K., Estruch, R., Fernandez-Real, J. M., Gaforio, J. J., La Vecchia, C., Lairon, D., López-Segura, F., Mata, P., Menéndez, J. A., Muriana, F. J., Osada, J., Panagiotakos, D. B., Paniagua, J. A., Pérez-Martinez, P., Perona, J., Peinado, M. A., Pineda-Priego, M.,

- Poulsen, H. E., Quiles, J. L., Ramírez-Tortosa, M. C., Ruano, J., Serra-Majem, L., Solá, R., Solanas, M., Solfrizzi, V., de la Torre-Fornell, R., Trichopoulou, A., Uceda, M., Villalba-Montoro, J. M., Villar-Ortiz, J. R., Visioli, F., & Yiannakouris, N. (2010). Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 20(4), 284–294.
- Loréal, O., Pigeon, C., Zanninelli, G., TurliN, B., Lescoat, G., Deugnier, Y., & Brissot, P. (2008). *Données actuelles sur le métabolisme du fer*. 60(3), 197-203
- Loréal, Olivier, Bardou-Jacquet, É., Island, M.-L., Fatih, N., Doyard, M., Detivaud, L., & Brissot, P. (2012). Métabolisme du fer. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 47(3), 117–124.
- Loréal, Olivier, Pigeon, C., Deugnier, Y., & Brissot, P. (2000). Métabolisme du fer. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 24(5), B56–B61.
- Loréal, Olivier, Ropert, M., Doyard, M., Island, M.-L., Fatih, N., Detivaud, L., Bardou-Jacquet, E., & Brissot, P. (2012). Métabolisme du fer en 2012. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2012(442), 31–37.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E. (2011). *Glutathione peroxidase-1 in health and disease: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities*. 15(7), 1957-1997.
- Lucarini, M., Durazzo, A., Nicoli, S. F., Raffo, A., Santini, A., Novellino, E., Souto, E., Romani, A., Belcaro, M., & Vita, C. (2020). Cold pressed argan (*Argania spinose*) oil. In *Cold Pressed Oils*, 459–465.
- Ludwiczek, S., Aigner, E., Theurl, I., & Weiss, G. (2003). Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood*, 101(10), 4148–4154.

-
- Luo, J., Mills, K., le Cessie, S., Noordam, R., & van Heemst, D. (2020). Ageing, age-related diseases and oxidative stress: What to do next? *Ageing Research Reviews*, 57, 100982.
- Macmillan-Crow, L. A., & Cruthirds, D. L. (2001). Manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radical Research*, 34(4), 325–336.
- Mar, P. D., El Khalfi, B., Benyoussef, M., & Soukri, A. (2019). The Protozoan Tetrahymena: Cellular Model for Biological Studies. *Annual Research & Review in Biology*, 1–12.
- Marcil, V., Delvin, E., Sané, A. T., Tremblay, A., & Levy, E. (2006). Oxidative stress influences cholesterol efflux in THP-1 macrophages: Role of ATP-binding cassette A1 and nuclear factors. *Cardiovascular Research*, 72(3), 473–482.
- Marfil, Rocio, Cabrera-Vique, C., Giménez, R., Bouzas, P. R., Martínez, O., & Sánchez, J. A. (2008). Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil: Influence of the extraction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7279–7284.
- Marfil, Rocío, Giménez, R., Martínez, O., Bouzas, P. R., Rufián-Henares, J. A., Mesías, M., & Cabrera-Vique, C. (2011). Determination of polyphenols, tocopherols, and antioxidant capacity in virgin argan oil (*Argania spinosa*, Skeels). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(7), 886–893.
- Martínez-Huélamo, M., Rodríguez-Morató, J., Boronat, A., & de la Torre, R. (2017). Modulation of Nrf2 by Olive Oil and Wine Polyphenols and Neuroprotection. *Antioxidants*, 6(4), 73.
- Massie, H. R., Aiello, V. R., & Williams, T. R. (1985). Iron accumulation during development and ageing of *Drosophila*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 29(2), 215–220.
- Massie, H. R., Aiello, V. R., & Williams, T. R. (1993). Inhibition of iron absorption prolongs the life span of *Drosophila*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 67(3), 227–237.

