



Société Algérienne de Nutrition

Nutr.Santé, 2014, Vol. 03 N° 01, 1-50

# Nutrition & Santé

## Editorial

La nutrition des 1000 premiers jours de la vie pour une bonne santé future

*Malika BOUCHENAK*

1

## Physiopathologie

État actuel du diagnostic de la maladie coeliaque chez les enfants et les adolescents dans l'Ouest algérien

*Mimouna BESSAHRAOUI, Karim BOUZIANE-NEDJADI, Malika NACEUR, Sakina NIAR, Amel ZENNAKI, Hayet AICHAOUI, Ghazalia BOUDRAA, Mahmoud TOUHAMI*

3

## Composés bioactifs

Effets hypoglycémians des peptides bioactifs d'origine alimentaire

*Naourez KTARI, Najiba ZEGHAL, Moncef NASRI*

10

Les grignons d'olives réduisent la cholestérolémie et la triglycéridémie et atténuent la peroxydation lipidique sérique chez le rat consommant un régime enrichi en cholestérol

*Sherazede BOUDERBALA, Adila OUGOUAG, Jihane BENMANSOUR, Khiera MADOU, Mohammed KN. AL-HITI, Malika BOUCHENAK*

23

Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*

*Ali BOUGUERRA, Louiza HIMED, Malika BARKAT*

33

L'extrait des feuilles d'*Olea europaea* et de l'allopurinol atténue le stress oxydatif du foie des rats induit par l'oxonate

*Nesrine GDOURA, Imen GHORBEL, Jean-Claude MURAT, Khansa CHAABOUNI, Fatma MAKNI-AYEDI, Abdelfattah EL FEKI*

40



# Les missions



PROMOUVOIR LA NUTRITION DANS TOUS LES DOMAINES D'APPLICATION

santé, agronomie, agro-alimentaire, biotechnologies, environnement

CRÉER ET DÉVELOPPER DES LIENS ENTRE LA RECHERCHE FONDAMENTALE ET LA RECHERCHE APPLIQUÉE

ainsi qu'avec les secteurs d'application pratique, administrative et institutionnelle et la population

ORGANISER OU SOUTENIR DES ACTIONS DE FORMATION, D'INFORMATION ET DE VULGARISATION DANS LES DOMAINES DE LA NUTRITION,

en prenant en compte les priorités de Santé Publique

ORGANISER UNE OU PLUSIEURS RÉUNIONS SCIENTIFIQUES PAR AN

seule ou en collaboration avec d'autres associations et organismes

SUSCITER DES TRAVAUX D'EXPERTISE COLLECTIVE

ENCOURAGER ET DIFFUSER LES INFORMATIONS ET TRAVAUX SCIENTIFIQUES

notamment par la création d'une revue

ASSURER UNE REPRÉSENTATION DES DOMAINES DE LA NUTRITION

auprès des instances nationales et internationales

TRAVAILLER AVEC TOUTES LES INSTITUTIONS ET DÉPARTEMENTS MINISTÉRIELS INTÉRESSÉS PAR NOS OBJECTIFS

pour organiser au mieux les actions et activités en nutrition

## Le bureau de la SAN

### Présidente

Malika BOUCHENAK

### Vice-Président

Elhadjahmed KOCEIR

Djamel Eddine MEKHANCHA

### Secrétaire générale

Khedidja MEKKI

### Secrétaire ADJOINT

Djamil KROUF

### Trésorier

Ahmed BOUALGA

### Trésorier adjoint

Myriem LAMRI-SENHADJI

### Membres assesseurs

Souhila AOUICHAT-BOUGUERRA

Said AZZOUG

Mohamed BENALI

Abbou KADDOUS

Ali RIAZI

Faiza ZERDOUMI

Khaled KARA MOSTEFA

## Directeur de la publication

Société Algérienne de Nutrition

## Comité d'édition

### Présidente du comité

Malika BOUCHENAK

### Rédactrice en chef

Myriem LAMRI-SENHADJI

### Secrétaire de rédaction

Khedidja MEKKI

### Membres

Souhila AOUICHET-BOUGUERRA

Douja SENOUCI-TALEB

## Comité scientifique de la revue

### Président

Jacques BELLEVILLE, U. Dijon

### Membres

Souhila AOUICHET-BOUGUERRA, USTHB

Saïd AZZOUG, CHU Alger

Mohamed BENALI, U. Sidi Bel Abbès

Malika BOUCHENAK, U. Oran

Karim BOUZIANE NEDJADI, CHU Oran

Djamil KROUF, U. Oran

Marie-Aleth LACAÏLLE-DUBOIS, U. Dijon

Denis LAIRON, CHU Marseille

Myriem LAMRI-SENHADJI, U. Oran

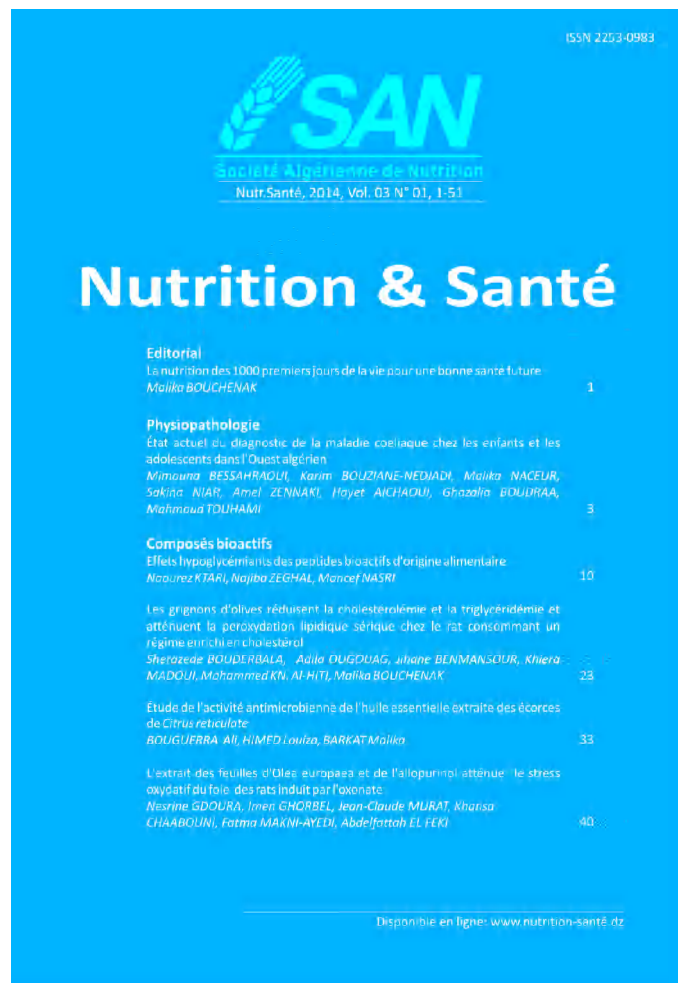
Ascencion MARCOS, Madrid, Espagne

Corinne MEKHANCHA-DAHEL, U. Constantine

Khedidja MEKKI, U. Oran

Moncef NASRI, Sfax, Tunisie

Ali RIAZI, U. Mostaganem



# SOMMAIRE

## Editorial

La nutrition des 1000 premiers jours de la vie pour une bonne santé future  
*Malika BOUCHENAK*..... 1

## Physiopathologie

État actuel du diagnostic de la maladie coeliaque chez les enfants et les adolescents dans l'Ouest algérien  
*Mimouna BESSAHRAOUI, Karim BOUZIANE-NEDJADI, Malika NACEUR, Sakina NIAR, Amel ZENNAKI, Hayet AICHAOUI, Ghazalia BOUDRAA, Mahmoud TOUHAMI* ..... 3

## Composés bioactifs

Effets hypoglycémisants des peptides bioactifs d'origine alimentaire  
*Naourez KTARI, Najiba ZEGHAL, Moncef NASRI*..... 10

Les grignons d'olives réduisent la cholestérolémie et la triglycéridémie et atténuent la peroxydation lipidique sérique chez le rat consommant un régime enrichi en cholestérol  
*Sherazede BOUDERBALA, Adila OUGOUAG, Jihane BENMANSOUR, Khiera MADOU, Mohammed KN. Al-HITI, Malika BOUCHENAK* ..... 23

Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*  
*Ali BOUGUERRA, Louiza HIMED, Malika BARKAT*..... 32

L'extrait des feuilles d'*Olea europaea* et de l'allopurinol atténue le stress oxydatif du foie des rats induit par l'oxonate  
*Nesrine GDOURA, Imen GHORBEL, Jean-Claude MURAT, Khansa CHAABOUNI, Fatma MAKNI-AYEDI, Abdelfattah EL FEKI*..... 40

# CONTENTS

## Editorial

Nutrition during the first 1000 days of life for a long term healthy effect <i>Malika BOUCHENAK</i> .....	1
--	---

## Physiopathology

Current status of celiac disease diagnosis in children and adolescents in West Algeria <i>Mimouna BESSAHRAOUI, Karim BOUZIANE-NEDJADI, Malika NACEUR, Sakina NIAR, Amel ZENNAKI, Hayet AICHAOUI, Ghazalia BOUDRAA, Mahmoud TOUHAMI</i> .....	3
---	---

## Bioactive components

Hypoglycemic effects of bioactive peptides from dietary origin <i>Naourez KTARI, Najiba ZEGHAL, Moncef NASRI</i> .....	10
---	----

Olives cake reduces cholesterolemia and triglyceridemia and attenuates serum lipid peroxidation in rats fed cholesterol-enriched diet <i>Sherazede BOUDERBALA, Adila OUGOUAG, Jihane BENMANSOUR, Khiera MADOUJ, Mohammed KN. Al-HITI, Malika BOUCHENAK</i> .....	23
---	----

Antimicrobial activity of essential oil extracted from <i>Citrus reticulata</i> peels <i>Ali BOUGUERRA, Louiza HIMED, Malika BARKAT</i> .....	32
--	----

Olea europaea leave extracts and allopurinol alleviate oxidative stress in liver rats induced by oxonate <i>Nesrine GDOURA, Imen GHORBEL, Jean-Claude MURAT, Khansa CHAABOUNI, Fatma MAKNI-AYEDI, Abdelfattah EL FEKI</i> .....	40
--	----

# Société Algérienne de Nutrition

## 1<sup>ère</sup> Journée Nationale JN-SAN 2014



Oran, le 16 octobre 2014

Date limite de soumission des résumés : **30 avril 2014**,  
à l'adresse e-mail : [jn-nutrition@san-dz.org](mailto:jn-nutrition@san-dz.org)  
Date de notification : **30 mai 2014**.  
Date limite d'inscription : **30 juin 2014**.  
Vous trouverez toutes les informations sur le site  
de la SAN [www.san-dz.org](http://www.san-dz.org)



### EXPOSITION & PARTENARIAT

Si vous souhaitez participer en tant que sponsor et/ou exposant, si vous souhaitez organiser un symposium, la SAN est à votre écoute, e-mail : [jn-nutrition@son-dz.org](mailto:jn-nutrition@son-dz.org)





## Editorial

### **La nutrition des 1000 premiers jours de la vie pour une bonne santé future**

#### Nutrition during the first 1000 days of life for a long term healthy effect

Les 1000 premiers jours de la vie est une période critique de croissance et de développement, où la nutrition joue un rôle vital. Les 1000 premiers jours s'étendent du début de la grossesse (270 jours) jusqu'à l'âge de deux ans (730 jours).

La nutrition, y compris la nutrition maternelle et fœtale ainsi que la nutrition infantile, peuvent avoir des conséquences à long terme sur la santé. Il est bien évident actuellement que le rythme et la voie de croissance précoce représente un facteur de risque majeur pour le développement de maladies coronariennes et du diabète de type 2, prédisposant ainsi aux maladies cardio-vasculaires. Compte tenu de l'impact économique énorme sur les sociétés, d'importants travaux de recherche sont justifiées pour explorer les mécanismes et les effets de la programmation nutritionnelle précoce sur la santé à long terme.

Des experts du monde entier ont réuni leurs efforts pour mener à bien un programme de recherche sur l'étude des mécanismes sous-jacents de la programmation de la nutrition précoce et des approches pratiques appropriées pour la prévention du surpoids et des risques associés précocement. Ce projet vise à identifier les périodes sensibles de susceptibilité aux signaux métaboliques. En effet, la programmation métabolique décrit comment l'état nutritionnel des enfants avant et peu après la naissance influe sur la probabilité du sujet à l'embonpoint plus tard dans la vie. Il a été noté que le gain de poids, dans les 2 premières années de la vie, est influencé par les facteurs génétiques de l'individu et de sa mère, le grand poids de naissance, les influences métaboliques durant la grossesse, les facteurs de santé et de pathologies, tels que la survenue d'infections, et non pas seulement l'alimentation et la supplémentation en nutriments.

Bien que la sous-nutrition chez les femmes et les enfants soit fréquente dans les pays en développement, la coexistence de la surnutrition dans les mêmes populations, en particulier chez les adultes, est également bien connue (OMS, 2010). Ce « double fardeau » de la sous-nutrition et de l'obésité est de plus en plus reconnu dans les pays en développement et l'incidence la plus élevée a été observée chez les familles les plus pauvres.

Les enfants ont un risque plus élevé de devenir obèse plus tard dans la vie. D'autre part, plus de 10% de la population féminine mondiale, en âge de procréer, est sous-alimentée (IMC < 18,5), ce qui est un facteur de risque pour la génération suivante.

La malnutrition maternelle peut entraîner une programmation (épigénétique) défavorable des gènes du fœtus, ayant ainsi des conséquences à long terme.

L'obésité et la sous-nutrition infantile ont souvent leurs origines dans la période fœtale, d'où la nécessité d'intervenir idéalement avant ou pendant la grossesse. En effet, des programmes de réduction de poids chez les femmes en surpoids /obèses peuvent avoir comme résultats une prise de poids faible pendant la grossesse, une prévalence réduite du diabète gestationnel et une diminution de la macrosomie. Par ailleurs, la supplémentation en micronutriments dans l'insuffisance pondérale des jeunes femmes réduit le pourcentage de nouveau-nés de faible poids de naissance de 11%. De plus, la supplémentation concomitante en micronutriments et en protéines/calories est encore plus efficace avec une réduction du risque de faible poids de naissance de 34%. Aussi, l'adhérence, au début de la grossesse, à un régime proche du type Méditerranéen (apports plus élevés de fruits, légumes, huile végétale, poisson, pâtes et riz, combinés à des apports plus faibles de viande, pommes de terre et sauces grasses) semble être associé positivement à l'acide folique sérique et la vit. B12 plasmatique et négativement à l'homocystéine et la CRP, alors qu'une faible adhérence à ce régime entraîne une masse placentaire réduite et un faible poids de naissance.

