

Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé

Karim ARAB*, Ouahiba BOUCHENAK et Karima YAHIAOUI

Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Biologique, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université M'Hamed Bougara, Boumerdes, Algérie

*Correspondance, courriel : arabkarim3@gmail.com

Résumé

L'olivier est très répandu en Algérie et largement utilisé par les populations locales. Les propriétés médicinales de l'olivier sont surtout attribuées aux feuilles. Dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles, nous avons essayé dans cette étude de contribuer à la connaissance de certains effets biologiques des feuilles de l'olivier sauvage (*Olea europea subsp europae var. sylvestris*) et de l'olivier cultivé (*Olea europea subsp europae var. sativa*) récoltés dans la wilaya de Tizi-Ouzou.

L'utilisation de ces dernières en phytothérapie par la population locale se fait à l'état naturel (infusion ou décoction). Les feuilles sont utilisées pour leur effet hypoglycémiant et hypotenseur à des doses journalières de 40 à 50g. L'extraction des polyphénols totaux a été faite par macération au méthanol. Le rendement était de 38,74% pour l'olivier sauvage et 35, 72% pour le cultivé. L'évaluation de l'activité antioxydante des polyphénols totaux par la méthode de DPPH révèle une valeur de CI50 de 0.24mg/mL. Ceci classe les polyphénols de l'olivier comme antioxydant puissant. L'administration d'un volume de 2mL de tisane, préparée à partir de 50 g de feuille, à des rats rendus diabétiques par une dose de 150mg/kg d'alloxane a provoqué une diminution très hautement significative ($P < 0.0005$) de la glycémie et des variations non significative ($p > 0.05$) de cholestérolémie et de triglycérides.

Mots-clés : *Olea europea, polyphénols, alloxane, antioxydant, antihyperglycémiant.*

Abstract

Evaluation of the biological activity of the leaves of wild and cultivated olive

The olive tree is omnipresent in Algeria and widely used by local people. The medicinal properties of the olive tree are mostly attributed to the leaves. As part of the development of natural resources, we tried in this study contribute to the knowledge of some biological effects of leaves of wild olive (*Olea europaea subsp europae var. Sylvestris*) and cultivated (*Olea europaea subsp europae var. sativa*) collected in the wilaya of Tizi Ouzou. The use of herbal medicine in the past by the local population is in its natural state (infusion or decoction). The leaves are used for their hypoglycemic and hypotensive effect at daily doses of 40 to 50g. The extraction of total polyphenols was made by maceration with methanol. The yield was 38.74% for the wild olive and 35, 72% for cultivated. The evaluation of the antioxidant activity of total polyphenols by the DPPH method reveals an IC50 value of 0.24mg/mL. This class of olive polyphenols as a potent antioxidant. The administration of a volume of 2 ml of tea, prepared from 50 g of leaf in diabetic rats

with a dose of 150mg/kg of alloxan has caused a very highly significant ($P < 0.0005$) of the glucose and insignificant changes ($p > 0.05$) cholesterol and triglycerides.

Keywords : *Olea europea, polyphenols, alloxan, antioxidant, antihyperglycemic.*

1. Introduction

L'usage des plantes médicinales peut apporter directement des réponses à certains problèmes de santé. Cependant, avant de pouvoir recommander l'usage de telle ou telle espèce pour une maladie, il est nécessaire de valider l'usage traditionnel qui en est fait. En d'autres termes, il convient d'évaluer scientifiquement l'activité pharmacologique de la plante médicinale retenue, et apprécier si celle-ci confirme sa réputation. De plus, il est impératif de vérifier également l'absence de toxicité des plantes employées. L'usage de plantes médicinales locales, en réponse à des problèmes de santé, peut-être perçu comme une alternative aux médicaments conventionnels.