-
- Mathur, P., Ding, Z., Saldeen, T., & Mehta, J. L. (2015). Tocopherols in the prevention and treatment of atherosclerosis and related cardiovascular disease. *Clinical Cardiology*, 38(9), 570–576.
- Maurya, R., Dubey, K., Singh, D., Jain, A. K., & Pandey, A. K. (2019). Effect of difenoconazole fungicide on physiological responses and ultrastructural modifications in model organism *Tetrahymena pyriformis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109375.
- Maurya, R., & Pandey, A. K. (2020). Importance of protozoa *Tetrahymena* in toxicological studies: A review. *Science of The Total Environment*, 741, 140058.
- Mechqoq, H., El Yaagoubi, M., El Hamdaoui, A., Momchilova, S., Guedes da Silva Almeida, J. R., Msanda, F., & El Aouad, N. (2021). Ethnobotany, phytochemistry and biological properties of Argan tree (*Argania spinosa* (L.) Skeels) (Sapotaceae)—A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 281, 114528.
- Mikołajczak, N., Tańska, M., & Ogrodowska, D. (2021). Phenolic compounds in plant oils: A review of composition, analytical methods, and effect on oxidative stability. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 110–138.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), 231–237.
- Milic, S., Mikolasevic, I., Orlic, L., Devcic, E., Starcevic-Cizmarevic, N., Stimac, D., Kapovic, M., & Ristic, S. (2016). The role of iron and iron overload in chronic liver disease. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 2144.

- Miller, L. L., Miller, S. C., Torti, S. V., Tsuji, Y., & Torti, F. M. (1991). Iron-independent induction of ferritin H chain by tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(11), 4946–4950.
- Mills, G. C. (1959). The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 234(3), 502–506.
- Misak, A., Grman, M., Bacova, Z., Rezuchova, I., Hudecova, S., Ondriasova, E., Krizanova, O., Brezova, V., Chovanec, M., & Ondrias, K. (2018). Polysulfides and products of H₂S/S-nitrosoglutathione in comparison to H₂S, glutathione and antioxidant Trolox are potent scavengers of superoxide anion radical and produce hydroxyl radical by decomposition of H₂O₂. *Nitric Oxide*, 76, 136–151.
- Mohan, S. V., Rohit, M. V., Chiranjeevi, P., Chandra, R., & Navaneeth, B. (2015). Heterotrophic microalgae cultivation to synergize biodiesel production with waste remediation: Progress and perspectives. *Bioresource Technology*, 184, 169–178.
- Moharram, H. A., & Youssef, M. M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: A review. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol*, 11(1), 31–42.
- Mori, K., Kashiwagi, A., & Yomo, T. (2011). Single-Cell Isolation and Cloning of Tetrahymena thermophila Cells with a Fluorescence-Activated Cell Sorter. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 58(1), 37–42.
- Mortimer, M., Kasemets, K., & Kahru, A. (2010). Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa Tetrahymena thermophila. *Toxicology*, 269(2), 182–189.
- Msanda, F., El Aboudi, A., & Peltier, J.-P. (2005). Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine. *Cahiers Agricultures*, 14(4), 357–364.
- Msanda, F., Mayad, E. H., & Furze, J. N. (2021). Floristic biodiversity, biogeographical significance, and importance of Morocco's Arganeraie Biosphere Reserve. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 64156–64165.

