

Original Article

Etude phytochimique de feuilles d'*Olea europaea* L. var *Chemlel* d'Algérie

Sara HIMOUR*, Abdlouhab YAHIA, Hakima BELATTAR & Leila BELLEBCIR

Laboratoire de Développement et Valorisation des Ressources Université de Mentouri Constantine, Centre universitaire de Mila, Algérie.

*Auteur correspondant. E-mail : sarahimour@yahoo.fr. Adresse : 37 Rue dhili saleh Mila .Algerie

Mots clés :

Olea europaea Var. *chemlel*
Extraits bruts
Tests phytochimiques
Dosages quantitatifs
Test chromatographique

Résumé

Olea europaea L. var *chemlel*. est un arbre qui appartient à la famille des Oléacées. C'est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. Les feuilles de la plante ont été soumises à une extraction sous reflux dans l'eau distillée, eau/méthanol (30/70) (v/v) et eau/acétone (30/70) (v/v). L'examen phytochimique qualitatif réalisé sur les feuilles d'olivier a montré la présence de flavonoïdes, de tanins, de stérols, de triterpènes en quantité importante, il a en outre révélé des quantités plus faibles de coumarines, de glycosides, de saponosides et de quinones et l'absence de terpénoïdes et d' alcaloïdes
Les tests chromatographiques (CCM) effectués sur les extraits de feuilles d'olivier a révélé la présence de fluorescence indiquant l'existence de 7 types de flavonoïdes pour la variété de Chemlel.

INTRODUCTION

Depuis des milliers d'années, l'Homme a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structures chimiques et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Cependant l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études.

Olea europaea L. est traditionnellement utilisé comme hypotenseur, émollent, laxatif, diurétique, fébrifuge, nettoyant pour la peau, et également utilisé pour les traitements d'infections urinaires, de calculs biliaires, d'asthme bronchique et de diarrhée. Plusieurs phytoconstituants ont été signalés dans les différentes parties de la plante telle que les glycosides, les flavonoïdes, les secoiridoïdes et les acides gras poly-insaturés. La présente étude a pour but de déterminer les paramètres phytochimique (les glycosides,

Secoiridoïdes, flavonoïdes ...) et l'identification des flavonoïdes par la CCM.

MATERIEL ET METHODES

Cette étude expérimentale a été réalisée au Laboratoire du centre universitaire de Mila.

Matériel végétal

Les feuilles de l'olivier (var *chemlel*) ont été récoltées à la station de Maazouzi Iekhder –Mila Est Algérie durant le mois de Novembre 2013. Ensuite, elles ont été séchées à l'abri de la lumière et de l'humidité et à température ambiante. Une fois séchée, la matière végétale a été réduite en poudre à l'aide d'un moulin à café, puis extraite sous reflux en utilisant trois solvants selon le protocole suivant: 20g de la poudre végétale ont été mélangés avec 200 ml d'un de ces solvants : eau/méthanol (30:70) (v/v), eau/acétone (30:70) (v/v). Les extraits obtenus ont été filtrés sur papier filtre, puis évaporés dans une étuve à 35 °C. Les résidus obtenus ont été conservés à 4°C

Tests photochimiques

Dosage qualitatifs : L'étude phytochimique qualitative permet de détecter les différentes familles chimiques présentes dans les feuilles de l'olivier de la variété chemlel par des réactions de coloration et de précipitation et des observations sous lumière ultra-violette.

Alcaloïdes : 10 ml de l'extrait sont évaporés à sec. Le résidu obtenu est repris dans 1.5 ml d'acide chlorhydrique 2% sous agitation au bain marie à chaud. Après refroidissement et filtration. Le filtrat est traité par le réactif de Mayer. La formation d'un précipité blanc indique la présence d'alcaloïdes (Majob, 2003).

Flavonoïdes : Réaction à la cyanidine. 1 ml de chaque extrait est ajouté à 100 µl de HCl concentré et quelques copeaux de magnésium. La présence de flavonoïdes est confirmée par l'apparition de la couleur rouge ou orange (Karumi *et al.*, 2004).