En Algérie, les plantes ont une importance dans la médecine traditionnelle. Les remèdes utilisant les plantes, sont moins chères et sans effet indésirables. Dans le cadre d'attribuer les effets biologiques à l'olivier, la majorité des études sont faites sur les propriétés pharmacologiques de l'huile d'olive [1-2]. Concernant les feuilles, elles font actuellement l'objet de recherches dans le vaste domaine de la médecine et de la pharmacologie [3]. Ce travail entre dans le cadre du laboratoire de recherche sur la valorisation et conservation des ressources biologiques. Le but de cette étude est évaluer l'activité antihyperglycémique des tisanes, ainsi que l'activité antioxydante des polyphénols totaux extraits des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé.

2. Matériel et méthodes

2-1. Présentation de la plante

L'olivier est un arbre dont la taille avoisine 10m de long. Il se reconnaît facilement à l'aspect tortueux de son tronc, à ses feuilles de forme oblongues à ovales-lancéolées et à ses fleurs regroupées en petites inflorescences en forme de grappes dressées, naissant à l'aisselle des feuilles. Le choix de cette plante est basé sur le fait qu'elle est largement utilisée dans la thérapie traditionnelle. Les parties prises en considération pour réaliser cette étude sont les feuilles.

2-2. Matériel animal

Le matériel animal utilisé est composé de rats mâles de souche Wistar, pesant entre 200 et 300g, ayant reçu une dose unique d'alloxane de 150 mg/Kg de poids corporel par voie intrapéritoniale. Au total, 40 rats présentant une glycémie franche et permanente entre 1,5 et 4g/l sont retenus. Ces derniers sont soumis à des conditions expérimentales de température (24°C), d'humidité (60%) et d'éclairage (10heures). L'aliment utilisé renferme 49,80% de glucides, 23,50% de protéines, 5,00% de lipides et 5,70% de complexe minéral-vitamine.

2-3. Collecte des feuilles et extraction des polyphénols totaux

Les feuilles sont récoltées durant le mois de janvier 2011 dans la région de Tizi Ouzou (Algérie). Elles sont séchées à l'ombre et à l'abri de la lumière pendant 10 jours, puis réduites en poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique à hélice de type Waring. La poudre résultante est conservée à l'abri de l'air, de l'humidité et de la lumière dans des flacons en verre hermétiquement fermés. Afin d'extraire les polyphénols totaux, 5 g de chaque poudre des feuilles de l'olivier (sauvage et cultivé) sont macérés dans 100mL du méthanol pendant cinq jours. Après agitation, le filtrat récupéré est séché au rotavapeur pendant 15 minutes à 70°C. Les polyphénols sont ensuite récupérés avec 10mL de méthanol.

2-4. Evaluation de l'activité antihyperglycémique

Afin de pouvoir évaluer l'effet antihyperglycémique des feuilles de l'olivier, nous avons réparti les rats en quatre lots de 10 individus chacun, dont un témoin et trois traités. Les témoins (T) reçoivent 2mL/rat d'eau distillée. Ceux de l'Essai 1 (E1) et de l'Essai 2 (E2), reçoivent respectivement le même volume de la tisane des feuilles d'olivier sauvage et cultivé à une concentration de 1mg/ml. Enfin, le lot de l'Essai 3 (E3), reçoit le même volume à la même concentration d'un médicament de référence, Diabenil. Les animaux subissent un prélèvement sanguin avant l'induction du diabète par l'alloxane, après deux heures et aussi au bout de 3h30 min. après traitement.

Le sang est recueilli sur EDTA à 2 % et centrifugé à une vitesse de 3000 tr/min pendant 15 minutes. Le plasma récupéré dans des tubes à eppendorfs servira pour le dosage des différents paramètres biochimiques. Le dosage du glucose est effectué suivant la méthode enzymatique colorimétrique de TRINDER mettant en jeu une glucose oxydase. Le cholestérol est dosé par la méthode colorimétrique enzymatique d'Alain *et al.* (1974) [4] impliquant la cholestérol oxydase. Celui des triglycérides se fait par une méthode colorimétrique enzymatique mettant en jeu le glycérol libéré à partir des triglycérides par la lipoprotéine lipase et sa transformation en glycérol 3 phosphate par l'action de la glycérol kinase. Pour chaque série d'analyse, les moyennes, l'écart type et l'erreur standard à la moyenne (ESM) sont calculées. La comparaison de deux moyennes de deux séries de mesure est réalisée grâce au test 't' de Student-Fisher.