En ce qui concerne la nutrition infantile, dans certains pays développés, le surpoids/obésité pendant l'enfance et l'adolescence affecte désormais plus de 25% des populations respectives. Les nourrissons ayant un gain de poids rapide après la naissance ont un risque accru de devenir obèse plus tard dans la vie. Si les mères sont en surpoids/obèses, leurs nourrissons allaités prennent du poids plus rapidement au cours des 6 premiers mois, comparé aux standards de l'OMS. D'autre part, les nourrissons de mères obèses prennent moins de poids si l'allaitement se poursuit au-delà

de 6 mois par rapport aux nourrissons nourris avec des formules telles que définies par le Codex Alimentarius. Des études récentes ont indiqué qu'une formule à faible teneur en protéines, entre 3 et 12 mois pour les nourrissons de mères en surpoids/obèses, entraîne un gain de poids similaire à celui observé chez les nourrissons allaités au sein.

Comparé à d'autres modèles d'alimentation, l'allaitement maternel exclusif jusqu'à 6 mois est associé à un poids significativement plus élevée et une plus faible probabilité de retard de croissance et d'infections.

Parmi les expériences alimentaires précoces, celles liées à l'alimentation lactée, que ce soit l'allaitement maternel ou l'allaitement artificiel, peuvent avoir d'importantes répercussions sur l'acceptation du goût, qui est l'un des principaux déterminants de la consommation alimentaire chez les enfants. En effet, par rapport à une formule lactée, l'exposition au lait maternel peut donner des résultats de différence sensorielle en termes d'arôme et de goût. En ce qui concerne l'arôme, certains composés volatils provenant des aliments ingérés par la mère sont susceptibles d'être transmis dans son lait. En effet, le lait maternel peut supporter un composant de saveurs distinctes qui sont susceptibles d'avoir un impact sur le comportement des enfants à l'âge de l'alimentation complémentaire, comme démontré dans plusieurs études. En ce qui concerne le goût, le lait maternel contient des composés qui portent un goût, tels que le lactose (goût sucré), le glutamate (goût umami), Na (goût salé) et urée (goût amer). Leur concentration dans le lait maternel est différente de celle des préparations pour nourrissons : la concentration de glutamate peut être jusqu'à 14-fois plus élevée et celle de Na est 2- à 4-fois plus faible.

En conclusion, des interventions concertées à grande échelle portant sur la 'malnutrition sous toutes ses formes' sont à prendre en considération, et devraient mettre l'accent sur les conditions de vie et une alimentation équilibrée et appropriée, en particulier au cours des 1000 premiers jours de la vie.

Malika BOUCHENAK (Présidente de la SAN)  
BOUCHENAK.Malika@san-dz.org





## Physiopathologie

### Current status of celiac disease diagnosis in children and adolescents in West Algeria

État actuel du diagnostic de la maladie cœliaque chez les enfants et les adolescents dans l'Ouest algérien

Mimouna BESSAHRAOUI<sup>1</sup>, Karim BOUZIANE-NEDJADI, Malika NACEUR, Sakina NIAR, Amel ZENNAKI, Hayet AICHAOUI, Ghazalia BOUDRAA, Mahmoud TOUHAMI

Department of Pediatrics « C » CHU Oran, Algeria

Received 22<sup>th</sup> december 2013, accepted 8<sup>th</sup> may 2014

<sup>1</sup>Corresponding author: Mimouna.bessahraoui@yahoo.fr

**Abstract Introduction.** The celiac disease is an autoimmune chronic inflammatory enteropathy caused by the gluten gliadin, a food antigen. **Objective.** To determine whether the epidemiology and the clinical presentation of celiac disease (CD) have changed during the last 30 years in children and adolescents in west Algeria. **Subjects and methods.** This was a retrospective analysis of all CD subjects listed in the regional reference center, the Department of Pediatrics « C » CHU Oran. Cases were enrolled in the whole west Algeria, from 1978 to December 31<sup>th</sup> 2010. The analyses focused on the study of clinical records. Only subjects who developed CD clinical and histological signs with a positive response to gluten-free diet were considered. **Results.** CD patients (4476 (2076 male and 2400 female, sex ratio 0.86) were identified. The evolution of CD incidence showed that the number of cases increased gradually since 1980 to 200 cases per year from 1990 to 1997, with peaks around 230 in 1990, 1993 and 1997, then stabilized at around 88 cases per year from 2006 to 2010. Although the mean age at introduction of gluten in the diet and the mean duration of breast feeding have not changed over the past 30 years, an increase in the mean age was noted at first symptoms and at diagnosis. Diarrhea remained the main symptom at diagnosis, its frequency was estimated at 86% until December 31<sup>th</sup> 2008, but non-diarrheal presentations were increased in recent years. **Conclusion.** A change in the clinical profile of CD was noted in the last decade, probably related to environmental factors still unidentified in our context.

**Keywords:** *Celiac disease, Gluten-free diet, Risk factors*

**Résumé Introduction.** La maladie cœliaque est une entéropathie inflammatoire chronique auto-immune provoquée par la gliadine du gluten, un antigène alimentaire. **Objectif.** Déterminer si l'épidémiologie et la présentation clinique de la maladie cœliaque (MC) ont changé au cours de ces 30 dernières années chez les enfants et les adolescents dans l'ouest algérien. **Sujets et méthodes.** Une analyse rétrospective sur l'ensemble des sujets MC répertoriés au service de Pédiatrie « C » CHU Oran, provenant de tout l'Ouest algérien, de 1978 au 31 décembre 2010, a porté sur l'étude des dossiers cliniques. Tous les sujets ayant présenté des signes cliniques et /ou histologiques d'une MC, avec une réponse positive au régime sans gluten ont été retenus. **Résultats.** Des patients MC (n=4476 dont 2076 garçons et 2400 filles, sex-ratio de 0,86) ont été répertoriés. L'évolution du nombre de sujets MC recrutés dans le service a montré que le nombre de cas MC recrutés a augmenté progressivement pour atteindre 200 cas par an en moyenne de 1990 à 1997, avec des pics autour de 230 en 1990, 1993 et 1997, puis une stabilité autour de 88 cas par an de 2006 à 2010. Bien que l'âge moyen à l'introduction du gluten dans l'alimentation ainsi que la durée moyenne de l'allaitement maternel, n'ont pas changé durant ces 30 dernières années, une augmentation de l'âge moyen a été constaté au début des troubles et au diagnostic. La diarrhée reste le maître symptôme au diagnostic, sa prévalence est évaluée à 86 % au 31 décembre 2008. Par contre, les formes non diarrhéiques sont de plus en plus fréquentes ces dernières années. **Conclusion.** Un changement de la physionomie de la MC a été noté cette dernière décennie, probablement lié à des facteurs environnementaux non encore identifiés dans notre contexte.

**Mot-clés:** *Maladie cœliaque, Régime sans gluten, Facteurs de risque*

## Introduction

Celiac disease (CD) is a chronic, immunologically determined form of enteropathy affecting the small intestine in genetically predisposed children and adults [1]. The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) has produced new guidelines for the celiac disease diagnosis. Only children with symptoms or suggestive signs of CD are to be considered. The diagnosis of CD depends on gluten-dependent symptoms, CD-specific antibody levels, the presence of HLA-DQ2 and/or HLA-DQ8, and characteristic histological changes (villous atrophy and crypt hyperplasia) in the duodenal biopsy [2]. The

clinical spectrum of CD has widened over the past decades, and clinical pattern and age at diagnosis of CD are still changing in children. Several investigators in recent decades have reported a decreasing prevalence of the classic celiac triad—failure to thrive, diarrhea, and abdominal distension—in children with CD [3,4]. The overall decrease in the prevalence of diarrheal presentations over the past 2 decades, accompanied by an increase in extra-intestinal symptoms manifestations of the disease [5,6], probably explained the older age at diagnosis. Indeed, children presenting typical symptoms were always younger, and their median age at diagnosis remained similar throughout the 20 years.

More widespread use of serologic markers has facilitated the diagnosis of celiac disease in children. This fact alone did not entirely explain the decrease

in diarrheal manifestations, as many long-term studies in adult and pediatric patients predating the use of these markers have documented this shift in clinical presentation [7,8].

The objective of this study was to determine whether the epidemiology and the clinical presentation of celiac disease have changed during the last 30 years in children and adolescents in west Algeria.

## Subjects and methods

### Subjects

This was a retrospective analysis of cases recruited from 1978 up to December 31th 2010: all the CD subjects diagnosed at the Department of Pediatrics « C » CHU Oran were considered. The latter being considered the referral center for care of CD children from west Algeria. The west of Algeria is bordered by the Mediterranean Sea in the north, Mauritania, West Sahara and Mali in the south Region which extends over an area of 2 114 km<sup>2</sup>. Oran province is located in the north-west of Algeria and its population is 1.584.607. The new cases came from all the West of Algeria for consulting units primary care, pediatric offices of Oran province, and Pediatric Hospital of Oran. All the patients were followed by the Department of Pediatrics « C » CHU Oran. Oran register was used

to retrieve the data. In 1978, a prospective incidence register was established in Oran province. The register enables a continuous epidemiological surveillance of celiac disease children.

### Methods

The analysis focused on the study of clinical records, namely, the demographic characteristics, the age at first symptoms, the breastfeeding duration, symptoms leading to the diagnosis, the age at introduction of gluten, the results of the intestinal biopsy and the starting date of gluten-free diet. In our study, the diagnosis of CD was performed according to the ESPGHAN criteria published in 1970. Marsh-Oberhuber classification was used to classify the intensity of mucosal damage. All the patients had villous atrophy. A positive response to gluten-free diet was evaluated by the disappearance of clinical signs and histological improvement.

### Statistical analysis

The comparison of two means was made by the t-test, while the comparison of percentages was made by Chi-square test using EXCEL software. Not normally distributed data were compared by Wilcoxon rank sum test. Results were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

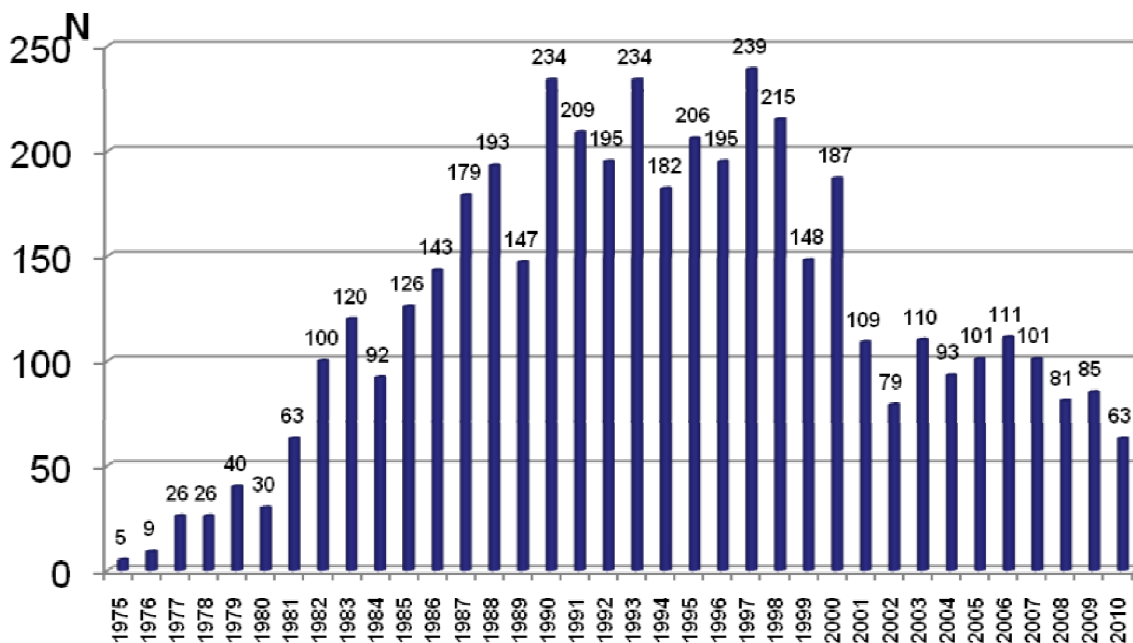


Fig. 1. Evolution of celiac disease number recruited in our department since 1975 to december 31th 2010 (n = 4476)

## Results

Until December 31<sup>th</sup> 2010, 4476 CD patients were identified, (female/male, 2400/2076; sex ratio 0.86. Fifty eight % of them were from the Department of Pediatrics « C » CHU Oran . The consanguinity rate (specified in 3044 of the subjects) was of 26%. The number of CD subjects recruited in our Department showed a gradual increase from about 30 cases in 1980 to 200 cases per year from 1990 to 1997, with peaks around 230 in 1990, 1993 and 1997, then lowered to about 88

cases per year from 2002 to 2010 (Fig. 1).

In addition, analysis of age evolution at diagnosis compared to that at gluten introduction and duration of breastfeeding showed that the mean age at introduction of gluten ( $5.9 \pm 4.5$  months) in the diet as well as the mean duration of breastfeeding ( $4.8 \pm 6.6$  months) did not change over the past 30 years 1979-2008 and the mean age at first symptoms raised from a average of 20 months in the period 1979-1983 to an average of 28 months in the period 2004-2008 (Fig.2).