Anthocyanines (Leucoanthocyanes) : A 1 ml de l'extrait sont ajoutés 1 ml d'alcool chlorhydrique et 1 ml d'alcool iso-amylque. Le mélange est chauffé pendant 15 min. Coloration : Rouge-cerise violacée : leuco anthocyanes ; brun-rouge : catéchols.

Tanins : À 1 ml de l'extrait sont ajoutés 200 µl de FeCl₃ 1 %. La présence de tanins est indiquée par une coloration verdâtre ou bleu-noir (Karumi *et al.*, 2004).

Coumarines : Le résidu de chaque extrait est dissout dans 2 ml d'eau chaude. Le mélange est partagé dans deux tubes. On ajoute à un des tubes 0.5 ml de NH₄OH 25 %, ensuite, une goutte de chaque tube est prélevée puis déposée sur un papier filtre qui sera observé sous U.V. à 366 nm (Bruneton, 1999). Une fluorescence intense est observée pour le tube contenant le NH₄OH.

Quinones libres : Sur un volume de chacun de nos extraits, on ajoute quelques gouttes de NaOH 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence de quinones libres (Oloyde, 2005).

Stérols et triterpènes : Test de Lieberman-Burchardt. Le résidu de chaque extrait est dissout dans 1 ml d'anhydride acétique et 0.5 ml d'acide concentré. L'apparition à l'interface d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu ou au vert indique leurs présences (Edeoga *et al.*, 2005).

Terpénoïdes : Test de Slakowski. 5 ml de l'extrait sont ajoutés à 2 ml de chloroforme et 3 ml d'acide sulfurique concentré. La formation d'un anneau marron-rouge à l'interface indique la présence de terpénoïdes (Khan *et al.*, 2011).

Saponosides : 10 ml de l'extrait sont agités pendant 15 secondes puis laissés au repos pendant 15 min. Une hauteur de mousse persistante, supérieurs à 1 cm indique la présence de saponosides (N' Guessan *et al.*, 2009).

Les glycosides : Les extraits ont été dissous dans d'égaux volumes d'anhydride acétique et de CHCl₃. Le mélange a été transféré dans un tube à essai à sec. H₂SO₄ a été ajouté au bas du tube. La formation d'un anneau brun rougeâtre ou violacé à l'interface des 2 liquides indique la présence de glycosides.

Composés réducteurs : 1 ml de l'extrait est chauffé dans un bain marie, puis 200 µl de réactif de Fehling sont ajoutés à l'extrait. Un test positif est obtenu par la présence d'un précipité rouge brique (Cai *et al.*, 2011).

Dosage quantitatif (Extraction des polyphénole) : Après la récolte, le matériel végétal est pesé (50 g de feuilles sec) puis broyé à l'aide d'un moulin à café. Les composés phénoliques sont extraits du matériel végétal par macération dans un mélange éthanol/eau (80/20) (V/V) trois fois avec renouvellement du solvant chaque 24 h (Yu *et al.*, 2002).

Les macérations hydro alcooliques sont alors réunies et évaporées à sec sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu sec est repris dans de l'eau distillée bouillante (100 ml) qui solubilise quantitativement les composés phénoliques ; une décantation de 12 heures au réfrigérateur suivie d'une filtration (ou plusieurs) permettent d'éliminer les «boues» (graisses, résine). Cette épuration facilitera grandement les épreuves de chromatographie

Pour avoir les différentes phases (fractions). Les extraits bruts ainsi obtenus sont soumis à plusieurs affrontements par divers solvants organiques : Ether de pétrole, Ether diéthylique et Acétate d'éthyle. Après un repos d'une heure et demi, on récupère séparément la phase aqueuse et le solvant utilisé chargé de ses composés spécifiques. Les phases éther de pétrole ne renfermant pas de composés phénoliques sont rejetées. Quant aux autres phases, elles sont évaporées à sec avec l'évaporateur rotatif et reprises dans du méthanol 4 à 5 ml pour le diagnostic chromatographique.

Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie est aujourd'hui, une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes (analyse qualitative et quantitative).

Les facteurs qui interviennent dans le partage des molécules à séparer entre la phase stationnaire et la phase mobile sont : la solubilité dans un solvant liquide, la taille (la forme), la polarité, la charge électrique et la présence de groupements d'atomes formant des sites particuliers (Lagnika, 2006).