2-5. Evaluation de l'activité antioxydante

Pour le test anti-radicalaire, nous avons utilisés du 1-1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) (VWR, France). L'activité de piégeage des radicaux libres par les polyphénols extraits est mesurée selon le protocole décrit par Benhamou *et al.* (1999) [5] et KIM *et al.* (2003) [6]. Le DPPH, radical libre de couleur violette est réduit en un composé de couleur jaune en présence de composés anti-radicalaires. L'intensité de la coloration, mesurée au spectrophotomètre, est inversement proportionnelle à l'activité antiradicalaire des composés dont on souhaite déterminer l'activité. Pour ce test, on prépare une solution de DPPH à une concentration de 0.04mg/mL. En parallèle, deux autres solutions chacune à base d'un des deux extraits végétaux sont préparées à une concentration de 1mg/mL.

A partir de ces solutions mères, cinq dilutions sont préparées à des concentrations de 0,1 mg/mL ; 0,2 mg/mL ; 0,3 mg/mL ; 0,5 mg/mL et 0,7 mg/mL. A 100µL de chaque dilution est ajoutée 2mL de la solution de DPPH. On prépare aussi un tube témoin comportant 100µL de méthanol et 2mL de DPPH. Trois répétitions sont effectuées pour l'ensemble des préparations. Les tubes sont ensuite incubés à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 30mn. Enfin, un tube standard est préparé avec la vitamine C (0,15 mg/mL). L'absorbance est lue chaque 30 secondes durant 5 min. à 515 nm. L'effet éboueur des polyphénols est exprimé en pourcentage de DPPH° réduit en partant de 100% du témoin (DPPH° seul) selon l'équation (1) :

$$\% \text{ de réduction} = \left[\frac{AT-AE}{AT} \right] \times 100 \quad (1)$$

AT: Absorbance du témoin après 5min.

AE: Absorbance de l'essai après 5 min.

3. Résultats

3-1. Rendement en polyphenols totaux

Le rendement en polyphenols obtenu à partir de 5g des feuilles est de 38,74% pour l'olivier sauvage et de 35,72% pour le cultivé.

3-2. Evolution de poids corporel

Les résultats de l'évolution du poids en gramme des individus de lot témoin et des lots traités durant toute la période de l'expérimentation, ainsi que les erreurs standards moyennes (E.S.M) sont représentés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 : Poids corporel moyen des rats témoins et traités en g.

Lots	Poids initial	Poids après 2 heures de traitement	Poids après 3h30 de traitement
T	243,38 ± 3,44	215,33 ± 8,07	200 ± 15,10
E1	269,4 ± 6,81	243,6 ± 7,40	249,89 ± 7,08
E2	249 ± 3,09	262,67 ± 5,99	242,56 ± 11,71
E3	268,5 ± 4,87	241,2 ± 5,243	232,67 ± 14,64

On remarque une diminution non significative ($P > 0,05$) du poids corporel après injection de l'alloxane pour tous les lots, puis il se stabilise à la fin de traitement à des valeurs de 200 ± 15.1 g/L pour le lot témoin, 249.89 ± 7.08 g/L pour le lot traité par la tisane des feuilles d'olivier sauvage, 242.56 ± 11.71 g/L pour le lot traité par la tisane des feuilles d'olivier cultivé, et 232.67 ± 14.64 g/L pour le lot traité par le Diabenil®.