-
- Na, H.-K., & Surh, Y.-J. (2008). Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food and Chemical Toxicology*, 46(4), 1271–1278.
- Naito, Y., Sawada, H., Oboshi, M., Fujii, A., Hirotsu, S., Iwasaku, T., Okuhara, Y., Eguchi, A., Morisawa, D., & Ohyanagi, M. (2013). Increased renal iron accumulation in hypertensive nephropathy of salt-loaded hypertensive rats. *PLoS One*, 8(10), e75906.
- Nakamura, T., Naguro, I., & Ichijo, H. (2019a). Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1863(9), 1398–1409.
- Nakamura, T., Naguro, I., & Ichijo, H. (2019b). Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863(9), 1398–1409.
- Ndayisaba, A., Kaindlstorfer, C., & Wenning, G. K. (2019). Iron in Neurodegeneration—Cause or Consequence? *Frontiers in Neuroscience*, 13, 180.
- Nguyen, T., Sherratt, P. J., & Pickett, C. B. (2003). Regulatory Mechanisms Controlling Gene Expression Mediated By the Antioxidant Response Element. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(1), 233–260.
- Ni, J.; Sasaki, Y.; Tokuyama, S.; Sogabe, A.; Tahara, Y. Conversion of a Typical Catalase from Bacillus Sp. TE124 to a CatalasePeroxidase by Directed Evolution. *J. Biosci. Bioeng.* 2002, 93, 31–36.
- Nicolas, G., Vaulont, S., & Beaumont, C. (2004). Mécanismes impliqués dans la régulation de l'absorption intestinale du fer. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 39(3), 195–201.
- Nilsson, J. R. (1981). On cell organelles in Tetrahymena. With special reference to mitochondria and peroxisomes. *Carlsberg Research Communications*, 46(5), 279–304.

-
- Nilsson, J. R. (1989). Tetrahymena in Cytotoxicology: With special reference to effects of heavy metals and selected drugs. *European Journal of Protistology*, 25(1), 2–25.
- Nogueira, V., & Hay, N. (2013). Molecular Pathways : Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. *Clinical Cancer Research*, 19(16), 4309-4314.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351–358.
- Olynyk, J. K., & Clarke, S. L. (2001). Iron overload impairs pro-inflammatory cytokine responses by Kupffer cells. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 16(4), 438–444.
- Omar, S., Feki, M., & Kaabachi, N. (2006). Le métabolisme du fer: Revue générale et récents développements. *Annales de Biologie Clinique*, 64(6), 523–534.
- Ostlund Jr, R. E., Racette, S. B., & Stenson, W. F. (2002). Effects of trace components of dietary fat on cholesterol metabolism: Phytosterols, oxysterols, and squalene. *Nutrition Reviews*, 60(11), 349–359.
- Ould Mohamedou, M. M., Zouirech, K., El Messal, M., El Kebbaj, M. S., Chraïbi, A., & Adlouni, A. (2011). Argan oil exerts an antiatherogenic effect by improving lipids and susceptibility of LDL to oxidation in type 2 diabetes patients. *International Journal of Endocrinology*, 2011. 747835.
- Pari, L., Karthikeyan, A., Karthika, P., & Rathinam, A. (2015). Protective effects of hesperidin on oxidative stress, dyslipidaemia and histological changes in iron-induced hepatic and renal toxicity in rats. *Toxicology Reports*, 2, 46–55.
- Passos, J. F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M. J., Harold, G., Schaeuble, K., Birch-Machin, M. A., Kirkwood, T. B. L., & von

- Zglinicki, T. (2007). Mitochondrial Dysfunction Accounts for the Stochastic Heterogeneity in Telomere-Dependent Senescence. *PLoS Biology*, 5(5), e110.
- Paunovic, J., Vucevic, D., Radosavljevic, T., Mandić-Rajčević, S., & Pantic, I. (2020). Iron-based nanoparticles and their potential toxicity: Focus on oxidative stress and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 316, 108935.
- Pérez-Gálvez, A., Viera, I., & Roca, M. (2020). Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants*, 9(6), 505.
- Petrat, F., Groot, H. de, Sustmann, R., & Rauen, U. (2002). The chelatable iron pool in living cells: A methodically defined quantity. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 1957-1997.
- Pietrangelo, A., Dierssen, U., Valli, L., Garuti, C., Rump, A., Corradini, E., Ernst, M., Klein, C., & Trautwein, C. (2007). STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin in vivo. *Gastroenterology*, 132(1), 294–300.
- Piga, A., Galanello, R., Forni, G. L., Cappellini, M. D., Origa, R., Zappu, A., Donato, G., Bordone, E., Lavagetto, A., & Zanaboni, L. (2006). Randomized phase II trial of deferasirox (Exjade, ICL670), a once-daily, orally-administered iron chelator, in comparison to deferoxamine in thalassemia patients with transfusional iron overload. *Haematologica*, 91(7), 873–880.
- Pilo, F., & Angelucci, E. (2018). A storm in the niche: Iron, oxidative stress and haemopoiesis. *Blood Reviews*, 32(1), 29–35.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97, 55–74.
- Poynter, M. E., & Daynes, R. A. (1998). Peroxisome proliferator-activated receptor α activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor- κ B signaling, and reduces