Le système choisis : Les plaques ont été développées dans des cuves saturées contenant le

système solvant choisi précédemment pour la CCM. Les plaques sont séchées à température ambiante pour examiner les taches des constituants sous lampe UV (254 et / ou 365 nm). On détermine alors, pour chaque constituant, le Rapport frontal :

$$RF = \frac{\text{La distance parcourue par le composé (mesuré au centre de la tache)}}{\text{La distance parcourue par le front du solvant}}$$

RESULTATS

D'après les résultats obtenus, nous remarquons la présence de flavonoïdes, de tanins, de stérols et de triterpènes en quantités importantes. Nous avons aussi noté la présence de coumarines, de quinones libres, de saponosides et de composés réducteurs. Le solvant eau/acétone a montré une meilleure extraction avec une quantité plus grande des différentes familles chimiques, par rapport aux autres solvants. Nous observons aussi l'absence d'alcaloïdes et de terpénoïdes dans nos extraits (Tableau 1).

Tableau 1. Résultats des tests phytochimiques.

Familles chimiques	Aqueux	Hydrométhanolique	Hydroacétonique
Alcaloïdes	-	-	-
Flavonoïdes	+	++	+
Tanins	+	+	+
Coumarines	+	+	+
Quinones libres	+	+	+
Stérols et triterpènes	++	++	++
Terpénoïdes	-	-	-
Saponosides	+	-	+
Glycosides	+	++	++
Composés réducteurs	+	+	+

(+++): Fortement présent ; (++) : Moyennement présent ; (+) : Faiblement présent ; (-) : test négatif

Pour l'analyse quantitative des polyphénols par CCM, les valeurs des IRF et les fluorescences des spots ont été délimitées sous la lampe UV à 254-

365 nm, les fluorescences et les valeurs d'IRF sont mentionnées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Les valeurs des IRF et les fluorescences des spots.

		RF					
		RF 1	RF 2	RF 3	RF 4	RF 5	RF 6
Var	Chemlal	0,28 Violet	0,35 Jaune	0,42 Bleu	0,60 Marron	0,64 Noir	0,71 Jaune pâle

DISCUSSION

La présence de flavonoïdes, de tanins, de stérols, de triterpènes, de coumarines, de quinones libres, de saponosides et de composés réducteurs est confirmée par les résultats de (Kaskoos, 2013) et (Nahal Boudierba *et al.*, 2012), mais ces dernières ont mentionné l'absence de tanins.

Les tests chromatographiques, effectués sur les extraits des feuilles, nous a permis d'avoir une idée sur les formes flavoniques présentes dans les feuilles d'olivier.

Les IRF et la fluorescence sous lampe UV sont corrélés à la structure des flavonoïdes, et on les utilise comme indicateurs primaires pour l'identification (Mabry *et al.*, 1970 ; Feng *et al.*, 1988).

En effet, il existe une relation étroite entre la fluorescence du composé, sa nature et son mode de substitution. Le Tableau 3, résume la relation entre les couleurs et les spots des flavonoïdes et leurs structures.

Dans cette étude nous avons obtenus 7 types de flavonoïdes parmi lesquels : Flavonols, Flavones, Chalcones, Dihydroflavonols, Flavanones Dihydroflavonols, Isoflavones.

Brahmi *et al.* (2013) ont réalisé des dosages quantitatifs de l'extrait méthanolique des feuilles de l'olivier de deux variétés chemlal et nebjmel en Tunisie, ils ont montré que la teneur en polyphénols totaux des feuilles de chemlal est plus élevée que la variété de nebjmel. Arab *et al.* (2013) Confirment la présence de flavonoïdes et de polyphénols. Certains auteurs ont recherché les teneurs en polyphénols totaux de l'olivier montrant

que les feuilles d'olivier sont plus riches en composés phénoliques bioactifs en comparaison à

l'huile d'olive et aux fruits (Caponio *et al.*, 2001; Lelas *et al.*, 2011).

Tableau 3. Relation entre la fluorescence sous UV et la structure des flavonoïdes (Lahouel, 2005).