3-3. Evolution de l'activité antihyperglycémique

3-3-1. Dosage de la glycémie

Les taux moyens de la glycémie obtenus pour les rats témoins et traités durant la période d'étude sont rassemblés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Valeurs moyennes de la glycémie (g/L) des rats témoins et traités

Lots	Glycémie de base	Après injection de l'alloxane	Après 2h de traitement	Après 3h30 de traitement
T	1,15 ± 0,10	3,41 ± 0,14	3,66 ± 0,27	3,29 ± 0,31
E1	1,19 ± 0,12	2,92 ± 0,20	1,40 ± 0,11	1,75 ± 0,15
E2	1,08 ± 0,06	1,9 ± 0,1	1,5 ± 0,12	2,06 ± 0,15
E3	1,13 ± 0,07	2,95 ± 0,18	1,78 ± 0,27	2,51 ± 0,28

Il ressort des résultats que la glycémie des rats témoins et traités, après injection de l'alloxane, a augmentée d'une manière très hautement significative ($P < 0,0005$) atteignant $3,41 \pm 0,14$ g/L pour le lot témoin, $2,92 \pm 0,20$ g/L pour le lot E1, $1,9 \pm 0,1$ g/L pour le lot E2, et $2,95 \pm 0,18$ g/L pour le lot E3. Après 2 heures d'administration de l'eau distillée pour le lot témoin, la tisane des feuilles d'olivier sauvage pour le lot E1, la tisane des feuilles d'olivier cultivé pour le lot E2, et le Diabenil® pour le lot E3, les valeurs moyennes de la glycémie présentent une diminution très hautement significative ($P < 0,0005$) pour les lots Essais. Ces mêmes valeurs augmentent légèrement et d'une façon non significative ($p > 0,05$) au bout de 3 heures et demi de traitement.

3-3-2. Dosage du cholestérol

Le taux moyen de cholestérol total chez les traités et témoins est pratiquement similaire avec des légères variations qui restent toujours non significatives ($P > 0,05$) pour toute la durée de l'étude (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Valeurs moyennes du cholestérol (g/l) des rats témoins et traités

Lots	Cholestérol de base	Après injection de l'alloxane	Après 2h de traitement	Après 3h30 de traitement
T	$1,15 \pm 0,10$	$3,41 \pm 0,14$	$3,66 \pm 0,27$	$3,29 \pm 0,31$
E1	$1,19 \pm 0,12$	$2,92 \pm 0,20$	$1,40 \pm 0,11$	$1,75 \pm 0,15$
E2	$1,08 \pm 0,06$	$1,9 \pm 0,1$	$1,50 \pm 0,12$	$2,06 \pm 0,15$
E3	$1,13 \pm 0,07$	$2,95 \pm 0,18$	$1,78 \pm 0,27$	$2,51 \pm 0,28$

Le taux moyen de cholestérol total chez les rats traités et témoins est pratiquement similaire, avec de légères variations qui restent toujours non significatives ($P > 0,05$) pour toute la durée de l'étude.

3-3-3. Dosage des triglycérides

Les taux moyens des triglycérides obtenus pour les rats témoins et traités durant la période d'étude sont rassemblés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Valeurs moyennes des triglycérides (g/L) des rats témoins et traitées

Lots	Triglycéride de base	Après injection d'alloxane	Après 2h de traitement	Après 3h30 de traitement
T	$1,32 \pm 0,076$	$1,58 \pm 0,11$	$1,16 \pm 0,10$	$0,54 \pm 0,06$
E1	$1,23 \pm 0,075$	$1,44 \pm 0,29$	$1,22 \pm 0,18$	$0,60 \pm 0,08$
E2	$1,11 \pm 0,12$	$1,44 \pm 0,08$	$1,01 \pm 0,22$	$0,88 \pm 0,05$
E3	$0,96 \pm 0,10$	$1,44 \pm 0,10$	$1,28 \pm 0,23$	$0,79 \pm 0,15$

D'après le **Tableau 4**, le taux moyen de triglycérides de base des quatre lots est pratiquement similaire, puis il subit une augmentation non significative ($P > 0,05$) après injection de l'alloxane. Après deux heures de traitement on note des diminutions de taux moyen de triglycéride pour atteindre des valeurs de $0,54 \pm 0,06$ g/L pour le lot témoin, $0,60 \pm 0,08$ g/L pour le lot traité par la tisane des feuilles d'olivier sauvage, $0,88 \pm 0,05$ g/L pour le lot traité par la tisane des feuilles d'olivier cultivé et $0,79 \pm 0,15$ g/L.