- inflammatory cytokine production in aging. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32833–32841.
- Psomiadou, E., & Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 716–721.
- Rahmani, M. (2005). Composition chimique de l'huile d'argane «vierge». *Cahiers Agricultures*, 14(5), 461–465.
- Rajendran, P., Nandakumar, N., Rengarajan, T., Palaniswami, R., Gnanadhas, E. N., Lakshminarasiah, U., ... Nishigaki, I. (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436, 332–347.
- Rao, A. V., & Rao, L. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacology Research*, 55, 207–216.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237.
- Redon, C. E., Nakamura, A. J., Martin, O. A., Parekh, P. R., Weyemi, U. S., & Bonner, W. M. (2011). Recent developments in the use of γ -H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker. *Aging*, 3(2), 168–174.
- Renassia, C., & Peyssonnaud, C. (2019). New insights into the links between hypoxia and iron homeostasis: *Current Opinion in Hematology*, 26(3), 125–130.
- Repetto, M., Semprine, J., & Boveris, A. (2012). Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. In A. Catala (Ed.), *Lipid Peroxidation*. 1-515.
- Rishi, G., & Subramaniam, V. N. (2017). The liver in regulation of iron homeostasis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 313(3), G157-G165.

- Robinett, N. G., Peterson, R. L., & Culotta, V. C. (2018). Eukaryotic copper-only superoxide dismutases (SODs): A new class of SOD enzymes and SOD-like protein domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(13), 4636–4643.
- Rodrigo, R., Gil, D., Miranda-Merchak, A., & Kalantzidis, G. (2012). Antihypertensive Role of Polyphenols. In *Advances in Clinical Chemistry*, 58, 225–254.
- Rogers, J. T. (1996). Ferritin translation by interleukin-6: The role of sequences upstream of the start codons of the heavy and light subunit genes. *Blood*, 87 (6): 2525–2537.
- Rueda, A., Samaniego-Sánchez, C., Olalla, M., Giménez, R., Cabrera-Vique, C., Seiquer, I., & Lara, L. (2016). Combination of Analytical and Chemometric Methods as a Useful Tool for the Characterization of Extra Virgin Argan Oil and Other Edible Virgin Oils. Role of Polyphenols and Tocopherols. *Journal of AOAC International*, 99(2), 489–494.
- Ryan, T. P., & Aust, S. D. (1992). The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Critical Reviews in Toxicology*, 22(2), 119–141.
- Samaniego Sánchez, C., Troncoso González, A. M., García-Parrilla, M. C., Quesada Granados, J. J., López García de la Serrana, H., & López Martínez, M. C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593(1), 103–107.
- Saretzki, G. (2010). Cellular Senescence in the Development and Treatment of Cancer. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1), 79–100.
- Saretzki, G., Walter, T., Atkinson, S., Passos, J. F., Bareth, B., Keith, W. N., Stewart, R., Hoare, S., Stojkovic, M., Armstrong, L., Zglinicki, T., Lako, M., & Lako, M. (2008). Downregulation of Multiple Stress Defense Mechanisms During Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*, 26(2), 455–464.
- Scapagnini, G., Sonya, V., Nader, A. G., Calogero, C., Zella, D., & Fabio, G. (2011). Modulation of Nrf2/ARE Pathway by Food Polyphenols: A Nutritional Neuroprotective