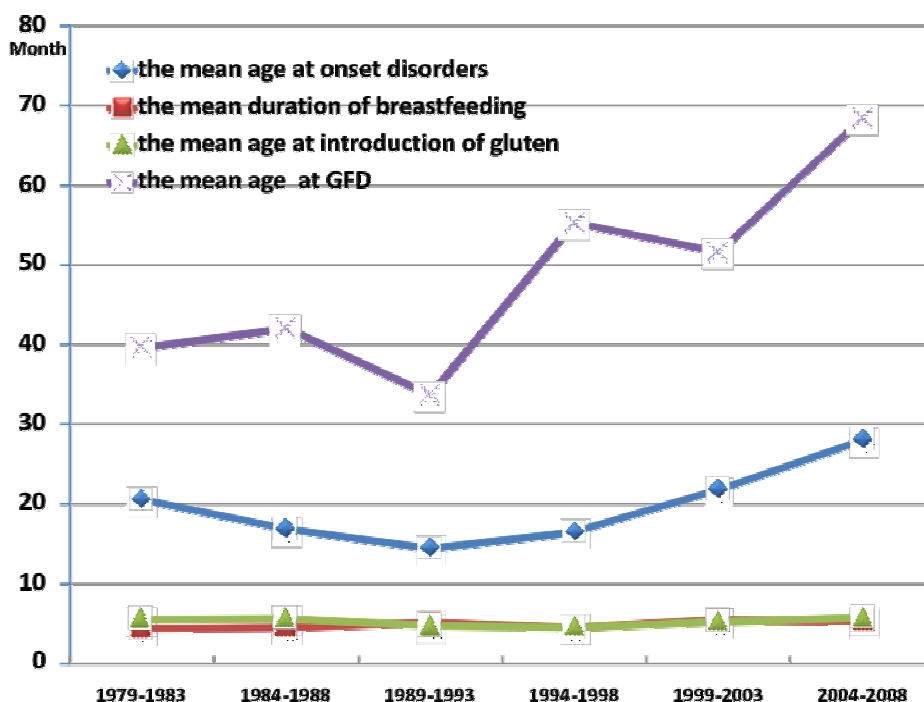


Fig. 2. Evolution of the mean age at GFD (n = 4262), at the introduction of gluten (n= 3355), at onset of disorders (n= 3127) and the mean duration of breastfeeding (n= 3426)

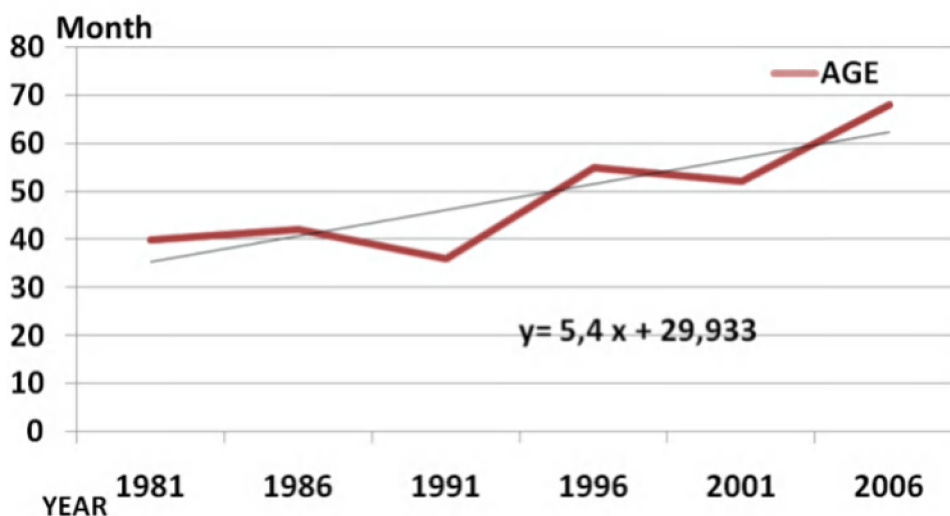


Fig. 3. Evolution of age at Gluten Free Diet

The GFD age enhanced from a mean of 40 months in the 80ties to 70 months in 2008. A linear function fitted to the observed data (Fig. 3) showed that at every 5 years, there was an increase of 5.4 months for the age at GFD, indeed, there was an overall increase of about one month more each year from the 80 ties to the 2008. Moreover, the difference between the age at GFD (e.g. the age at diagnosis) and the age at onset of disorders moved

with an increasing trend, exactly parallel to the age at GFD, from an average of 20-25 months before 1988 to an average of 30-40 months after 1999. Also, the pattern of the age evolution at diagnosis of new cases according to age classes is presented in Fig. 4. The age-group 10-15 years increased from 10% in the five year period 1979-1983 to 21.4% in 2004-2008 ( $p = 0.2$ ) (Fig. 4).

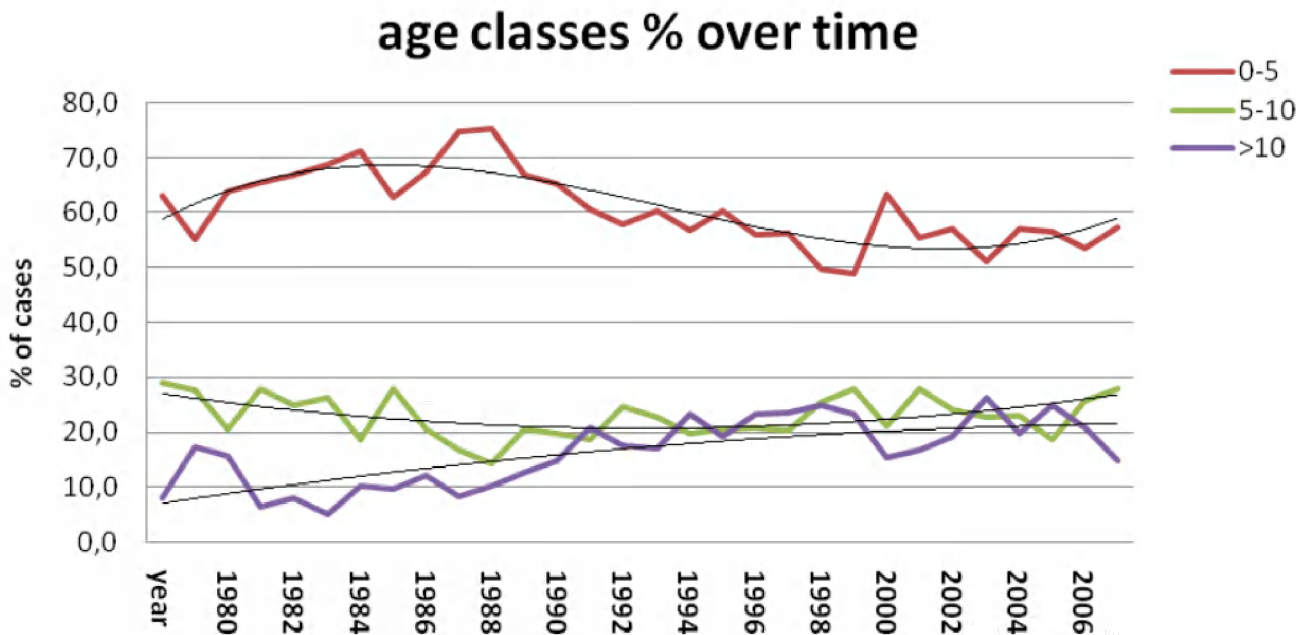


Fig. 4. Evolution of the age at GFD according to age classes (n = 4262) from 1979 to 2008. A 2nd degree polynomial function was fitted to the observed data.

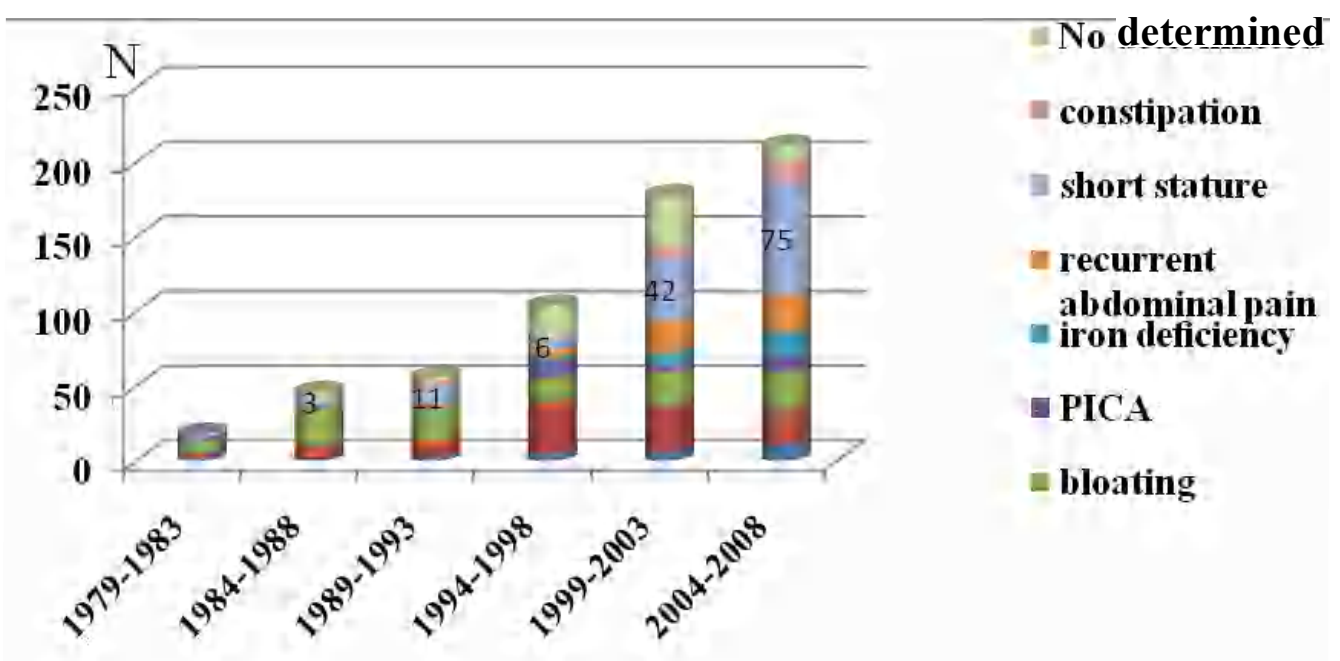


Fig. 5: Atypical presentations of celiac disease in children and adolescents

Regarding the symptoms at presentation, diarrhea was the main symptom, its prevalence was estimated at 86% until December 31<sup>st</sup> 2008 among 3056 cases. The diarrhea frequency decreased from 94% in the period 1979-1983 to 72% in 2004-2008 ( $p < 0.001$ ). Currently, there was a general trend to delayed onset of symptomatic CD. These children had a tendency to experience unusual intestinal complaints (e.g. recurrent abdominal pain, nausea, vomiting, bloating, and constipation) or extra-intestinal manifestations (e.g. short stature, iron deficiency (Fig. 5).

## Discussion

The analysis focused on 4476 CD patients listed in the Department of Pediatrics "C" CHU Oran since 1975 until December 31<sup>st</sup> 2010. The high number of these patients were diagnosed before 2000, with annual peaks around 230 in 1990, 1993 and 1997. Then the number of CD cases stabilized around 88 cases per year from 2006 to 2010. This decrease could probably not be explained by the fact that a number of patients might have escaped our records since our data were crossed with those of the pediatric offices in Oran and we could not find any other source of diagnosis.

In our cohort, the changes in the age at introduction of gluten in the diet and in the duration of breastfeeding were not observed over the past 30 years. Despite the unchanged pattern of nutritional risk factors, we noted either a decreased incidence as well as a rise of the age at diagnosis, and some changes in the symptoms. An epidemiological study from Sweden [9] suggested that the introduction of small amounts of gluten during breastfeeding protected infants against the risk to develop CD. Conversely, the absence of breastfeeding and the early introduction of gluten were proposed as the cause of the Swedish epidemic. These both latter arguments seemed to be the most important risk factors in subjects genetically predisposed. In our context, we were not able to examine the amount of gluten introduced in our patients, but there was any modification in the

infant feeding practices over the last 30 years.

It would therefore appear that there are other environmental factors, as age at gluten introduction and breastfeeding which can influence the changing phenotype.

In this study, an increase in the average age at diagnosis was found. In particular, a progressive decrease in the mean age at diagnosis until 1993, then an increase from 2.8 years during the 1989-1993, 5-year period to 5.5 years in 2004-2008. The diagnosis of CD was progressively delayed. The mean age at onset of digestive disorders increased from 20 months (1979-1983) to 28 months between 2004 and 2008. Our data are supported by those of Vella [10], who reported that the median age at diagnosis of CD increased from 14 months in the 1985-1989 period to 48 months during 1995-1999 period.

For over 30 years, CD patients treated in our department were essentially the classical gastrointestinal forms characterized by diarrhea. However, the frequency of diarrhea decreased from 90% during 1979-1983 to 70% in 2004-2008. These data were comparable to those found in the literature [11-17]. Maki [18] reported a regression of the classic form that was present in less than 50% of newly diagnosed patients. This result was also described by Green [15]: 73% were of classical forms before 1993 vs 43% after 1993. Murray [19] in the USA also noted that the prevalence of diarrhea changed from 100% of cases during the period 1950-1996 to 54% of cases during 2000-2001.

## Conclusion

The evolution of CD incidence show that the new cases number gradually increases since 1980 to 200 cases per year from 1990 to 1997, then remains stable at around 88 cases per year from 2006 to 2010. The clinical spectrum of CD has widened over the last decades. Diarrhea remains the main symptom at diagnosis, its frequency is estimated at 86% until december 31<sup>st</sup> 2008, but non-diarrheal presentations are increased in recent years.

Clinical pattern and age at diagnosis of CD are still changing in our children, probably related to environmental factors unidentified in our context.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests in preparing this article.

## Références

- Bai JC, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, Catassi C, *et al.* World Gastroenterology Organisation global guidelines on celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 2013; 47:121-6.
- Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R *et al.* European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012 Jan;54(1):136-60.
- Steens RF, Csizmadia CG, George EK, Ninaber MK, Hira Sing RA, Mearin ML. A national prospective study on childhood celiac disease in the Netherlands 1993–2000: an increasing recognition and a changing clinical picture. *J Pediatr* 2006;147:239–43.
- Fasano A. Clinical presentation of celiac disease in the pediatric population. *Gastroenterology* 2006;128:68–73.
- Telega G, Bennet TR, Werlin S. Emerging new clinical patterns in the presentation of celiac disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2008; 162(2): 164–8.
- McGowan KE, Castiglione DA, Butzner JD. The changing face of childhood celiac disease in north america: impact of serological testing. *Pediatrics* 2009;124(6):1572–8.
- Rampertab SD, Pooran N, Brar P, *et al.* Trends in the presentation of celiac disease. *Am J Med* 2006;119(4):355.e9–355.e14.
- Garampazzi A, Rapa A, Mura S, Capelli A, Valori A, Boldorini R, Oderda G. Clinical pattern of celiac disease is still changing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45(5): 611–4.
- Ivarsson A, Myléus A, Norström F, van der Pals M, Rosén A, Högberg L, Danielsson L, *et al.* Prevalence of childhood celiac disease and changes in infant feeding. *Pediatrics.* 2013;131(3):687-94.
- Vella C, Grech V. Increasing age at diagnosis of celiac disease in Malta. *Indian J Pediatr.* 2004;71(7):581-2.
- Logan RF, Tucker G, Rifkind E, Heading RC, Ferguson A. Changes in clinical features of coeliac disease in adults in Edinburgh and the Lothians 1960-79. *BMJ* 1983;286:95-97.
- Pare P, Douville P, Caron D, Lagace R. Adult coeliac sprue: changes in the pattern of clinical recognition. *Gastroenterology* 1988;10:395-400.
- Steens RFR, Csizmadia CGDS., George EK. Better recognition of childhood celiac disease in the Netherlands and its changing clinical picture: a national prospective study 1993-2000. *J Pediatr* 2005;147:239-242.
- Swinson CM, Levi AJ. Is celiac disease underdiagnosed? *BMJ* 1980;281:1258-60.
- Green PH. The many faces of celiac disease: clinical presentation of celiac disease in the adult population. *Gastroenterology* 2005;128:48-74.
- McGowan KE, Castiglione DA, Butzner JD. The Changing Face of Childhood Celiac Disease in North America: Impact of Serological Testing. *Pediatrics* 2009 ;124(6) ;1572-8.
- Ravikumara M, Tuthill D P, Jenkins H R. The changing clinical presentation of coeliac disease. *Arch Dis Child* 2006 ;91(12):969-71
- Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, *et al.* Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003; 348:2517–24.
- Murray JA, Van Dyke C, Plevak M F, Dierkhising RA, Zinsmeister AR, Melton LJ. Trends in the incidence and clinical features of celiac disease in a North American community, 1950-2001. *Clin Gastroenterol hepatol* 2003, 1:19-27



## Composés bioactifs

### Effets hypoglycémians des peptides bioactifs d'origine alimentaire

Hypoglycemic effects of bioactive peptides from dietary origin

*Naourez KTARI<sup>1\*</sup>, Najiba ZEGHAL<sup>2</sup>, Moncef NASRI<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Laboratoire de Génie Enzymatique et de Microbiologie-Université de Sfax, Ecole Nationale d'Ingénieurs de Sfax, B.P. 1173-3038 Sfax, Tunisie.