3-4. Evaluation de l'activité antioxydante

Les résultats de ce test ont montré que 50% des radicaux libres ont été éliminés par les polyphénols totaux de l'olivier sauvage à partir d'une concentration de 0.29mg/mL, contre 0.30mg/mL pour l'olivier cultivé (*Figure 1*).

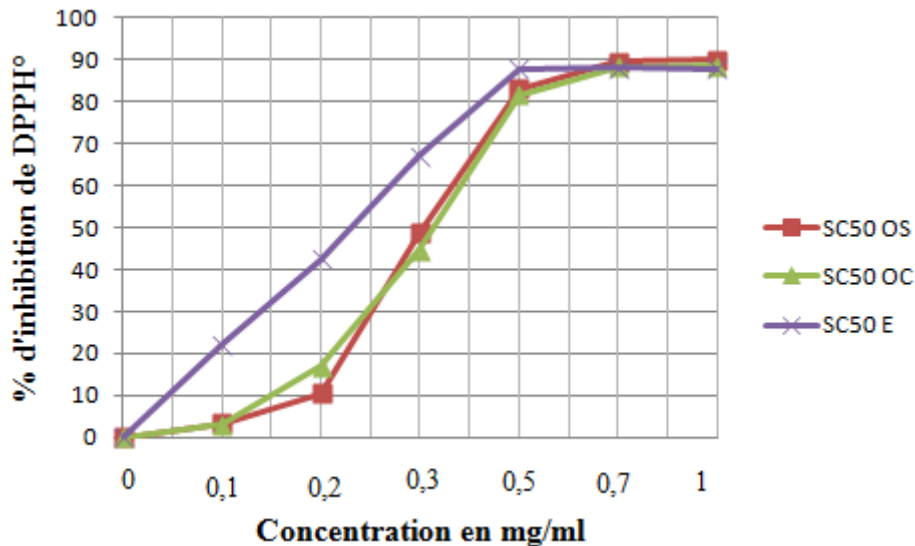


Figure 1 : *Activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des feuilles de l'olivier et par la vitamine E. IC50 OS (olivier sauvage), IC50 OC (olivier cultivé), IC50 E (vitamine E)*

Les deux valeurs trouvées sont comparées à un antioxydant très puissant, la vitamine E. l'analyse a révélée une valeur très proche, soit 0.24 mg/mL.

4. Discussion

4-1. Evolution de poids corporels

L'analyse des résultats de l'évolution pondérale par le test de Student fait apparaître une diminution non significative ($p > 0.05$). Ainsi, l'alloxane et les traitements effectués semblent ne pas avoir d'effet sur le poids corporel.

4-2. Evaluation de l'activité antihyperglycémique

Le test de Student appliqué aux résultats obtenus a montré l'existence d'une augmentation significative ($P < 0.05$) de taux moyen de glycémie pour tous les rats. Cette augmentation est due essentiellement à l'injection de l'alloxane. En effet, cette toxine provoque des modifications morphologiques au niveau de la population cellulaire de pancréas endocrine entraînant ainsi des troubles métaboliques qui accompagnent l'état diabétique. Après 2 heures d'administration de l'eau distillée pour le lot témoin, la tisane des feuilles d'olivier sauvage pour le lot E1, la tisane des feuilles d'olivier cultivé pour le lot E2, et le Diabencil[®] pour le lot E3, on note une diminution très hautement significative ($P < 0.0005$) pour les lots E1, E2, et E3, alors qu'elle reste pratiquement similaire pour les rats témoins. Ces résultats montrent une activité hypoglycémiant des tisanes des feuilles d'olivier sauvage et cultivé.