- Strategy for Cognitive and Neurodegenerative Disorders. *Molecular Neurobiology*, 44(2), 192–201.
- Sebaa, H. S., & Harche, M. K. (2014). Anatomical structure and ultrastructure of the endocarp cell walls of *Argania spinosa* (L.) Skeels (Sapotaceae). *Micron (Oxford, England: 1993)*, 67, 100–106.
- Seiquer, I., Rueda, A., Olalla, M., & Cabrera-Vique, C. (2015). Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, 188, 496–503.
- Şekeroğlu, Z. A., Aydın, B., & Şekeroğlu, V. (2017). Argan oil reduces oxidative stress, genetic damage and emperipolexis in rats treated with acrylamide. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 873–879.
- Sfera, A., Bullock, K., Price, A., Inderias, L., & Osorio, C. (2018). Ferrosenescence: The iron age of neurodegeneration? *Mechanisms of Ageing and Development*, 174, 63–75.
- Shahidi, F., & de Camargo, A. (2016). Tocopherols and Tocotrienols in Common and Emerging Dietary Sources: Occurrence, Applications, and Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1745.
- Shander, A., Berth, U., Betta, J., & Javidroozi, M. (2012). Iron overload and toxicity: Implications for anesthesiologists. *Journal of Clinical Anesthesia*, 24(5), 419–425.
- Sharma, P., Jha, A. áB, Dubey, R. S., & PessarakliM, R. O. S. (2012). Oxidative Damage and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26.
- She, H., Xiong, S., Lin, M., Zandi, E., Giulivi, C., & Tsukamoto, H. (2002). Iron activates NF- κ B in Kupffer cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(3), G719–G726.

-
- Shuang, R., Rui, X., & Wenfang, L. (2016). Phytosterols and dementia. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(4), 347–354.
- Shull, S., Heintz, N. H., Periasamy, M., Manohar, M., Janssen, Y. M., Marsh, J. P., & Mossman, B. T. (1991). Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *Journal of Biological Chemistry*, 266(36), 24398–24403.
- Sikorska, K., Bernat, A., & Wróblewska, A. (2016). Molecular pathogenesis and clinical consequences of iron overload in liver cirrhosis. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 15(5), 461–479.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Slaoui, M., & Fiette, L. (2011). Histopathology Procedures: From Tissue Sampling to Histopathological Evaluation. *Drug Safety Evaluation*, 691, 69–82.
- Smith, S. R., Cooperman, S., Lavaute, T. I. M., Tresser, N., Ghosh, M., Meyron-Holtz, E., Land, W., Ollivierre, H., Jortner, B., & Switzer III, R. (2004). Severity of neurodegeneration correlates with compromise of iron metabolism in mice with iron regulatory protein deficiencies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012(1), 65–83.
- Stanger, B. Z. (2015). Cellular homeostasis and repair in the mammalian liver. *Annual Review of Physiology*, 77, 179–200.
- Steinhorn, R. H., & Lakshminrusimha, S. (2020). Oxygen and pulmonary vasodilation: The role of oxidative and nitrosative stress. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 25(2), 101083.

-
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., & Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, *123*(7), 1213–1226.
- Sugeçti, S. (2018). Role of protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense systems on diabetes mellitus. *Aurum Journal of Health Sciences*, *1*(1), 47–54.
- Sultana, R., Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2013). Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: A redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free Radical Biology & Medicine*, *62*, 157–169.
- Sun, T., Xu, Z., Wu, C.-T., Janes, M., Prinyawiwatkul, W., & No, H. K. (2007). Antioxidant activities of different colored sweet bell peppers (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Food Science*, *72*(2), S98–S102.
- Tang, C., Chen, Y., Huang, J., Zhao, K., Chen, X., Yin, Z., Heng, B., Chen, W., & Shen, W. (2018). The roles of inflammatory mediators and immunocytes in tendinopathy. *Journal of Orthopaedic Translation*, *14*, 23–33.
- Taniguchi, N. (1992). Clinical significances of superoxide dismutases: Changes in aging, diabetes, ischemia, and cancer. *Advances in Clinical Chemistry*, *29*, 1–59.
- Taous, F., Amenzou, N., Marah, H., Maia, R., Maguas, C., Bahmad, L., & Kelly, S. (2020). Stable isotope ratio analysis as a new tool to trace the geographical origin of Argan oils in Morocco. *Forensic Chemistry*, *17*, 100198.
- Taso, O. V., Philippou, A., Moustogiannis, A., Zevolis, E., & Koutsilieris, M. (2019). Lipid peroxidation products and their role in neurodegenerative diseases. *Annals of Research Hospitals*, *3*, 2–2.
- Terrier-Lenglet, A., Nollet, A., Liabeuf, S., Barreto, D. V., Brazier, M., Lemke, H.-D., Vanholder, R., Choukroun, R., & Massy, Z. A. (2011). Le malondialdéhyde est-il un