<sup>2</sup>Laboratoire de Physiologie Animale. Département des Sciences de la Vie. Faculté des Sciences, BP 1171, 3000 Sfax, Université de Sfax, Tunisie.

Reçu le 22 avril 2014, Accepté le 1er juin 2014.

\*Auteur correspondant : [naourez.ktari@yahoo.fr](mailto:naourez.ktari@yahoo.fr)

**Résumé** Le diabète mellitus (DM) est un véritable problème de santé publique à travers le monde. Outre l'insuline, plusieurs traitements hypoglycémians, synthétiques et administrés par voie orale, sont disponibles pour le traitement du diabète ou pour la prévention et/ou la suppression des complications à long terme de cette maladie. Cependant, ces traitements peuvent engendrer des effets secondaires. De ce fait, la découverte et le développement de nouveaux agents naturels antidiabétiques sont d'un grand intérêt. Comparé à la médecine moderne, les peptides bioactifs sont considérés comme des molécules saines sans effets secondaires. En se basant sur leurs compositions et leurs séquences en acides aminés, les peptides bioactifs exercent plusieurs activités biologiques, i.e. hypotensive, antioxydante, antithrombotique, hypocholestérolémiante, hypoglycémiant, etc. Ces peptides sont obtenus par hydrolyse enzymatique des protéines dans des conditions contrôlées et sous l'effet d'enzymes protéolytiques appropriées. Par ailleurs, les peptides bioactifs et les hydrolysats protéiques peuvent être utilisés comme ingrédients dans les aliments fonctionnels et pharmaceutiques pour améliorer la santé humaine et prévenir certaines pathologies. Cette revue porte sur l'hydrolyse enzymatique des protéines alimentaires comme un nouveau procédé de production d'hydrolysats protéiques et de peptides à effet hypoglycémiant.



**Mots clés :** *Peptides bioactifs, Diabète mellitus, Activité hypoglycémiante, Protéolyse, Protéines alimentaires*

**Abstract** Diabetes mellitus (DM) is a major health problem in the world. In addition to insulin, several synthetic oral hypoglycemic agents are available for DM treatment or to prevent and/or delay long-term complications of type 2 diabetes mellitus. However, these agents are associated with serious secondary effects and toxicity. Therefore, research and development of new and natural specific anti-diabetic agents are of great interest. Compared to modern medicine, bioactive peptides are considered to be safe, with no secondary effects. Based on their amino acids composition and sequences, bioactive peptides have often been reported to exhibit various biological activities, e.g. antihypertensive, antioxidative, antithrombotic, hypoglycaemic, hypocholesterolemic and antibacterial activities. Peptides can be obtained by enzymatic hydrolysis of whole protein sources by appropriate proteolytic enzymes under controlled conditions, followed by post-hydrolysis processing to isolate bioactive peptides. Therefore, because of their health-enhancing potential and safety profiles biopeptides and protein hydrolysates may be used as ingredients in functional foods and pharmaceuticals thus improving human health and preventing some diseases. In this review, we have focused on the enzymatic hydrolysis process of dietary proteins as a new and interesting research area for the production of hypoglycemic protein hydrolysates and biopeptides.

**Keywords:** *Bioactive peptides, Diabetes mellitus, Hypoglycemic activity, Proteolysis, Dietary proteins*

---

## Introduction

Il est bien connu que les produits de la digestion des protéines contenues dans les aliments ont été uniquement considérés comme un apport en acides aminés (AA) essentiels, AA non essentiels et en azote, indispensables à la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques de l'organisme. Il est bien établi actuellement que les protéines issues de sources diverses, aussi bien animales que végétales, contiennent dans leur séquence primaire des peptides qui, une fois libérés, sont capables d'influencer la physiologie de l'organisme [1]. En fait, les hydrolysats protéiques sont des sources de plusieurs peptides bioactifs. De par leurs multiples fonctions ou activités, les peptides intéressent particulièrement les industries agro-alimentaires. En effet, ils ont été utilisés pour leurs propriétés nutritionnelles [2], sensorielles [3] et fonctionnelles [4]. Les secteurs de la cosmétique et pharmaceutique s'intéressent également à ces

peptides pour leurs activités biologiques ou physiologiques. En effet, de nombreuses études ont montré que les peptides, peuvent être biologiquement actifs et exercer des effets anti-hypertensifs, anti-coagulants, hypocholestérolémiant, anti-microbiens, anti-cancéreux, immunomodulants [5]. Ils peuvent également posséder des activités anti-oxydantes et hypoglycémiantes. Généralement, les peptides bioactifs sont constitués de 2 à 20 AA [6]. Vu l'augmentation considérable de diabétiques et les effets secondaires que peuvent engendrer les médicaments antidiabétiques, de nombreux chercheurs ont évalué l'action pharmacologique des plantes médicinales utilisées depuis l'antiquité en médecine traditionnelle. Récemment, de nombreuses sociétés pharmaceutiques se sont orientées vers les hydrolysats protéiques, considérés comme source importante de mélanges peptidiques biologiquement actifs, comme agents thérapeutiques. En effet, les

peptides thérapeutiques offrent une efficacité, une sélectivité et une spécificité qu'il est difficile d'atteindre avec des petites molécules [7]. De plus, les peptides s'accumulent peu dans les tissus et leurs produits de dégradation sont des AA, ce qui diminue grandement les risques de toxicité. Finalement, ils offrent une diversité structurale supérieure aux petites molécules [8].

## Le diabète

Le diabète est une maladie fréquente connue depuis fort longtemps. C'est un syndrome clinique hétérogène et une affection chronique caractérisée par un désordre au niveau de la régulation du métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. Il est attribué à l'incapacité du corps à produire suffisamment d'insuline ou de l'utiliser correctement [9]. Sa prévalence à travers le monde, et ses complications constituent un sujet d'actualité. Lorsque la glycémie n'est pas bien régulée et la normoglycémie n'est pas rapidement rétablie, des complications sévères peuvent conduire jusqu'au coma, entraînant parfois des atteintes neurologiques irréversibles [10]. D'autres complications peuvent accompagner l'épidémie du diabète (type 1 et type 2), des complications microangiopathiques comme les maladies rénales (néphropathies) [11] et des troubles oculaires (rétinopathies) [12] dont le facteur de risque majeur est l'hyperglycémie, et les complications macroangiopathiques comme les maladies cardiovasculaires (MCV) [13] dont les facteurs de risque sont l'hyperglycémie, l'insulinorésistance, des carences en insuline, la présence d'acides gras libres dans le sang, l'hypertension, l'hyperlipidémie et l'inflammation [14]. Ces complications sont responsables à l'échelle mondiale d'une augmentation de la morbi-mortalité chez les patients diabétiques et constituent un véritable problème de santé publique. La prévalence du diabète est étroitement liée aux modes de vie. Le développement rapide de cette maladie dans la plupart des pays, s'est effectué en parallèle avec les changements culturels et sociaux : l'urbanisation croissante, les changements alimentaires, la réduction de l'activité physique et le vieillissement démographique. En effet, dans les

sociétés modernes, la qualité de vie et de travail est augmentée sans pour autant que l'hygiène de vie soit améliorée. Le mode de vie devient de plus en plus sédentaire et donc moins d'efforts fournis. De plus, l'alimentation classique est devenue plus riche en protéines, en graisses, en sucres et pauvres en fruits et légumes. La consommation moyenne de nourriture, en termes de calories, augmente de plus en plus dans le monde, particulièrement dans les pays en voie de développement [15]. Ainsi, une véritable épidémie d'obésité apparaît chez les enfants et les adolescents. C'est pourquoi la prévention du diabète de type 2 repose essentiellement sur les modifications du style de vie et de l'alimentation et de la pratique sportive.

## Les traitements antidiabétiques: de l'efficacité à la toxicité

Outre l'exercice physique et une alimentation équilibrée et appropriée qui peuvent réduire et prévenir la prévalence du diabète, certains traitements thérapeutiques diminuent aussi l'impact de cette maladie. Les sulfamides, les biguanides, les thiazolidinediones et les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase sont les principales classes d'antidiabétiques oraux disponibles pour le traitement des patients atteints de diabète de type 2 [16]. Le but de ces traitements est de réduire l'hyperglycémie en activant la sécrétion endogène de l'insuline ou en renforçant ses effets. On distingue les antidiabétiques qui ont une action sur l'insulino-résistance (biguanides, thiazolidinediones) principalement indiqués chez les patients diabétiques obèses [17], ceux qui ont une action sur l'insulino-sécrétion (sulfamides, glinides) indiqués pour les patients présentant une obésité très sévère [18] et les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase indiqués pour les patients souffrant d'un diabète non insulino-dépendant [19]. Généralement, tous ces agents antidiabétiques présentent différents effets secondaires qui varient selon la classe et la génération du médicament. Les sulfamides provoquent un état d'hypoglycémie. Cet effet est considéré comme principal à côté de l'hyponatrémie, l'hépatite, les atteintes hématologiques, l'éventuelle réaction dermatologique ainsi qu'un gain de poids dû à

l'hyperinsulinémie. La metformine, le biguanide le plus commercialisé dans le monde, provoque une acidose lactique, une fatigue, des nausées et une toxicité rénale [20]. Les inhibiteurs de l'alpha-glucosidase ont des effets secondaires sur le système digestif (flatulence, douleur abdominale et diarrhée) à cause de la fermentation des sucres non absorbés. L'acarbose est un médicament appartenant à la classe des inhibiteurs de l'alpha-glucosidase. C'est un analogue structural de fragments d'amylose. Ainsi, la proximité de forme de l'acarbose et de l'amidon lui permet de se fixer sur l'amylase. Son affinité avec cette enzyme est plus élevée que celle de l'amidon. La prise orale de l'acarbose réduit l'activité de l'amylase et a donc un effet hypoglycémiant. L'acarbose présente divers effets secondaires, comme les gaz, le ballonnement et la diarrhée [20].

Une meilleure connaissance de la pathogénie diabétique a permis ces dernières années le développement de nouvelles molécules antidiabétiques ayant pour but d'atteindre les objectifs thérapeutiques. Des analogues du glucagon-like peptide-1 (GLP-1) résistants à la dipeptidyl-peptidase-IV (DPP-IV) et des inhibiteurs de la DPP-IV sont actuellement explorés et les résultats des essais cliniques confirment leur efficacité sur le contrôle de l'équilibre glycémique chez les diabétiques de type 2 [21]. En effet, GLP-1 est une hormone peptidique qui potentialise l'effet du glucose sur la sécrétion d'insuline. Elle est libérée par des cellules endocrines de l'épithélium intestinal lors du passage des nutriments. L'activation des récepteurs de GLP-1 stimule la sécrétion d'insuline et active également la transcription du gène de l'insuline, stimule la prolifération et la survie des cellules et diminue la mort cellulaire. Enfin, le GLP-1 inhibe la sécrétion de glucagon, ralentit la vidange gastrique et stimule la satiété [22]. GLP-1 est dégradée très rapidement en métabolites inactifs par la DPP-IV chez les patients diabétiques de type 2.

### Peptides d'origine naturelle à vertus antidiabétiques

Plusieurs peptides naturels à activité hypoglycémique ont été identifiés. En 1981, Khanna *et al.* [23] ont isolé le polypeptide-P à partir des fruits, des

graines et des tissus du melon amer (*Momordica charantia* L. Var. *abbreviata* Ser). Ce polypeptide présente des propriétés insulinomimétiques et hypoglycémiantes très efficaces lorsqu'il est administré par voie sous cutanée à des patients atteints de diabète de type 1 [24]. Le polypeptide-P, appelé également l'insuline végétale, fonctionne en imitant l'action de l'insuline humaine dans l'organisme [25]. En 1998, un autre peptide hypoglycémiant MC6 de 18 AA (accession : AAX06814) a été également isolé à partir du melon amer. Récemment, Liu *et al.* [26] ont réalisé l'expression du peptide MC6 dans *E.coli*. En 2008a, Yuan *et al.* [27] ont purifié à partir de la même plante un peptide soluble nommé MC2-1-5 doué d'activité hypoglycémiant. Ce peptide possède une masse moléculaire de l'ordre de 3405,5 Da. La séquence N-terminale de ses 10 premiers AA est NH<sub>2</sub>-Gly-His-Pro-Tyr-Tyr-Ser-Ile-Lys-Lys-Ser. Ce peptide, administré par voie orale à une dose de 2 mg/kg, réduit le niveau du glucose sanguin de 61,7% chez des rats rendus diabétiques par l'alloxane. Des travaux réalisés par Lavigne *et al.* [28] ont montré que l'administration de protéines de morue améliore la glycémie et la sensibilité à l'insuline chez des rats soumis à un régime hypercholestérolémiant. Cet effet est attribué entre autre à l'amélioration du transfert membranaire du transporteur du glucose. Des études plus poussées menées par Ouellet *et al.* [29] ont montré que ces protéines améliorent également la sensibilité à l'insuline chez des patients résistants à l'action de l'insuline. Huang et Wu [30] ont purifié et caractérisé à partir du foie de requin un nouveau peptide antidiabétique de 17 résidus dont l'effet est de réduire le niveau de glucose plasmatique chez des souris diabétiques. La séquence N-terminale des 15 premiers AA est NH<sub>2</sub>-Met-Leu-Val-Gly-Pro-Ile-Gly-Ala-Ala-Lys-Val-Val-Tyr-Glu-Gln-. Des travaux de Jang *et al.* [31] ont montré que des peptides obtenus à partir du soja noir réduisent le taux de glucose dans le sang et améliorent la tolérance du glucose chez des souris diabétiques. L'évaluation clinique a montré un effet bénéfique de ces peptides dans le contrôle du taux de glucose chez des patients diabétiques [32]. Récemment, Li *et al.* [33] ont isolé et identifié un nouveau complexe polysaccharide-peptide nommé LB-1b, à partir du champignon *P. abalonus*,

doué d'activités antioxydante, antiproliférative et hypoglycémiant chez des souris rendus diabétiques avec la tetraoxypyrimidine. Le complexe LB-1b possède une séquence N-terminale NH<sub>2</sub>-Ile-Pro-Lys-Glu-Arg-Lys-Glu-Phe-Gln-Gln-Ala-Gln-His-Leu-Lys qui présente une similarité avec certaines enzymes antioxydantes à savoir l'hydroperoxyde reductase, la thioredoxine peroxydase et la thiol peroxydase.

