L'INTERET DE L'HUILE D'ARGAN VIERGE EENRICHIE EN INSAPONIFIABLE AINSI QUE LES PEPTIDES EXTRAITS DE TOURTEAUX EN COSMETOLOGIE

P. FABRE
Dermo-cométique, Allées Camille Soula. Vigoulet Auzil CASTANET TOLOSAN, France.

L'Arganier est valorisé sous différentes formes, la graine en particulier est valorisée pour l'utilisation de l'huile en cosmétologie, le tourteau résiduel de pressage, en alimentation animale. Nous nous sommes intéressés à la valorisation cosmétique d'une huile transformée, enrichie en sa partie insaponifiable ainsi qu'aux tourteaux.

L'huile d'Argan vierge a été utilisée dans un premier temps telle quelle, puis dans un but d'amélioration de ce produit, nous avons enrichi d'un facteur 3.5 par la technique de distillisation moléculaire, sa partie insaponifiable composée de tocophérols, de carotènes et xanthophylles, de stérols, d'alcools triterpéniques et d'hydrocarbures. La composition chimique de cet insaponifiable n'a pas été significativement modifiée par la technique d'enrichissement. L'huile ainsi obtenue, a été évaluée pour ses activités hydratante, antiradicalaire, piégeur de radicaux libres ainsi qu'une activité stimulante de prolifération de fibroblastes. Les tourteaux d'Argan sont composés essentiellement de protéines (25 à 35%), de lipides résiduels de pressage (20 à 30 %), de polysaccharides (15 à 25 %), de cendres, d'oligo-éléments et d'eau. Les protéines sont donc les molécules les plus abondantes mais leur disponibilité cosmétique et leur solubilité ne sont pas satisfaisantes.

Ainsi, afin d'améliorer ces caractéristiques, nous avons hydrolysé par voie enzymatique ces protéines après extraction et ainsi obtenu une solution de peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 20 000 Daltons. Ces peptides ont été évalués pour des propriétés liées aux troubles de vieillissement cutané. Ainsi, nous avons démontré une activité de stimulation cellulaire sur des lignées cellulaires d'origines fibroblastique et épithéliale. La stimulation du métabolisme des cellules fibroblastiques a également été évaluée par oxygraphie. L'intérêt de l'huile d'Argan vierge ou enrichie en sa partie insaponifiable ainsi que les peptides issus des tourteaux, justifient leurs utilisations en cosmétologie.

Le pressage des amandes des graines d'Argan permet d'obtenir l'huile d'Argan et un tourteau résiduel.

L'huile d'Argan peut être directement valorisée dans un produit cosmétique, mais nous avons choisi d'enrichir sa partie insaponifiable. Les tourteaux sont extraits de façon à obtenir une partie protéique qui subira dans un second temps une hydrolyse enzymatique pour donner un extrait enrichi en peptides.

1 - L'HUILE D'ARGAN ENRICHIE

1.1 - Technique d'enrichissement :

L'huile enrichie d'Argan est obtenue par distillation moléculaire à partir de l'huile d'Argan filtrée.

La distillation moléculaire est particulièrement adaptée à des produits instables qui ne supportent pas les distillations classiques. En effet, on opère à des pressions très réduites (jusqu'à 10^{-3} torr.), à des températures élevées (jusqu'à 300°C), mais le chauffage, donc la distillation, est effectué durant un temps de séjour très bref (0,1 à 1 seconde). Ce temps de chauffe très bref permet de ne pas altérer la qualité du produit distillé.

Le procédé de distillation est défini par les paramètres suivants :

* la température de distillation : elle est fixée à 270°C
* le vide : 4 tors
* le taux de distillation, ou rendement de distillation de 12 à 15 % par rapport à l'huile engagée.

Les paramètres analytiques découlent de ces paramètres, en particulier le taux d'insaponifiable et l'indice d'acide, en effet, la distillation concentre, en premier, les acides gras libres.

L'huile d'Argan enrichie ainsi obtenu, subit une étape de désodorisation par entraînement à la vapeur à 180°C, sous vide et sous flux d'azote de façon à éliminer les acides gras libres préconcentrés.
Le rendement de purification est alors de l'ordre de 85 %.