- facteur prédictif de mortalité chez les patients ayant une maladie rénale chronique ?
Néphrologie & Thérapeutique, 7(4), 219–224.
- Toblli, E., Cao, G., Oliveri, L., & Angerosa, M. (2011). Assessment of the extent of oxidative stress induced by intravenous ferumoxytol, ferric carboxymaltose, iron sucrose and iron dextran in a nonclinical model. *Arzneimittelforschung*, 61(07), 399–410.
- Toblli, J. E., Cao, G., Rico, L., & Angerosa, M. (2017). Cardiovascular, liver, and renal toxicity associated with an intravenous ferric carboxymaltose similar versus the originator compound. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 3401–3412.
- Tofovic, S. P., & Jackson, E. K. (1999). Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 33(3), 360–366.
- Tosukhowong, P., Sangwatanaroj, S., Jatuporn, S., Prapunwattana, P., Saengsiri, A., Rattanapraks, S., Srimahachota, S., Udayachalerm, W., & Tangkijvanich, P. (2003). The correlation between markers of oxidative stress and risk factors of coronary artery disease in Thai patients. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 29(3, 4), 321–329.
- Traynor, K. (2011). Deferiprone approved for iron overload. *American Journal of Health-System Pharmacy: AJHP: Official Journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 68(22), 2106–2106.
- Tsimidou, M. Z., Mastralexi, A., & Özdikicierler, O. (2020). Cold pressed virgin olive oils. *In Cold Pressed Oils*, 547–573.
- Tu, W., Wang, H., Li, S., Liu, Q., & Sha, H. (2019). The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. *Aging and Disease*, 10(3), 637.

- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65–74.
- Vamecq, J., Andreoletti, P., El Kebbaj, R., Saih, F.-E., Latruffe, N., El Kebbaj, M. H. S., Lizard, G., Nasser, B., & Cherkaoui-Malki, M. (2018). Peroxisomal Acyl-CoA Oxidase Type 1: Anti-Inflammatory and Anti-Aging Properties with a Special Emphasis on Studies with LPS and Argan Oil as a Model Transposable to Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 6986984.
- Van Swelm, R. P. L., Wetzels, J. F. M., & Swinkels, Dorine. W. (2020). The multifaceted role of iron in renal health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 16(2), 77–98.
- Vaulont, S. (2017). Métabolisme du fer. *Archives de Pédiatrie*, 24(5), 5S32-5S39.
- Venegas, C., Cabrera-Vique, C., García-Corzo, L., Escames, G., Acuña-Castroviejo, D., & López, L. C. (2011). Determination of coenzyme Q10, coenzyme Q9, and melatonin contents in virgin argan oils: Comparison with other edible vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(22), 12102–12108.
- Verga Falzacappa, M. V., Vujic Spasic, M., Kessler, R., Stolte, J., Hentze, M. W., & Muckenthaler, M. U. (2007). STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood*, 109(1), 353–358.
- Verleyen, T. (2003). Stability of minor components during vegetable oil refining. Ph.D. Thesis, University of Ghent, Ghent, Belgium, 2002; 1–249.
- Vetrano, A. M., Heck, D. E., Mariano, T. M., Mishin, V., Laskin, D. L., & Laskin, J. D. (2005). Characterization of the oxidase activity in mammalian catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(42), 35372–35381.
- Visioli, F., & Galli, C. (2001). The role of antioxidants in the mediterranean diet. *Lipids*, 36(S1), S49–S52.