### Approche enzymatique de production de peptides bioactifs à partir de protéines alimentaires

Plusieurs méthodes peuvent être appliquées pour la production de peptides actifs. Les biopeptides peuvent être soit synthétisés à partir d'AA ou bien générés par hydrolyse enzymatique ou chimique de protéines alimentaires ou même par fermentation. En effet, la présence de diverses protéases dans l'aliment permet la formation de peptides bioactifs dans certains aliments transformés. Le processus de fermentation implique généralement des enzymes issues de microorganismes. Enfin, les technologies d'ADN recombinant peuvent également être utilisées pour produire des peptides bioactifs [34]. L'hydrolyse chimique des protéines alimentaires présente tellement de désavantages qu'elle n'est quasiment pas utilisée dans le cadre d'applications alimentaires ou pharmacologiques. En effet, les modifications chimiques sont drastiques ce qui entraîne une destruction ou une perte totale de certains AA, une production de molécules toxiques et une production importante d'AA libres. L'hydrolyse acide des protéines conduit à la destruction totale du tryptophane, à la destruction partielle de la méthionine et à la transformation de la glutamine et de l'asparagine en leurs acides correspondants. L'hydrolyse alcaline par contre provoque la racémisation des AA et la destruction de certains AA comme la cystéine, la sérine et la thréonine [35]. Il en résulte alors des composés potentiellement toxiques. Enfin, l'hydrolyse chimique est non spécifique ce qui la rend peu reproductible [2]. Réalisée dans des conditions douces (pH 6-8) et température (40-60 °C), l'hydrolyse enzymatique des protéines ne

présente pas les inconvénients de l'hydrolyse chimique. Ainsi, la composition en AA des hydrolysats protéiques est similaire à celle de la matière première. De ce fait, l'hydrolyse enzymatique des protéines n'affecte pas la valeur nutritionnelle de la protéine source. De plus, l'hydrolyse enzymatique des protéines alimentaires est caractérisée par le degré d'hydrolyse (DH) qui représente le pourcentage de liens peptidiques coupés lors de l'hydrolyse. La valeur du DH peut être déterminée en utilisant la formule suivante décrite par Adler-Nissen [36]:

$$DH \% = \frac{B \times Nb}{MP} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

B = base consommée (l) ; Nb = normalité de la base ; MP = masse de protéine (N facteur Kjeldahl) (kg) ; h<sub>tot</sub> = nombre total des liaisons peptidiques de la protéine en grammes équivalent par kg ; α = degré de dissociation. Les valeurs de α et h<sub>tot</sub> sont données par les fiches techniques des enzymes "Novo Enzymes". La notion du DH est souvent utilisée pour suivre et contrôler l'hydrolyse mais également pour caractériser l'hydrolysats formé. Selon Turgeon *et al.* [37], sa mesure permet de maximiser la reproductibilité des propriétés fonctionnelles, nutritionnelles, organoleptiques et physiologiques des hydrolysats obtenus. Le DH dépend de la spécificité de l'enzyme et des conditions d'hydrolyse notamment, le rapport enzyme/substrat (E/S) et le temps d'incubation qui peut varier entre 15 minutes pour la libération de peptides antibactériens [38] et 7 heures pour les peptides antioxydants [39]. L'hydrolyse enzymatique par des enzymes exogènes appropriées est la méthode la plus couramment utilisée pour produire des peptides bioactifs. Plusieurs enzymes digestifs (pepsine, trypsine et chymotrypsine), bactériennes (alcalase, subtilisine, etc.) voire même d'origine végétale (papaïne, ficine, etc.) ont été appliquées pour la génération d'hydrolysats protéiques actifs à partir de diverses protéines. Par ailleurs, pour obtenir un hydrolysats protéique ayant un DH élevé (enrichi en peptides de longueurs moyennes des chaînes peptidiques), un mélange de protéases est souvent utilisé. L'utilisation des enzymes permet un certain contrôle de la réaction d'hydrolyse et de ses produits [2]. Les protéases hydrolysent les

liaisons peptidiques, formant alors un mélange de peptides et d'AA. La composition peptidique des mélanges varie selon la nature du substrat protéique [40], la spécificité de la protéase utilisée [41] ainsi que les conditions de mise en œuvre de l'hydrolyse. En effet, la composition initiale des substrats protéiques, les poissons à titre d'exemple, diffère en fonction de l'espèce, de la partie étudiée, des conditions physiologiques de l'animal, des conditions de stockage.... De plus, les enzymes utilisées pour l'hydrolyse protéolytique sont classées en fonction de leurs groupements fonctionnels. A titre d'exemple, La trypsine, une protéase à sérine, a une affinité pour la lysine et

l'arginine, alors que la pepsine, une protéase acide, a une affinité pour les acides aminés hydrophobes [42]. L'optimisation de ces paramètres est un objectif majeur dans le développement de ce procédé. En effet, chaque enzyme active possède sa propre gamme de pH et de température [43]. De plus, la vitesse de la réaction d'hydrolyse est proportionnelle à la concentration en enzymes et peut être modifiée par la présence d'inhibiteurs ou d'activateurs. Selon les propriétés visées, l'hydrolyse enzymatique des protéines peut être plus ou moins complète. Une hydrolyse poussée conduit à la génération de peptides solubles de petites tailles moléculaires (<15 AA). Elle permet

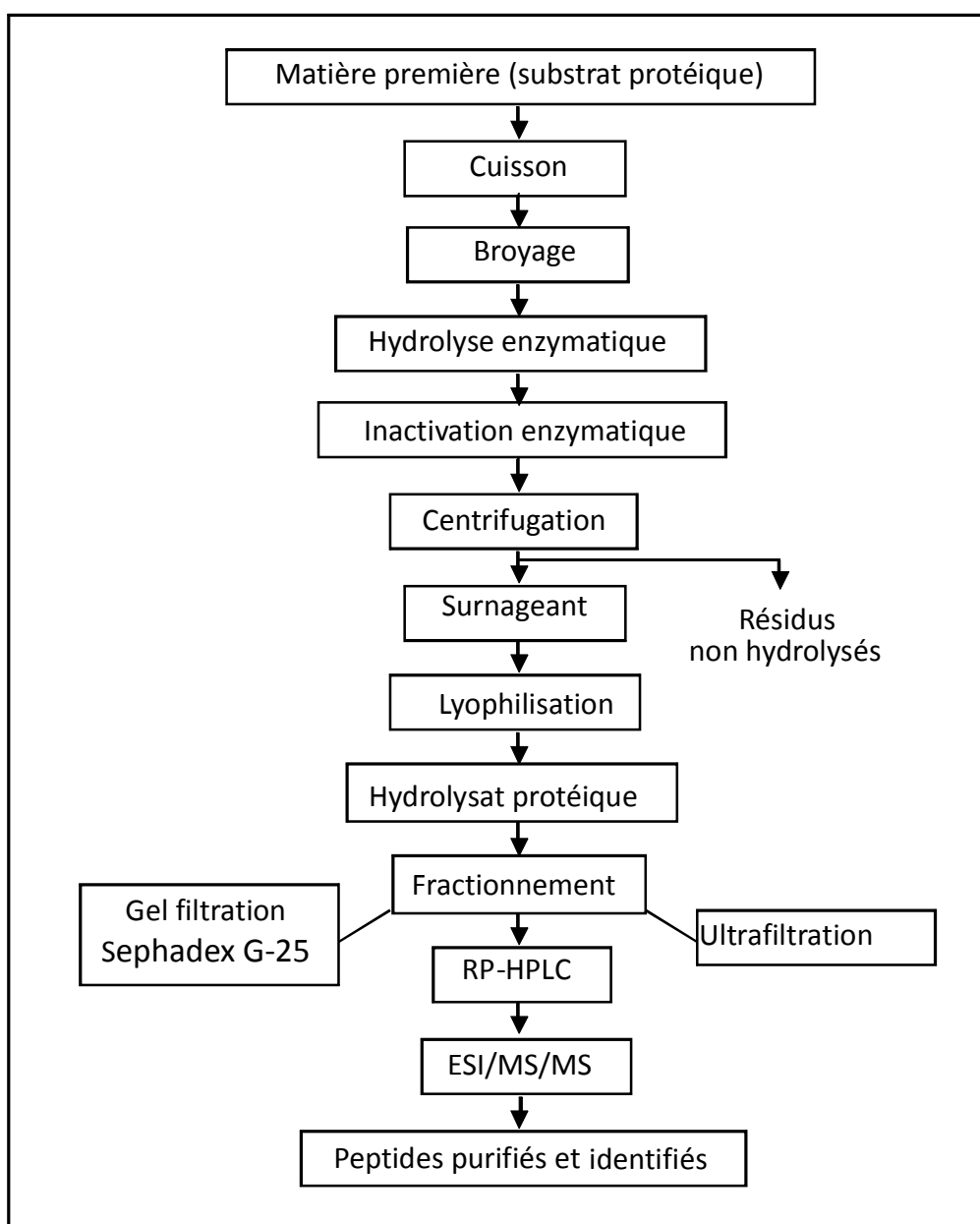


Fig. 1.

### Protocole général de production des hydrolysats protéiques et des peptides bioactifs

*HPLC-RP* : Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography ;  
*ESI/MS/MS*: Electrospray ionization tandem mass spectrometry.

l'obtention d'hydrolysats utilisables dans les formulations diététiques, dans les milieux de culture pour microorganismes ou possédant potentiellement des peptides bioactifs. Une hydrolyse limitée permet quant à elle d'obtenir des peptides de plus haute taille moléculaire (>15 AA) aux propriétés fonctionnelles intéressantes. Le procédé de préparation des hydrolysats protéiques et de purification et identification des peptides passe essentiellement par les étapes présentées sur la Fig. 1.

L'obtention et l'identification de peptides reposent en général, comme illustré sur la Fig. 1, sur l'hydrolyse ménagée et contrôlée des protéines, suivie de méthodes systématiques de fractionnement et de purification [44]. Les biopeptides sont généralement en faible concentration dans les hydrolysats protéiques ce qui justifie leur fractionnement en vue de leur isolement et leur identification. L'hydrolysat protéique le plus efficace subit dans une première étape soit un fractionnement sur une colonne de gel filtration Sephadex G-25, soit une ultrafiltration. Les fractions les plus actives seront soumises à un nouveau fractionnement par chromatographie liquide haute performance sur une colonne de silice C<sub>18</sub> en phase inverse (HPLC-RP). Les peptides de fractions sortie HPLC-RP seront identifiés par spectrométrie de masse dite en « tandem » ou ESI/MS/MS.

### Peptides à effet hypoglycémiant issus de l'hydrolyse enzymatique

De nombreux hydrolysats protéiques et peptides modulateurs du métabolisme glucidique ont été caractérisés à partir de protéines alimentaires de sources variées. Dans ce contexte, Matsui *et al.* [45] ont identifié à partir d'un hydrolysat du muscle de sardine, généré par l'action d'une protéase alcaline de *Bacillus licheniformis*, deux peptides portant les séquences Val-Trp (IC<sub>50</sub> = 22,6 mM) et Try-Tyr-Pro-Leu (IC<sub>50</sub> = 3,7 mM) doués d'activité antidiabétique. Des études menées par Yuan *et al.* [46] ont montré que l'hydrolyse enzymatique du melon amer (*Momordica charantia*) avec l'alcalase 2.4L génère des peptides qui abaissent la glycémie lorsqu'ils sont administrés à des souris rendues diabétiques par l'alloxane. Toutefois, l'administration des protéines intactes est sans effet sur le taux

de glucose dans le sang. Morifuji *et al.* [47] ont identifié à partir d'un hydrolysat de protéines du lactosérum, 7 dipeptides (Ile-Val, Leu-Val, Val-Leu, Ile-Ile, Leu-Ile, Ile-Leu et Leu-Leu) présentant des propriétés stimulatrices de la captation du glucose, à la fois en modèle cellulaire et musculaire (cellules L6 et muscle épitrochlearis). En 2009, Kim *et al.* [48] ont identifié à partir de la fibroïne, le principal constituant de la soie, un hexapeptide (Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Tyr) capable à la fois d'améliorer la captation du glucose dans un modèle *in vitro* d'adipocytes résistantes à l'insuline (3T3-L1) et de rétablir une normo-sensibilité des cellules à l'insuline par l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) et de la protéine kinase B (AKT). De même, en 2008, Hu *et al.* [49] ont rapporté que des hydrolysats protéiques obtenus par digestion enzymatique de la fibroïne de soie avec l'élastase présentent une activité antidiabétique *in vivo*. D'après ces auteurs, l'effet antidiabétique est exercé par suppression de l'absorption des carbohydrates dans l'intestin et par diminution du niveau de glucose postprandial. Zhu *et al.* [50] ont montré que des oligopeptides obtenus à partir de la peau du saumon présentent une forte activité antidiabétique en protégeant les cellules  $\beta$  pancréatiques de l'apoptose. Nakaoka *et al.* [51] ont noté que l'hydrolysat enzymatique de l'hémoglobine bovine ou porcine ainsi que le peptide de séquence peptidique "Leu-Ser-Glu-Leu" purifié à partir de cet hydrolysat pouvaient réduire la glycémie et améliorer la sécrétion de l'insuline. Cet effet est exprimé par l'amélioration de l'expression du transporteur insulino-dépendant du glucose (GLUT-4) et de la protéine UCP2 (UnCoupling Protein 2) dans le muscle des souris rendus diabétiques avec la streptozotocine. Deux peptides ayant les séquences peptidiques Gly-Glu-Tyr (MW = 367 Da) et Gly-Tyr-Gly (MW = 295 Da) ont été purifiés à partir d'un hydrolysat de soie du *bombyx mori*. Ces peptides présentent également une activité inhibitrice de l'alpha-glucosidase avec des IC<sub>50</sub> égales à 2,7 et 1,5 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivement [52]. De même, Yu *et al.* [53] ont purifié, à partir de l'hydrolysat protéique du blanc d'œuf, obtenu par digestion avec l'alcalase, deux peptides de séquences peptidiques Arg-Val-Pro-Ser-Leu-Met et Thr-Pro-Ser-Pro-Arg. Ces peptides présentent une activité inhibitrice de l'alpha-glucosidase avec des concentrations inhibitrices IC<sub>50</sub> égales à 23,07 et 40,02  $\mu$ mol.L<sup>-1</sup>, respectivement.