1.2 - Analyse chimique

Les huiles d'Argan enrichie et vierge ont été comparées chimiquement pour leur teneur en insaponifiable, leur coupe d'acides gras mais aussi pour les indices de base.

	Huile d'Arga	Huile d'Argan enrichie
Indice d'acide	1,05	1,8
Indice de peroxyde	6	0,5
Insaponifiable	1,2 %	3,8 %
Coupe acide gras %		
Ac. Palmitique C 16 = 0	12,3	14,3
Ac. Stéarique C 18 =0	5,9	5
Ac. Oléique C 18 = 1	46,5	44
Ac. Linoléique C 18 = 2	34,3	31,8

La teneur en insaponifiable de l'huile d'Argan enrichie est 3,16 fois plus élevée que l'huile vierge d'où elle est issue. Les valeurs moyennes se situent entre 3 et 4. On remarque que l'indice de peroxyde est plus bas ce qui est du à l'étape de désodorisation. Les répartitions en acides gras sont très similaires dans les 2 huiles.

Les tocophérols sont enrichis d'un facteur 5,5 donc de façon plus importante que l'insaponifiable. Ceci peut être expliqué par l'élimination des hydrocarbures ou autres composés partiellement volatils lors de la distillation. On note l'enrichissement beaucoup plus important en γ-tocophérol (x 8,3) alors que le facteur de 5,5 n'est pas respecté pour les α et les δ tocophérols.

Dans le cas des composés de la filière triterpéniques = alcools triterpéniques, 4 methylstérols et stérols, les proportions relatives sont voisines. On note quand même des variations dans les propositions relatives des différents composés individuels. Cette variation est beaucoup plus importante dans le cas des alcools triterpéniques.

1.3 - Evaluation

3 types d'activités ont été recherchés : l'activité antiradicalaire, la cinétique de contraction de lattice de collagène et l'étude de la perspiration cutanée chez la souris.

Les insaponifiables des 2 huiles ont été étudiés plus précisément :

	Huile vierge		Huile enrichie	
Insaponifiable %	1,28		3,84	
Tocophérols totaux mg / kg d'huile	250		1384	
% insapo.	1,9		3,60	
Tocophérols individuels	%	mg / kg *	%	mg / kg *
α	22	55	18	249
β	Tr	Tr	4	55
γ	26	65	39	540
δ	52	130	39	540
F. Triterpénique	%	mg / kg *	%	mg / kg *
F. triterpénique		614		1958
F. triterpénique / Insaponifiable	48		51	
Stérols / FT	60,1	371	59,6	1167
4-méthylstérols	5,5	34	6,3	123
Alcools triterpéniques	32,7	201	28,3	554
Autres	1,4	8	5,8	114
Stérols				
S1	1,1	4	0,2	2
S2	0,4	1,5	Tr	Tr
S3	0,9	3	2,2	26
Stigmasta-7,22 dièn-3βol	49,1	182	53,4	623
Stigmasta-8,22 dièn-3βol	0,2	0,5	0,7	8
Stigmasta-7-èn-3β-ol	45,7	170	42,1	491
Stigmasta- 7,24 dièn-3β-ol	2,6	10	1,4	1,6
4-Méthylstérols				
cyclocucalènol	35,6	12	28,4	35
?	8,9	3	16,2	20
?	9,2	3	5,7	7
?	12,1	4	4,2	5
citrostadiènol	14,3	5	16,4	20
Autres	19,9	7	29,1	36
Alcools triterpéniques				
β amyrine				
?	27,1	54	28,7	159
butyrospermol	-	-	16,1	89
tirucallol	24,6	50	11,4	63
α-amyrine + lupéol	13,0	26	13,2	73
24 méthylène -	25,4	51	13,5	75
cycloartanol	5,9	12	7,4	41
Autres	4,0	8	9,7	54

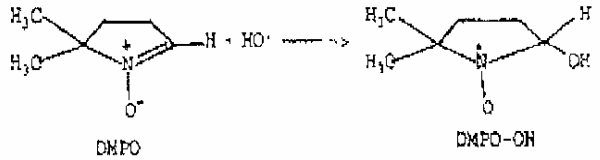
* mg / Kg d'huile

* **Activité antiradicalaire**

La formation du radical hydroxyle (HO^-) s'effectue selon l'équation suivante :