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir, Marron	Flavonols 5, 6, 7 tris-OH libres Flavonols 5, 7, 8 tris-OH libres Flavones 5 – OH et 4' –OH Flavones 3– OR et 5 –OH, 4' –OH
Violet	Flavones ou Flavonols 5 – OH avec 4' –OH absent ou substitué en 3. Flavones 6 – ou 8 –OH Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols, flavanones.
Bleu- clair (fluorescent)	Flavones sans 5 – OH libres.
jaune	Flavonols sans 5 – OH libres avec 3 –OH substitué
Jaune Fluorescent	Flavonols 3- OH libres avec ou sans 5 –OH substitué.
Jaune pâle	Dihydroflavonols

CONCLUSION

Les résultats de l'analyse phytochimique qualitative ont mis en évidence la présence de flavonoïdes, de tanins et de stérols en quantités importantes. Ils ont montré aussi la présence de coumarines, de quinones libres, de terpénoïdes, de saponosides et de composés réducteurs. Cependant, les alcaloïdes et les triterpènes ont été absents dans nos trois extraits. L'analyse quantitative des extraits, a montré la présence de sept types de flavonoïdes (Flavonols, Flavones, Chalcones, Dihydroflavonols, Flavanones Dihydroflavonols, Isoflavones).

REFERENCES

Arab K., Bouchenak O., Yahiaoui K. 2013. Évaluation de l'activité biologique des feuilles de l'olivier sauvage et cultivé. *Afrique Science*. 9 : 159-166.

Brahmi F., Mechri B., Dhibi M., Hammami M. 2013. Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial Crops and Products*. 49: 256-264.

Bruneton J. 1999. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, (3e édition). 1120 p.

Cai L.Y., Shi F.X., Gao X. 2011. Preliminary phytochemical analysis of *Acanthopanax trifoliatum* (L.) Merr. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 : 4059–4064.

Caponio F., Gomes T., Pasqualone A. 2001. Phenolic compounds in virgin olive oils: influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life. *European Food Research and Technology*. 212: 329-333.

Edeoga H.O., Okwu D.E., Mbaebie B.O. 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*. 4: 685-688.

Feng Y., Donald C.E.MC., Vick B.A. (1988). C-glycosyl flavones from hard red spring wheat bran. *Cereal chemistry*. 65: 452-456.

Karumi Y., Onyeyili P.A., Ogunbaja V.O. 2004. Identification of active principles of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *Journal of Medical Sciences*. 4: 179-182.

Kaskoos R.A. 2013. Pharmacognostic Specifications of leaves of *Olea europaea* Collected from Iraq. *American journal of phytomedicine and clinical Therapeutics*. 2: 153-160.

Khan A.M., Qureshi R.A., Ullah F., Gilani S.A., Nosheen A., Sahreen S. 2011. Phytochemical analysis of selected medicinal plants of Margalla Hills and surroundings. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5 : 6017-6023.

Lagnika L. 2006. Etude Phytochimique et Activité Antipaludique de Substances Naturelles issues de Plantes Béninoises. Thèse de Doctorat Université. Louis Pasteur de Strasbourg/Université d'Abomey-calavi, Bénin.

Lahouel M. 2005. Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'appose induite par certains médicaments anticancéreux, Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.

Lelas S., Athanasiadis V., Gortzi O., Bounitsi M., Giovanoudis I. 2011. Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*. 127: 1521-1525.

Mabry J.T., Markham K.L., Thomas M.B. 1970. Systematic Identification of Flavonoids, Springer-verlag: New York, P 102: 165: 309: 335

Majob F., Kamalinejab M., Ghaderi N., Vahidipour H.R. 2003. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 77-82.

N'Guessan K., Kadja B., Zirihi G., Traoré D., Aké-Assi L. 2009. Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays

- Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Science & Nature*. 6 : 1-15.
- Nahal Boudarba N., Kadi H., Mohgtet S., Meddah B., Moussaoui A. 2012. Antibacterial Activity and Phutochemical Screening of *Olea Europaea* Leaves from Algeria. The open conference proccedngs journal ,3,(suppl 1- M 11). Pp 66-69.
- Oloyede O.I. 2005. Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan Journal of Nutrition*. 4: 379-381.
- Yu L., Haley S., Perret J., Harris M. 2002. Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. *Food Chemistry*. 78: 457-461.