En 2012, Yu *et al.* [54] ont purifié le peptide ayant la séquence Lys-Leu-Pro-Gly-Phe à partir d'hydrolysats protéiques de l'albumine. Ce peptide libéré par action de l'alcalse présente à la fois une activité inhibitrice de l' $\alpha$ -glucosidase et de l' $\alpha$ -amylase avec des concentrations inhibitrices  $IC_{50}$  de l'ordre de  $59,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  et  $120 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivement. Des travaux de Sarmadi *et al.* [55] ont montré que des autolysats protéiques préparés à partir du cacao (*Theobroma cacao L.*) inhibent l' $\alpha$ -amylase, diminuent la glycémie et améliorent la sécrétion d'insuline chez des rats rendus diabétiques par la streptozotocine. Li-Chan *et al.* [56] ont isolé à partir des hydrolysats protéiques de la peau de saumon obtenus par action de l'alcalse, la bromelaïne et la flavourzyme, deux peptides doués d'activité inhibitrice de la dipeptidyl-peptidase IV exerçant ainsi un effet antidiabétique. Les deux peptides Gly-Pro-Ala-Glu (372,4 Da) et Gly-Pro-Gly-Ala (300,4 Da), exercent une activité inhibitrice de la dipeptidyl-peptidase IV dose dépendante avec des  $IC_{50}$  de l'ordre de 49,6 et 41,9  $\mu\text{M}$ , respectivement. Etant donné que le ralentissement de l'absorption des glucides est associé à un meilleur contrôle glycémique, des inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase et l' $\alpha$ -glucosidase ont été développés pour retarder l'absorption intestinale des glucides. L'acarbose est l'inhibiteur de l' $\alpha$ -amylase et de l' $\alpha$ -glucosidase le plus largement utilisé. Récemment, des travaux menés par Ktari *et al.* [57] ont montré que des hydrolysats protéiques, préparés à partir du muscle de zebra blenny (*Salaria basilisca*) sous l'action d'enzymes endogènes digestives de la même espèce, de la sardinelle (*Sardinella aurita*) et de l'émissole lisse (*Mustelus mustelus*), exercent une forte action inhibitrice sur l'activité  $\alpha$ -amylase. De plus, l'administration de ces hydrolysats protéiques chez des rats de souche Wistar rendus diabétiques par l'alloxane a permis de réduire le taux de glucose et celui de HbA1c sériques ainsi que la présence de gouttelettes graisseuses formées au niveau du foie des rats diabétiques. Récemment, des études ont montré l'effet bénéfique des hydrolysats de protéines du lactosérum dans le traitement du diabète. En effet, les hydrolysats protéiques de l' $\alpha$ -lactalbumine,  $\beta$ -lactoglobuline, albumine et lactoferrine obtenus par digestion pepsique présentent des activités inhibitrices de la dipeptidyl-peptidase IV et de l' $\alpha$ -glucosidase [58,59]. De plus, le dipeptide L-Leucyl-L-Isoleucine

a montré une grande efficacité dans la translocation du transporteur insulino-dépendant du glucose (GLUT-4) à la membrane plasmique et à la captation accrue de glucose par le muscle squelettique [60]. Higuchi *et al.* [61] ont montré que l'administration orale des hydrolysats protéiques de grains de maïs exerce un effet antidiabétique en stimulant la sécrétion de GLP-1 et GIP et en améliorant la tolérance au glucose chez des rats normaux et des rats de souche Goto-Kakizaki diabétiques. Quelques exemples de peptides et d'hydrolysats protéiques doués d'activités hypoglycémiques sont résumés dans le Tableau I.

### Stabilité des peptides bioactifs

Les peptides biologiquement actifs, libérés suite à l'hydrolyse enzymatique *in vitro*, présentent une opportunité de valorisation des protéines alimentaires à des fins alimentaires pour les aliments fonctionnels et thérapeutiques dans le secteur pharmaceutique. Toutefois, cette opportunité repose sur la démonstration de l'efficacité des peptides bioactifs dans l'organisme vivant, et ce, afin de valider leurs activités et leurs effets physiologiques. Pour accroître et renforcer le potentiel d'application des peptides bioactifs dans ce secteur, il est primordial de vérifier et de confirmer leur intégrité structurale et leur activité biologique au cours du processus de la digestion. Pour les peptides les plus susceptibles à l'attaque par les enzymes digestives, il est aussi important d'envisager des modes de protection afin de préserver leur activité biologique au niveau des organes cibles. Généralement, les peptides thérapeutiques sont très rapidement dégradés par les protéases digestives et les peptidases principalement localisées dans le sang, le foie ou encore les reins [63] et leur durée de vie dans l'organisme humain est de l'ordre de quelques minutes. Cependant, plusieurs travaux ont montré que les peptides de petites tailles sont plus résistants à la dégradation gastro-intestinale que les peptides de tailles élevées. En effet, Ohsawa *et al.* [64] ont montré que les tripeptides Val-Pro-Pro, Ile-Pro-Pro sont résistants à l'action des peptidases et peuvent atteindre intacts leurs cibles. Ceci assure que les petits peptides qui exercent des bioactivités *in vitro* seront conservés et pourraient exercer leurs effets biologiques *in vivo*. Différentes méthodes ont été envisagées pour empêcher

Tableau I. Exemple de peptides et hydrolysats protéiques doués d'activités hypoglycémiques

Substrats	Enzymes	Hydrolysats protéiques ou peptides	Activités	Références
Blanc d'oeuf	Alcalase	Arg-Val-Pro-Ser-Leu-Met Thr- Pro- Ser- Pro- Arg	Inhibition de l'Alpha-glucosidase	[53]
Soie du bombyx mari	Protease N	Hydrolysats protéiques Gly-Glu-Tyr Gly- Tyr- Gly	Induction de l'activité des cellules $\beta$ pancréatiques Inhibition de l'alpha-glucosidase	[62] [52]
Fibroïne de soie	Elastase	Hydrolysats protéiques	Suppression de l'absorption des carbohydrates dans l'intestin	[49]
	Chymotrypsine pepsine	Gly- Ala- Gly- Ala- Gly- Tyr	Amélioration de la captation du glucose dans des adipocytes résistantes à l'insuline (3T3-L1). Etablissement d'une normo-sensibilité des cellules à l'insuline par l'activation de la PI3-Kinase et d'AKT.	[48]
Peau de saumon	Alcalase Bromelaïne Flavourzyme	Gly- Pro- Ala- Glu Gly- Pro- Gly- Ala	Inhibition de la dipeptidyl-peptidase IV	[56]
Muscle de sardine	Protéase alcaline de B.licheniformis	Val- Trp Try- Tyr- Pro- Leu	Inhibition de l'alpha - glucosidase	[45]
Cacao (Theobromo cacao L.)		Autolysats protéiques	Inhibition de l'alpha - amylase	[55]
Muscle de zebra blenny (S. basilica)	Enzyme endogène de poissons	Hydrolysats protéiques	Inhibition de l'alpha - amylase	[57]
Peau de saumon	Protéases	Oligopeptides	protégeant les cellules $\beta$ pancréatiques de l'apoptose	[50]
Hémoglobine bovine ou porcine	Protéases	Hydrolysats protéiques Leu- Ser- Glu- Leu	Amélioration de l'expression de GLUT4 et de UCP2	
Melon amer (M. charantia)	Alcalase 2. 4L	Hydrolysats protéiques	Diminution du taux de glucose dans le sang	[46]
Albumine	Alcalase	Lys- Leu- Pro- Gly- P he	Inhibition de l'alpha - glucosidase et de l'alpha-amylase	[54]
Protéines du lactosérum	Pepsine	Hydrolysats protéiques	Inhibition de l'alpha - glucosidase et de la dipeptidyl-peptidase	[58,59]



l'action enzymatique gastrointestinale. Les C-amidations et les N-acétylations empêchent l'action des exopeptidases ainsi que l'utilisation d'acides aminés D,  $\beta$  ou non naturels, moins sensibles à la dégradation enzymatique [65]. Les cyclisations au travers de ligations Nter-Cter, d'anneaux lactames ou de ponts disulfures sont également proposées [63]. Enfin, d'autres modifications chimiques des peptides telles que la liaison d'acides gras ou la pegylation (attachement d'unités de polyéthylène glycol) ont pour but d'augmenter le poids moléculaire et donc le temps de demi-vie [66-68]. Enfin, la co-administration d'un peptide avec des inhibiteurs d'enzymes est également une voie qui a été explorée [63].

## Conclusion

La génération d'hydrolysats protéiques ou de fractions peptidiques par protéolyse enzymatique représente une voie prometteuse pour des applications thérapeutiques. L'utilisation de peptides hypoglycémisants dérivés de séquences primaires pour moduler l'activité biologique représente une approche potentiellement intéressante pour le traitement du diabète mellitus. Bien que peu de travaux aient décrit l'effet hypoglycémiant de quelques biopeptides, des investigations sont nécessaires pour la détermination de leurs mécanismes d'action dans la réduction du taux de glucose dans le sang chez des rats rendus diabétiques.

## Conflit d'intérêts

Il n'y a pas de conflit d'intérêts dans de ce travail.

## Références

- Sharma S., Singh R., Rana S. Bioactive Peptides: A Review. *Int. J. Bioautomation* 2011; 15: 223-50.
- Clemente A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci Technol* 2000; 11: 254-62.
- Gill I., López-Fandiño R., Jorba X., Vulfson EN. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enz Microb Technol* 1996; 18: 162-83.
- Panyam D., Kilara A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends Food Sci Technol* 1996; 7: 120-5.
- Yang R., Zhang Z., Pei X., Han X., Wang J., Wang L., et al. Immunomodulatory effects of marine oligopeptide preparation from Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) in mice. *Food Chem* 2009; 113: 464-70.
- Ryan JT., Ross RP., Bolton D., Fitzgerald GF., Stanton C. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. *Nutrients* 2011; 3: 765-91.
- Hummel G., Reineke U., Reimer U. Translating peptides into small molecules. *Mol Biosyst* 2006; 2: 499-508.
- Ayoub M., Scheidegger D. Peptide drugs, overcoming the challenges, a growing business. *Chem today* 2006; 24: 46-8.
- American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2014; 37: S81-S90.
- Said G. Les neuropathies diabétiques. *Neuro* 2009; 1: 40-4.
- Gariani K., de Seigneux S., Pechère-Bertschi A., Philippe J., Martin PY. Néphropathie diabétique. *Rev Med Suisse* 2012; 8: 473-9
- Shah CA. Diabetic retinopathy: A comprehensive review. *Indian J Med Sci* 2008; 62: 500-19.
- Potenza MA., Nacci C., Gagliardi S., Montagnani M. Cardiovascular complications in diabetes: lessons from animal models. *Curr Med Chem* 2011; 18: 1806-19.
- King GL. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol* 2008; 79: 1527-34.
- Steven M., Haffner MD. Epidemiology of type 2 diabetes: Risk Factors. *Diabetes Care* 1998; 21: C3-C6.
- Bolen S., Feldman L., Vassy J., Wilson L., Yeh HC., Marinopoulos S., et al. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2007; 147: 386-99.
- Molavi B., Rassouli N., Bagwe S., Rasouli N. A review of thiazolidinediones and metformin in the treatment of type 2 diabetes with focus on cardiovascular complications. *Vasc Health Risk Manag* 2007; 3: 967-73.
- Scheen AJ. Stratégie thérapeutique chez le patient diabétique de type 2 obèse. *STV* 2006; 18: 302-10
- Allannic H. Les inhibiteurs des alpha-

- glucosidases: leurs places dans la thérapeutique actuelle du diabète. *STV* 1997; 9: 601-8.
20. Dey L., Attele AS., Yuan CS. Alternative therapies for type 2 diabetes. *Altern Med Rev* 2002; 7: 45-58.
  21. Lamounier RN., Pareja JC., Tambascia MA., Geloneze B. Incretins: Clinical physiology and bariatric surgery—correlating the enteroendocrine system and a potentially anti-dysmetabolic procedure. *Obes Surg* 2007; 17: 569-76.
  22. Madsbad S., Krarup T., Deacon CF., Holst JJ. Glucagon-like peptide receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of diabetes : A review of clinical trials. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 491-9.
  23. Khanna P., Jain SC., Panagariya A. Hypoglycemic activity of polypeptide-P from a plant source. *J Nat Prod* 1981; 44: 648-55.
  24. Marles RJ., Farnsworth NR. Antidiabetic plants and their active constituents. *Phytomedicine* 1995; 2: 137-89.
  25. Basch WE., Gabardi S., Ulbricht C. Bitter melon (*Momordica charantia*): A review of efficacy and safety. *Am J Health Syst Pharm* 2003; 60: 356-9.
  26. Liu SX., Fu ZP., Mu RM., Hu ZB., Wang FJ., Wang XR. Expression and characterization of *Momordica charantia* antihyperglycaemic peptide in *Escherichia coli*. *Mol Biol Rep* 2010; 37: 1781-6.
  27. Yuan X., Gu X., Tang J. Purification and characterisation of a hypoglycemic peptide from *Momordica Charantia* L. Var. *abbreviata* Ser. *Food Chem* 2008 a; 111: 415-20.
  28. Lavigne C., Marette A., Jacques H. Cod and soy proteins compared with casein improve glucose tolerance and insulin sensitivity in rats. *Am J Physiol* 2000; 278: 491-500.
  29. Ouellet V., Marois J., Weisnagel SJ., Jacques H. Dietary cod protein improves insulin sensitivity in insulin-resistant men and women: a randomized controlled trial. *Diabetes Care* 2007; 30: 2816-21.
  30. Huang FJ., Wu WT. Purification and characterization of a new peptide (s-8300) from shark liver. *J Food Biochem* 2010; 34: 962-70.
  31. Jang H., Hyeon J., Won C., Lee H., Shin Chang S., Park C., et al. *In vivo* and *in vitro* application of black soybean peptides in the amelioration of endoplasmic reticulum stress and improvement of insulin resistance. *Life Sci* 2010; 86: 267-74.
  32. Kwak JH., Lee JH., Ahn CW., Park SH., Shim ST., Song YD., et al. Black soy peptide supplementation improves glucose control in subjects with prediabetes and newly diagnosed type II diabetes mellitus. *J Med Food* 2010; 13: 1307-12.
  33. Li N., Li L., Fang JC., Wong JH., Ng TB., Jiang Y., et al. Isolation and identification of a novel polysaccharide-peptide complex with antioxidant, anti-proliferative and hypoglycaemic activities from the abalone mushroom. *Biosci Rep* 2012; 32: 221-28.
  34. Losacco M., Gallerani R., Gobetti M., Minervini F., De Leo F. Production of active angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine beta-casein by recombinant DNA technologies. *Biotechnol J* 2007; 2: 1425-34.
  35. Fountoulakis M., Lahm HW. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *J Chromatogr A* 1998; 826: 109-34.
  36. Adler-Nissen J. Enzymatic hydrolysis of proteins for increased solubility. *J Agric Food Chem* 1976; 24: 1090-3.
  37. Turgeon SL., Bard C., Gauthier SF. Comparaison de trois méthodes pour la mesure du degré d'hydrolyse de protéines laitières modifiées enzymatiquement. *Can Inst Food Sci Technol J* 1991; 24: 14-8.
  38. Sila A., Nedjar-Arroume N., Hedhili K., Chataigné G., Balti R., Nasri M., et al. Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Sci Technol* 2014; 55: 183-88.
  39. Ktari N., Jridi M., Bkhairia I., Sayari N., Ben Salah R., Nasri, M. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from muscle of zebra blenny (*Salaria basilisca*) obtained with different crude protease extracts. *Food Res Int* 2012; 49: 747-56.
  40. Cuvellier GF. Enzymologie et biocatalyse. Dans Biotechnologie. Tec et Doc, Lavoisier, Paris ; 1999, p. 319-42.
  41. Simpson BK., Haard NF. Cold-adapted enzymes from fish. In : Knorr D (editor). Food Biotechnology, New York: Marcel Dekker; 1987, p. 495-528.