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow HO^- + OH^- + Fe^{3+}$$

La durée de vie d'un radical étant très courte, il est nécessaire de le "piéger" à l'aide de molécules organiques



qui réagissent avec celui-ci pour donner un radical suffisamment stable pour être détecté par Résonance Para Electronique (RPE). Le piégeur utilisé pour cette étude est le 5,5-Diméthyl-1-pyrroline-N-oxyde (DMPO). Il réagit avec le radical hydroxyle selon l'équation suivante :

Le spectre RPE de l'aduit DMPO-OH permet de mesurer par l'intensité de son signal, les radicaux libres non chelatés. L'addition d'une substance antiradicalaire diminue l'intensité de ce signal mesurable et est fonction - dose dépendante.

On détermine la CI 50, concentration nécessaire pour observer une diminution de 50 % de l'intensité du signal RPE par rapport au signal témoin.

CI 50

Huile d'Argan	1,88 g / l
Huile d'Argan enrichie	0,5 g / l

Le facteur de concentration de l'insaponifiable correspond à celui de l'activité antiradicalaire, preuve que cette activité est dûe à cette partie.

* **Cinétique de concentration de lattice de collagène**

Le fibroblaste est la cellule principale du derme, il en assure le métabolisme et l'organisation.

Les cultures de fibroblastes en mono-couche sont un

bon outil pour en étudier la biologie cutanée in vitro, mais ce modèle a des limites.

La culture de fibroblastes en réseau tri-dimentionnel de collagène = modèle du derme équivalent de BELL est un modèle plus physiologique aboutissant à un feuillet tissulaire vivant.

La méthode consiste à réaliser cette structure dermique à l'aide de fibroblastes provenant d'une culture cellulaire et de collagène natif de type I acido-soluble. Dans nos conditions de culture bien précises, il se forme un gel qui se contracte en quelques heures par exsudation d'eau et dans lequel sont dispersées les cellules.

La cinétique de contraction, mesure de la surface du derme en fonction du temps, apprécie quantitativement le phénomène de contraction du lattice de collagène.

Des facteurs exogènes peuvent faire varier cette cinétique. Parmi ces facteurs, les plus importants sont :

- le nombre initial de fibroblastes
- la concentration du collagène dans le milieu initial,
- la concentration en sérum de veau foetal, SVF du milieu de culture (activateur du métabolisme cellulaire).

Le taux de prolifération à l'intérieur du lattice n'a qu'un rôle mineur voire inexistant.

La contraction se fait par étapes caractérisées par des vitesses différentes. Pendant la première phase, la contraction est rapide et intense (les premières 24 heures), diminuant la surface du gel de 40 à 50 %. Au cours des 4 jours suivants, la contraction se ralentit, puis au 10ème jour, la contraction est terminée, le derme équivalent présente son aspect définitif.

Nous nous sommes donc proposés de vérifier l'action de l'insaponifiable de l'huile d'Argan, sur la cinétique de contraction des lattices de collagène en présence d'une population fixe de fibroblastes, dans des conditions d'activité métabolique :

- Normale (5 % de sérum de veau foetal)
- Faible (1 % de sérum de veau foetal).

Nos conditions expérimentales nous permettent de mettre en évidence les 3 phases classiques observées lors de la réalisation du derme équivalent dans le lot témoin 5 % SVF à savoir :

1 phase rapide de rétraction durant les 24 premières heures suivie d'une phase de contraction d'intensité moyenne durant les 30 heures suivantes et stabilisation de la structure dermique entre le 6ème et 10ème jour.

Le lot témoin 1 % de SVF montre un net retard dans la contraction du gel, retard toujours non compensé au bout de 10 jours.

Par contre, un traitement à base d'insaponifiable d'Argan à 0,01 et 0,03 % dans le milieu de culture à 1 % de SVF compense nettement ce retard et nous replace dans les conditions expérimentales optimales de 5 % de SVF. Cet effet est aussi dose dépendant.