Ces mêmes résultats ont été obtenus par [7] en utilisant des extraits éthanoliques des feuilles d'*l'acacia senigalensis*, par [8] concernant deux extraits de fruits frais et sec préparés à partir d'une plante *Momordica charantia* L. Pour ce qui est de l'évolution du taux de cholestérol, l'analyse des résultats a fait apparaître une différence non significative ($P > 0,05$) entre les moyennes des rats témoins et traités. Il semble donc que l'alloxane, la tisane des feuilles d'olivier sauvage et cultivé, et le Diabenil[®] n'ont aucun effet sur le cholestérol total des rats. Enfin, l'injection de l'alloxane a provoqué une augmentation non significative ($P > 0,05$) des triglycérides des rats témoins et traités. De plus, l'analyse des valeurs obtenues a fait ressortir des diminutions de taux moyen de triglycéride au bout de 2 heures de traitement et qui continuent à diminuer après 3h30. Ceci indique bien que l'évolution du taux des triglycérides n'a aucune relation avec les traitements administrés.

4-3. Activité anti-oxydante

Les résultats de l'activité antioxydante ont montré un pouvoir antiradicalaire des extraits méthanoliques des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé vis-à-vis de DPPH proche que celui de la vitamine E. Selon [9], les polyphénols sont des antioxydants puissants capables d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules. De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux, qui peuvent produire des radicaux à l'état libre par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss [9,10].

5. Conclusion

Dans cette étude, la méthode d'affrontement par le méthanol appliquée dans l'extraction des polyphénols totaux a fait ressortir une richesse de l'olivier sauvage et cultivé en ces composés. L'évaluation de l'effet antihyperglycémique des tisanes de feuilles d'olivier sauvage et cultivé chez les rats a mis en évidence une tolérance élevée des tissus au glucose. Ceci attribue à ces substances la stimulation de la néoglycogénèse, favorisant ainsi le stockage du glucose. Enfin, ces substances sont dotées d'un pouvoir antiradicalaire très élevé comparé à celui de la vitamine E. Aussi, cette étude laisse entrevoir une voie de recherche dans la lutte contre le diabète.

Références

- [1] - N. Owen, E. Leslie, J. Salmon and MJ. Fotheringham, Environmental determinants of physical activity and sedentary behavior. *Exercise and sport Sciences Review*, 28 (2000) 153-158.
- [2] - MI. Covas, K. Nyyssönen, HE. Poulsen, J. Kaikkonen, HJ. Zunft, and H. Kiesewetter, The effect of polyphenols in olive on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.*, 145 (2006) 333-341.
- [3] - A. Chebaibi, F. Rhazi, I. Lahlou amine, A. Chahlaoui et H. L' kassmi, Etude de l'activité antimicrobienne des feuilles de l'olivier (*Olea europaea* L.). Journée Scientifique « Ressources Naturelles et Antibiothérapie », 22 Juin 2007, Faculté des Sciences – Kenitra (2007).
- [4] - CC. Allain, LS. Poon, CSG. Chan, W. Richmond, PC. Fu, Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.*, 20 (1974) 470-475.
- [5] - N. Benhammou, F. Atik Bekkara and TK. Panovska, « Antioxidant activity of methanolic extracts and some bioactive compounds of *Atriplex halimus* ». *Compte Rendu Chimie*, 12(12) (2009) 12559-1266.
- [6] - K.S. KIM, S. LEE, Y.S. LEE, S.H. JUNG, Y. PARK, K.H. SHIN and B-K. KIM, Anti-oxidant activities of the extracts from the herbs of *Artemisia apiacea*, *Journal of Ethnopharmacology*, 85 (2003) 69–72.

- [7] - M. N'diye, W. Diatta, D. Falla, B. Faye et E. Bassene, Activité antihyperglycémiant de l'extrait éthanolique des feuilles d'*Icacina sinegalensis* (Icacinaceae). *Journal Médecine d'Afrique noire*, (2008) 441-445.
- [8] - F. Ramel, C. Sulmon, M. Bogard, I. Couée and G. Gouesbet, Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *Plant Biology* 9 (2009) 1-28.
- [9] - SA. Van Acker, MN. Tromp, GR. Haenen, WJ. Van Der Vijgh, and A. Bast, Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 214 (1995) 755–759
- [10] - A. Puppo, Effect of flavonoids on hydroxyl radical formation by Fenton-type reactions; influence of the iron chelator. *Phytochemistry*, 31 (1992) 85-88.