42. Adler-Nissen J. Limited enzymic degradation of proteins: a new approach in the industrial application of hydrolases. *J Chem Tech Biotechnol* 1982; 32: 138-56.
43. Copeland RA. Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism and data analysis. (ed. R.A. Copeland). Wiley-VCH inc, New-York; 1996, p. 306.
44. Gundry RL., White MY., Murray Cl., Kane LA., Fu Q., Stanley BA., et al. Preparation of proteins and peptides for mass spectrometry analysis in a bottom-up proteomics workflow. *Curr Protoc Mol Biol* 2009; 1-29.
45. Matsui T., Oki T., Osajima Y. Isolation and identification of peptidic alpha-glucosidase inhibitors derived from sardine muscle hydrolysate. *Z. Naturforsch* 1999; 54: 259-63.
46. Yuan X., Gu X., Tang J. Optimization of the production of *Momordica charantia* L. Var. *abbreviata* Ser. protein hydrolysates with hypoglycemic effect using Alcalase. *Food Chem* 2008 b; 111: 340-4.
47. Morifuji M., Koga J., Kawanaka K., Higuchi M. Branched-chain amino acid-containing dipeptides, identified from whey protein hydrolysates, stimulate glucose uptake rate in L6 myotubes and isolated skeletal muscles. *J Nutr Sci Vitaminol* 2009; 55: 81-6.
48. Kim ED., Bayaraa T., Shin EJ., Hyun CK. Fibroin-Derived Peptides Stimulate Glucose Transport in Normal and Insulin-Resistant 3T3-L1 Adipocytes. *Biol Pharm Bull* 2009; 32: 427-33.
49. Hu C., Cui J., Ren F., Peng C. Enzyme hydrolysis of silk fibroin and the anti-diabetic activity of the hydrolysates. *Int J Food Eng* 2008; 4: 13.
50. Zhu CF., Peng HB., Liu GQ., Zhang F., Li Y. Beneficial effects of oligopeptides from marine salmon skin in a rat model of type 2 diabetes. *Nutrition* 2010; 26: 1014-20.
51. Nakaoka F., Sasakawa Y., Yamamoto K., Nakao M., Nakamura M., Tong C., et al. Anti-diabetic effects of globin digest and its active ingredient Leu-Ser-Glu-Leu in ICR mice, streptozotocin-induced diabetic mice and KK-Ay mice. *Life Science* 2010; 86: 424-34.
52. Lee HJ., Lee HS., Choi JW., Ra KS., Kim JM., Suh HJ. Novel Tripeptides with  $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Activity Isolated from Silk Cocoon Hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 11522-5.
53. Yu Z., Yin Y., Zhao W., Yu Y., Liu B., Liu J., et al. Novel peptides derived from egg white protein inhibiting alpha-glucosidase. *Food Chem* 2011; 129: 1376-82.
54. Yu Z., Yin Y., Zhao W., Liu J., Chen F. Anti-diabetic activity peptides from albumin against  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase. *Food Chem* 2012; 135: 2078-85.
55. Sarmadi B., Aminuddin F., Hamid M., Saaric N., Abdul-Hamid A., Ismail A. Hypoglycemic effects of cocoa (*Theobroma cacao* L.) autolysates. *Food Chem* 2012; 134: 905-11.
56. Li-Chan EC., Hunaq SL., Jao CL., Ho KP., Hsu KC. Peptides derived from Atlantic salmon skin gelatin as dipeptidyl-peptidase IV inhibitors. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 973-78.
57. Ktari N., Mnafigui K., Nasri R., Hamden K., Bkhairia I., Ben Hadj A., et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria basilisca*) in alloxan-induced diabetic rats. *Food Funct* 2013; 4: 1691-99.
58. Lacroix IME., Li-Chan ECY. Inhibition of dipeptidyl peptidase (DPP)-IV and  $\alpha$ -glucosidase activities by pepsin-treated whey proteins. *J Agric Food Chem* 2013; 61: 7500-06.
59. Lacroix IME., Li-Chan ECY. Isolation and characterization of peptides with dipeptidyl peptidase-IV inhibitory activity from pepsin-treated bovine whey proteins. *Peptides* 54; 2014: 39-48
60. Morato PN., Lollo PCB., Moura CS., Batista TM., Carneiro EM., Amaya-Farfan J. A dipeptide and an amino acid present in whey protein hydrolysate increase translocation of GLUT-4 to the plasma membrane in Wistar rats. *Food Chem* 2013; 139: 853-59.
61. Higuchi N., Hira T., Yamada N., Hara H. Oral administration of corn zein hydrolysate stimulates GLP-1 and GIP secretion and improves glucose tolerance in male normal rats and Goto-Kakizaki rats. *Endocrinology* 2013; 154: 3089-98.
62. Jung EY., Lee HS., Lee HJ., Kim JM., Lee KW., Suh HJ. Feeding silk protein hydrolysates to C57BL/KsJ-db/db mice improves blood glucose and lipid profiles. *Nutr Res* 2010; 30: 783-90.
63. Werle M., Bernkop-Schnurch A. Strategies to improve plasma half-life time of peptide and protein drugs. *Amino Acids* 2006; 30: 351-67.
64. Ohsawa K., Satsu H., Ohki K., Enjoh M., Takano T., Shimizu M. Producibility and digestibility of

- antihypertensive  $\beta$ -casein tripeptides, Val-Pro-Pro and Ile-Pro-Pro, in the gastrointestinal tract: analyses using an *in vitro* model of mammalian gastrointestinal digestion. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 854-58.
65. Fauchere JL., Thurieau C. Evaluation of the stability of peptides and pseudopeptides as a tool in peptide drug design. *Adv Drug Res* 1992; 23: 127-59.
66. Caliceti P., Veronese FM. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Adv Drug Delivery Rev* 2003; 55: 1261-77.
67. Harris JM., Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 214-21.
68. Veronese FM., Pasut, G. PEGylation, successful approach to drug discovery. *Drug Discov Today* 2005; 10: 1451-58.



## Composés bioactifs

### Les grignons d'olives réduisent la cholestérolémie et la triglycéridémie et atténuent la peroxydation lipidique sérique chez le rat consommant un régime enrichi en cholestérol

Olives cake reduces cholesterolemia and triglyceridemia and attenuates serum lipid peroxidation in rats fed cholesterol-enriched diet

Sherazede BOUDERBALA<sup>1</sup>, Adila OUGOUAG, Jihane BENMANSOUR, Khiera MADOU, Mohammed KN. AL-HITI, Malika BOUCHENAK.

Laboratoire de Nutrition Clinique et Métabolique. Département de Biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université d'Oran. BP 1524 El M'Naouer. 31000 Oran.

Reçu le 15 avril 2014, Accepté le 29 mai 2014

<sup>1</sup>Auteur correspondant: bsherazede@yahoo.fr

**Résumé Introduction.** Les résidus d'huile d'olive après extraction représentent des ressources précieuses de nutriments susceptibles d'être utilisés comme suppléments. **Objectif.** L'effet des grignons d'olives (GO) est étudié sur les teneurs en lipides et sur la peroxydation lipidique du foie et du sérum, chez des rats consommant un régime enrichi en cholestérol. **Matériel et méthodes.** Des rats mâles de souche Wistar pesant  $80 \pm 5$  g (n=24) sont soumis pendant 28 jours à un régime contenant 20% de caséine + 1% de cholestérol (HC) supplémenté ou non avec les grignons d'olives à 2,5%, 5% et 7,5% (HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>, respectivement). **Résultats.** Les rats hypercholestérolémiques soumis aux régimes supplémentés en GO sont comparés au groupe HC. Au niveau hépatique, les teneurs en cholestérol total (CT), cholestérol libre (CL) sont significativement plus faibles chez les groupes HC-GO<sub>7,5</sub> et HC-GO<sub>5</sub>. Les teneurs en triglycérides (TG) et phospholipides (PL) sont abaissées chez les groupes HC-GO<sub>5</sub>, HC-GO<sub>7,5</sub> et HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>, respectivement (P<0,05). Au niveau sérique, le contenu en CT est 1,5-, 1,7- et 2,1-fois plus faibles chez les groupes HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>. Les concentrations en CL, TG, PL sont 1,6- et 1,8-, 4,3- et 3,5-, 1,7- et 2,2-fois diminuées chez les groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>. Les teneurs sériques en substances réactives à

l'acide thiobarbiturique sont significativement plus faibles chez groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub> (P<0,05). **Conclusion.** Chez le rat rendu hypercholestérolémique, les grignons d'olive semblent avoir à effet hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant tout en diminuant la peroxydation lipidique du sérum.

**Mots clés :** Rat, Cholestérol alimentaire, Grignons d'olive, Foie, Sérum, lipides, TBARS

**Abstract Introduction.** Olive cake, after extraction, represents precious sources of nutrients which may be used as supplements. **Objectives.** The effects of olive cake (OC) were determined on liver and serum lipids contents and lipid peroxidation in rats fed a cholesterol-enriched diet. **Material and Methods.** Male Wistar rats (n = 24) weighing 80 ± 5 g were fed a diet containing 20% casein and enriched with 1% cholesterol (HC) supplemented or not with the OC at 2.5%, 5% and 7.5% (OC<sub>2,5</sub>-HC, OC<sub>5</sub>-HC and OC<sub>7,5</sub>-HC, respectively) for 28 days. **Results.** Hypercholesterolemic rats fed diet supplemented with OC was compared to HC group. In liver, total cholesterol (TC) and unesterified cholesterol (UC) values were significantly lower in HC-GO<sub>7,5</sub> and HC-GO<sub>5</sub> groups. Triacylglycerols (TG) and phospholipids (PL) contents were decreased in HC-GO<sub>5</sub>, HC-GO<sub>7,5</sub> and HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> and HC-GO<sub>7,5</sub> groups respectively (P<0.05). In serum, TC content was 1.5- 1.7- 2.1-fold lower in OC<sub>2,5</sub>-HC, OC<sub>5</sub>-HC and OC<sub>7,5</sub>-HC groups. UC, TG and PL concentrations were 1.6- and 1.8-, 4.3- and 3.5- and 1.7- and 2.2-fold decreased in OC<sub>5</sub>-HC and OC<sub>7,5</sub>-HC groups. Serum thiobarbituric acid reactive substances contents were significantly decreased in OC<sub>5</sub>-HC and OC<sub>7,5</sub>-HC groups (P<0,05). **Conclusion.** In hypercholesterolemic rats, olive cake seems to have a hypocholesterolemic and hypotriglyceridemic effects and decreases serum lipid peroxidation.

**Keywords:** Rat, Dietary cholesterol, Olive cake, Liver, Serum, Lipids, TBARS

## Introduction

De nombreuses études se sont intéressées aux produits végétaux ainsi que leurs effets sur la prévention et/ou le traitement de certaines maladies [1]. Dans le bassin méditerranéen, la production d'huile d'olive représente un secteur économique important (environ 95% de la production mondiale) [2], dont 1% pour l'Algérie, en 2001 [3]. La production est en constante croissance, et les résidus après extraction d'huile d'olive représentent des ressources précieuses de nutriments susceptibles d'être utilisés comme suppléments. Ces résidus appelés grignons d'olive

sont composés de la peau, du résidu de la pulpe et des fragments de noyaux [4]. Ils constituent des produits importants, alors que les quantités rejetées par an sont inestimables, et deviennent, par la suite, un problème pour l'environnement écologique, en raison de leur grande disponibilité et des grandes surfaces agricoles qu'ils peuvent occuper [5]. L'effet des résidus d'olives est bien démontré. Ces produits résistent à la dégradation, puisqu'ils contiennent des polyphénols [6,7], en particulier l'hydroxytyrosol, le tyrosol, l'oleuropéine et l'acide caféique [8], et dont le taux diffère en fonction des saisons. De plus, les résidus d'olive sont riches en minéraux et en oligoéléments [9],

en pectines [10], en vitamines (tocophérols), en hydrocarbures (squalène) et en stérols ( $\beta$ -sitostérol), qui représentent un potentiel nutritionnel pour les ruminants [11]. En Algérie, aucune étude n'a été réalisée sur les résidus après extraction d'huile d'olive, d'où l'intérêt de cette étude qui consiste à déterminer leur effet sur les teneurs en lipides du foie et du sérum et sur la peroxydation lipidique, chez des rats consommant un régime enrichi en cholestérol.

## Matériel et Méthodes

### Détermination de la composition nutritionnelle des grignons d'olives

Les grignons d'olives (GO) sont collectés après extraction de l'huile d'olive (Ouest algérien), séchés à 60°C puis broyés finement. La composition nutritionnelle des grignons d'olives est déterminée. La teneur en sels minéraux s'obtient par incinération de l'échantillon à 550°C. Les lipides sont dosés selon la méthode de DELSAL (1944) [12]. Il s'agit d'une extraction à froid des lipides sur 1g d'échantillon en présence d'un mélange chloroforme/méthanol, (4/1, V/V). Les fibres totales sont dosées selon la méthode de Weende basée sur la solubilisation de la fraction non cellulosique dans des solutions d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) et d'hydroxyde de sodium (NaOH). L'analyse des protéines consiste à doser l'azote total après minéralisation selon la méthode colorimétrique de Nessler, (1957) et ensuite multipliée par un facteur conventionnel (N total x 6,25). Les polyphénols sont obtenus selon la méthode de Singleton et *al.*, [13]. La composition des grignons est présentée dans le tableau I.