-
- Visioli, F., & Galli, C. (2002). Biological properties of olive oil phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(3), 209–221.
- W. Caldwell, G., Yan, Z., Lang, W., & A. Masucci, J. (2012). The IC50 Concept Revisited. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(11), 1282–1290.
- Ward, R. J., Zucca, F. A., Duyn, J. H., Crichton, R. R., & Zecca, L. (2014). The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *The Lancet Neurology*, 13(10), 1045–1060.
- Weng, D., Lu, Y., Wei, Y., Liu, Y., & Shen, P. (2007). The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. *Toxicology*, 232(1–2), 15–23.
- Wessling-Resnick, M. (2010). Iron Homeostasis and the Inflammatory Response. *Annual Review of Nutrition*, 30(1), 105–122.
- Xie, D., Zhou, P., Liu, L., Jiang, W., Xie, H., Zhang, L., & Xie, D. (2019). Protective Effect of Astragaloside IV on Hepatic Injury Induced by Iron Overload. *BioMed Research International*, 2019, 1–9.
- Xue, D., Zhou, X., & Qiu, J. (2020). Emerging role of NRF2 in ROS-mediated tumor chemoresistance. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 131, 110676.
- Yamamoto, A., Shin, R.-W., Hasegawa, K., Naiki, H., Sato, H., Yoshimasu, F., & Kitamoto, T. (2002). Iron (III) induces aggregation of hyperphosphorylated τ and its reduction to iron (II) reverses the aggregation: Implications in the formation of neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 82(5), 1137–1147.
- Yao, M.-C., Yao, C.-H., Halasz, L. M., Fuller, P., Rexer, C. H., Wang, S. H., Jain, R., Coyne, R., & Chalker, D. L. (2007). Identification of novel chromatin-associated proteins involved in programmed genome rearrangements in *Tetrahymena*. *Journal of Cell Science*, 120(12), 1978–1989.

- Yatmark, P., Morales, N. P., Chaisri, U., Wichaiyo, S., Hemstapat, W., Srichairatanakool, S., Svasti, S., & Fucharoen, S. (2016). Iron distribution and histopathological study of the effects of deferoxamine and deferiprone in the kidneys of iron overloaded β -thalassemic mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 68(8), 427–434.
- Yoshida, E., Watanabe, T., Takata, J., Yamazaki, A., Karube, Y., & Kobayashi, S. (2006). Topical application of a novel, hydrophilic γ -tocopherol derivative reduces photo-inflammation in mice skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(7), 1633–1640.
- You, K., Parikh, P., Khandalavala, K., Wicher, S. A., Manlove, L., Yang, B., Roesler, A., Roos, B., Teske, J., Britt, R., Pabelick, C., & Prakash, Y. S. (2019). Moderate hyperoxia induces senescence in developing human lung fibroblasts. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 317(5), L525–L536.
- Zambon, A., Gervois, P., Pauletto, P., Fruchart, J.-C., & Staels, B. (2006). Modulation of hepatic inflammatory risk markers of cardiovascular diseases by PPAR-alpha activators: Clinical and experimental evidence. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(5), 977–986.
- Zarrouk, A., Cheraief, I., Hadj Ahmed, S., Chaabane, W., Hammami, S., Debbabi, M., Frih-Ayed, M., Rouaud, O., Moreau, T., Lizard, G., & Hammami, M. (2015). Correlations between Peripheral Trans Fatty Acids, Lipid Peroxidation Markers and Cognition in Dementia. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 4,4.
- Zduńska, K., Dana, A., Kolodziejczak, A., & Rotsztein, H. (2018). Antioxidant Properties of Ferulic Acid and Its Possible Application. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(6), 332–336.
- Zhang, P., Li, T., Wu, X., Nice, E. C., Huang, C., & Zhang, Y. (2020). Oxidative stress and diabetes: Antioxidative strategies. *Frontiers of Medicine*, 14(5), 583–600.

Zhang, X.-M., Ellis, S., Sriratana, A., Mitchell, C. A., & Rowe, T. (2004). Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 43027–43034.

Zhuang, T., Han, H., & Yang, Z. (2014). Iron, Oxidative Stress and Gestational Diabetes. *Nutrients*, 6(9), 3968–3980.

Webographie

EFAS, leader mondial de l'huile Argan cosmétique, 2019, <http://www.argan-maroc.com>

Nations Unis (2021). <https://www.un.org/fr/observances/argania-day>

Organization W. H., & Safety I. P. on C. (1996). *Guidelines for drinking-water quality. Vol. 2, Health criteria and other supporting information.* World Health Organization.

Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/38551>