*** <u>Perspiration cutanée chez la souris</u> :**

La déficience en acides gras essentiels entraîne un dérèglement de la fonction barrière de l'épiderme qui se manifeste par une perte en eau au travers de la couche cutanée.

Nous avons donc carencé des animaux en A.G.E. et étudié comparativement l'influence d'applications cutanées d'huile d'argan vierge ou d'huile d'argan enrichie sur la perspiration de ces animaux.

La mesure de la perte en eau par le stratum corneum est faite à l'acide d'un évaporimètre dont la soude est appliquée sur le ventre tondu de la souris évaluant la perspiration en grammes d'eau par m^2 et par heure.

Le traitement par les deux huiles diminue rapidement et de façon comparable la perspiration chez l'animal carencé en A.G.E. et ceci pendant une longue durée.

Nous pouvons donc conclure que la partie insaponifiable n'influence pas l'activité de l'huile sur la restauration de la barrière épidermique : c'est effectivement la partie glycéridique, qui est peu modifiée par la distillation moléculaire qui est active sur la restauration du ciment intercellulaire (activité dès le 4ème jour). Il s'agit d'une réelle reconstitution de l'intégrité du stratum corneum, car une huile de paraffine s'avère inactive sur ce type de modèle.

2 - LES PEPTIDES D'ARGAN

2.1 - Extraction

Les tourteaux d'Argan sont composés essentiellement de protéines 25 à 35 % selon les provenances du tourteau, de lipides résiduels non extractibles 20 à 30 %, de polysaccharides 15 à 25 %, de cendres et d'eau. Les protéines peuvent être extraites par l'eau mais ne sont pas stables. De plus, elles sont dénuées de propriétés biologiques cosmétiquement intéressantes.

Elles sont donc solubilisées par hydrolyse enzymatique par une protéase. Cette hydrolyse conduit à la formation de peptides dont le poids moléculaire est inférieur à 20.000 D.

2.2 - Evaluation

Les peptides d'Argan sont étudiés pour leur activité sur les cellules cutanées pour leur activité stimulante de la prolifération des cellules mais également de leur métabolisme.

*** Potentialisation de l'activité proliférative**

Le principe du test est basé sur la transformation enzymatique d'un sel de tétrazolium, le sodium 3,3 [1 [(phényl amino) carbonyl] - 3,4 - tétrazolium bis (4-méthoxy-6 nitro)] benzène sulfonic acid hydrate soit, XXT, en un produit coloré, le formazan.

Le XTT est réduit par les déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes en présence d'un agent couplant d'électrons, le coenzyme Q, en un composé hydrosoluble jaune / orangé, le formazan dosable par spectrophotométrie à 450 nm.

Les cellules sont dans un premier temps incubées puis le milieu de culture est éliminée pour être remplacé par un milieu dépressé avec des concentrations variables de peptides d'Argan. Enfin, après élimination des milieux de culture, les cellules sont mises en contact avec XTT et sa métabolisation est dosée. Elle est proportionnelle à la population de cellules vivantes.

Des fibroblastes et des cellules endothéliales ont été testées. On note dans tous les cas une prolifération cellulaire, dose dépendante aux concentrations 0,1 - 0,3 et 1 %.

peptides d'Argan. Les mesures sont effectuées dans une

*** Stimulation du métabolisme cellulaire.**

La stimulation du métabolisme cellulaire peut être évaluée par la vitesse de consommation en oxygène de fibroblastes traitées par des concentrations variables de cellule équipée d'une électrode de Clarck reliée à un galvanomètre.

Sous l'effet d'un courant négatif appliqué à la cathode, les molécules d'oxygène se trouvant à la surface de la cathode vont subir une électroréduction : il se produit un courant transmis au galvanomètre. La consommation d'oxygène est enregistrée pendant 10 mn.

On obtient ainsi une droite dont la pente permet de calculer la consommation d'oxygène de ces cellules en un temps donné.

A la concentration de 0,1 et 0,3 %, les peptides d'Argan stimulent la consommation d'oxygène, donc le métabolisme des cellules de 33 et 100 %.