**Tableau I. Caractéristiques chimiques des grignons d'olives**

	Grignons d'olives
Matières azotées (g/100g)	5,01 ± 0,20
Protéines (g/100g)	31,31 ± 1,25
Glucides (g/100g)	31,08 ± 1,02
Fibres (g/100g)	37,11 ± 2,14
Matières minérales (g/100g)	5,71 ± 0,30
Lipides (g/100g)	11,96 ± 0,43
Polyphénols (mg/g)	0,98 ± 0,12

Des rats mâles de souche Wistar (n = 24) (Iffa Credo, l'Arbresle, Lyon, France), pesant  $45 \pm 5$  g sont soumis pendant 4 jours à un régime standard contenant 20% de caséine + 0,3% de méthionine, combiné à 5% d'huile de tournesol (Tableau II). Après cette phase d'adaptation, les rats sont divisés en 4 groupes: un groupe hypercholestérolémique (HC) consomme le même régime enrichi avec 1% de cholestérol et 0,5% d'acide cholique pendant 28 jours. Les trois autres groupes hypercholestérolémiques sont soumis au même régime enrichi avec 1% de cholestérol et 0,5% d'acide cholique et supplémenté avec des grignons d'olives à 2,5%, 5% et 7,5% (HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>, respectivement) pendant 28 jours.

Les animaux sont placés dans une animalerie où la température est maintenue à 22°C, avec un rythme circadien de 12h jour/ 12h nuit et une hygrométrie constante de 60%. L'eau et la nourriture sous forme de poudre sont données à volonté. Les conseils pour la protection et l'utilisation des animaux de laboratoire sont suivis [14] et le protocole et l'utilisation de rats ont été approuvés par le comité d'éthique de notre Université. Afin d'évaluer la digestibilité des lipides, les six rats de chaque groupe soumis ou non au régime contenant les grignons d'olives sont placés individuellement dans des cages à métabolisme durant toute l'expérimentation. Les animaux et la quantité de nourriture ingérée sont pesés quotidiennement. Les fèces sont collectées du 21<sup>ème</sup> au 28<sup>ème</sup> jour de l'expérimentation, débarrassées de toute nourriture, séchées dans une étuve à 60°C, broyées et conservées à -20°C.

### Prélèvement du sang et du foie

Au 28<sup>ème</sup> jour de l'expérimentation, après 12 h de jeûne, 6 rats de chaque lot sont anesthésiés par injection intra péritonéale de pentobarbital sodique (6 mg/100 g de poids corporel) (Coopération Pharmaceutique Française, 77000, Melun). Le sang est prélevé par l'aorte abdominale puis recueilli dans des tubes secs et centrifugé à 4000 trs/min pendant 15 min à 4°C. Le sérum est conservé à -20°C avec de l'EDTA-Na<sub>2</sub> à 0,1% (P/V). Le foie est rincé avec une solution de NaCl à 0,9%, excisé, séché, pesé et conservé à -20°C.

**Analyses biochimiques****Détermination des teneurs en lipides totaux**

La quantité des lipides totaux est déterminée selon la technique de Delsal (1944) [12] décrite précédemment.

**Détermination des différents composants lipidiques hépatiques et sériques**

Le cholestérol total (CT) et les triglycérides (TG), le cholestérol libre (CL) et les phospholipides (PL) sont déterminés respectivement par une méthode colorimétrique enzymatique (Kit Biocon, Germany, Kit CHOD-PAP et BIOLABO SA, France et Cypress, Belgium). Le cholestérol estérifié (CE) est obtenue par différence entre CT et CL puis multiplié par 1,67 (poids moléculaire moyen d'un acide gras qui estérifie le cholestérol) pour calculer les esters de cholestérol (EC).

**Mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) du foie et du sérum**

Les teneurs sériques en TBARS sont déterminées par la méthode de Quintanilha *et al.*, (1982) [15] sur

0,5 mL de sérum dilué avec de l'eau distillée (qsp 1 mL) (la concentration finale en protéines est d'environ 2 mg/mL). À cette solution sont rajoutés 2 mL de mélange réactionnel contenant 0,017 mM d'acide thiobarbiturique (TBA) (Sigma-Aldrich Chemie, Germany) et 3,36  $\mu$ M de buthyl-hydroxy-toluène (BHT) (Sigma-Aldrich Chemie, Germany). Après incubation à 100°C pendant 15 min et refroidissement dans de la glace, les échantillons sont centrifugés 10 min à 2000 x g. La lecture se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 535 nm. Le malondialdéhyde (MDA) (Sigma-Aldrich Chemie, Germany) est utilisé pour établir une courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en nmol de TBARS.L<sup>-1</sup> de sérum. La peroxydation lipidique du foie est déterminée par la mesure des TBARS selon la technique d'Ohkawa *et al.*, (1979) [16] sur 100 mg de tissu sont broyés dans 0,9 mL de KCl à 1,15%. Le milieu réactionnel contient 0,2 mL d'homogénat tissulaire, 0,2 mL d'une solution contenant du sodium dodecyl sulfate (Sigma-Aldrich Chemie, Germany) à 8,1% et 1,5 mL d'acide acétique à 20% (pH 3,5) et 1,5 mL de TBA à 0,8%

Tableau II. Composition des régimes en g/kg de régime<sup>1</sup>

Ingrédients	Caséine	Caséine + GO 2,5%	Caséine + GO 5%	Caséine + GO 7,5%
Caséine <sup>2</sup>	200	200	200	200
Méthionine <sup>3</sup>	3	3	3	3
Grignon d'olive <sup>4</sup>	-	25	50	75
Amidon de maïs <sup>5</sup>	582	557	532	507
Saccharose <sup>6</sup>	40	40	40	40
Huile de tournesol <sup>7</sup>	50	50	50	50
Cellulose <sup>8</sup>	50	50	50	50
Mélange vitaminique <sup>9</sup>	20	20	20	20
Mélange minéral <sup>10</sup>	40	40	40	40
Cholestérol <sup>11</sup>	10	10	10	10
Acide cholique <sup>12</sup>	5	5	5	5

<sup>1</sup>Les régimes sont iso-énergétiques et donnés sous forme de poudre. <sup>2</sup>Prolabo-Paris France. <sup>3,11,12</sup> Merck, Darmstadt, Germany. <sup>4</sup>Extrait au laboratoire. <sup>5</sup>ONAB, Sidi Bel Abbès, Algérie. <sup>6</sup>ENASUCRE, Sfisef, Algérie. <sup>7</sup>CEVITAL, Bejaïa, Algérie. <sup>8</sup>Prolabo, Paris, France. <sup>9</sup>UAR 200 (Villemoisson, 91360, Epinay, S/Orge, France), Mélange vitaminique (mg/kg de régime): Vit A, 39600UI; Vit D3, 5000UI; Vit B1, 40; Vit B2, 30; Vit B3, 140; Vit B6, 20; Vit B7, 300; Vit B12, 0,1; Vit C, 1600; Vit E, 340; Vit K 3,80; Vit PP, 200; Choline, 2720; Acide folique, 10; Acide PAB, 100; Biotine, 0,6; Cellulose qsp, 20g. <sup>10</sup>UAR 205B (Villemoisson, 91360, Epinay, S/Orge, France), Mélange minéral (mg/kg de régime) CaHPO<sub>4</sub>, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO<sub>2</sub>, 420; MgSO<sub>4</sub>, 2000; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 120; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O, 200; MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O, 98; CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O, 20; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O, 80; CuSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O; KI, 0,32.



sont rajoutés, le volume final est ajusté avec 4 mL d'eau distillée puis chauffé à 95°C pendant 60 min. Après refroidissement, 1 mL d'eau distillée et 5 mL d'un mélange n-butanol-pyridine (15:1, V:V) sont rajoutés dans des tubes puis sont vigoureusement agités et centrifugés à 200 x pendant 10 min. Les TBARS hépatiques sont estimés par spectrophotométrie à 532 nm, utilisant le MDA comme courbe de référence. Les résultats sont exprimés en nmol.mg<sup>-1</sup> de protéines tissulaires.

### Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  erreur standard (M $\pm$ ES) de 6 rats par groupe. La comparaison entre les groupes de rats hypercholestérolémiques soumis à un régime supplémenté avec des grignons d'olive (HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub> respectivement) ou non (HC) est réalisée par le test 't' de student (Logiciel Statistica, Statsoft 97). Les moyennes sont considérées comme significativement différentes à P<0,05.

## Résultats

### Poids corporel, nourriture ingérée, digestibilité des lipides et valeurs absolue et relative du poids du foie (Tableau III)

Après 28 jours de consommation du régime supplémenté en grignons d'olives, le poids corporel est

1,5- et 1,2-fois plus faible chez les groupes HC-GO<sub>2,5</sub> et HC-GO<sub>5</sub> respectivement, comparés au groupe HC, alors qu'aucune différence significative n'est notée chez le groupe HC-GO<sub>7,5</sub>. La nourriture ingérée est 1,3-fois plus faible chez le groupe HC-GO<sub>2,5</sub> comparé au groupe HC, alors qu'elle est similaire chez les groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>. L'apport en lipides et en cholestérol est semblable chez les différents groupes. L'excrétion fécale des lipides est 2,8-fois plus faible chez le groupe HC-GO<sub>5</sub> comparé au groupe HC, alors qu'aucune différence significative n'est notée chez les groupes HC-GO<sub>2,5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>. Cependant, l'excrétion fécale du cholestérol est 2,9-, 2,3- et 2,4-fois plus élevée chez les groupes HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub> par rapport au groupe HC. La digestibilité des lipides est semblable chez les différents groupes hypercholestérolémiques supplémentés ou non avec les grignons d'olives. Le poids du foie est significativement diminué chez les groupes hypercholestérolémiques soumis aux régimes supplémentés, respectivement avec 5 et 7,5% de grignons d'olives, comparés au groupe HC (p<0,05). Le poids relatif du foie (exprimé en g.100<sup>-1</sup>g de PC), qui renseigne sur l'évolution de l'organe par rapport à celle de l'organisme entier est 1,5- fois augmenté chez les groupes HC-GO<sub>2,5</sub>, et 1,4- et 1,3- fois diminué chez HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>, respectivement comparés au groupe HC.

Tableau III. Poids corporel, nourriture ingérée, digestibilité des lipides et poids du foie

	HC	HC-GO <sub>2,5</sub>	HC-GO <sub>5</sub>	HC-GO <sub>7,5</sub>
Poids corporel (g)	230,00 $\pm$ 10,11	150,00 $\pm$ 11,17*	190,00 $\pm$ 13,40*	225,00 $\pm$ 9,50
Nourriture ingérée (g.j <sup>-1</sup> .rat <sup>-1</sup> )	19,00 $\pm$ 2,50	15,00 $\pm$ 1,40*	16,00 $\pm$ 0,90	20,00 $\pm$ 1,17
Lipides ingérés (mg.j <sup>-1</sup> .rat <sup>-1</sup> )	950 $\pm$ 130	750 $\pm$ 70	800 $\pm$ 40	1000 $\pm$ 60
Lipides fécaux (mg.j <sup>-1</sup> .rat <sup>-1</sup> )	28,9 $\pm$ 8,1	17,5 $\pm$ 0,3	10,5 $\pm$ 0,5*	27,0 $\pm$ 3,6
Cholestérol ingéré (mg.j <sup>-1</sup> .rat <sup>-1</sup> )	190 $\pm$ 30	150 $\pm$ 10	160 $\pm$ 10	200 $\pm$ 10
Cholestérol fécal (mg.j <sup>-1</sup> .rat <sup>-1</sup> )	0,022 $\pm$ 0,006	0,065 $\pm$ 0,005*	0,051 $\pm$ 0,016*	0,052 $\pm$ 0,004*
Digestibilité des lipides (%)*	96,96	96,87	98,69	97,30
Poids du foie (g)	8,5 $\pm$ 0,3	7,97 $\pm$ 1,18	4,89 $\pm$ 0,61*	6,20 $\pm$ 0,28*
Poids relatif du foie (g.100 <sup>-1</sup> g PC)	3,7 $\pm$ 0,1	5,33 $\pm$ 0,87*	2,57 $\pm$ 0,29*	2,75 $\pm$ 0,11*

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de student. \*P<0,05. HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> ou HC-GO<sub>7,5</sub>: groupes hypercholestérolémiques supplémentés, respectivement avec 2,5, 5 ou 7,5% de grignons d'olive, HC: groupe hypercholestérolémique.

\*Digestibilité des lipides = [(lipides ingérés – lipides excrétés)/lipides ingérés] x 100

Tableau IV. Teneurs en lipides du foie ( $\mu\text{mol.g}^{-1}$ ) et du sérum ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )

	HC	HC-GO <sub>2,5</sub>	HC-GO <sub>5</sub>	HC-GO <sub>7,5</sub>
<b>Sérum</b>				
CT	7,40±1,01	4,95±0,73*	4,28±0,56*	3,52±0,42*
TG	2,18±0,94	1,42±0,57	0,51±0,19*	0,61±0,14*
CL	0,59±0,03	0,62±0,07	0,38±0,007*	0,32±0,07*
PL	3,79±0,12	2,93±0,56	2,24±0,57*	1,68±0,58*
EC	11,20±1,77	6,73±0,95*	6,52±0,93*	5,47±0,64*
<b>Foie</b>				
CT	118,72±37,80	139,87±15,75	113,06±24,24	95,62±17,19*
CL	60,88±2,52	65,25±3,62	50,81±3,25*	53,25±7,62
TG	48,28±5,56	39,96±3,18	37,72±0,01*	17,66±4,43*
PL	69,56±3,52	51,35±2,24*	58,32±1,78*	50,94±9,19*
EC	129,73±32,90	124,62±23,30	127,26±1,15	54,33±17,91*

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de student. \* $P<0,05$ . HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> ou HC-GO<sub>7,5</sub>: groupes hypercholestérolémiques supplémentés, respectivement avec 2,5, 5 ou 7,5% de grignons d'olive, HC: groupe hypercholestérolémique. EC: esters de cholestérol, CL: cholestérol libre, CT: cholestérol total, PL: phospholipides, TG: triglycérides.

( $p<0,05$ ). Le poids relatif du foie (exprimé en  $\text{g.100}^{-1}$  g de PC), qui renseigne sur l'évolution de l'organe par rapport à celle de l'organisme entier est 1,5-fois augmenté chez les groupes HC-GO<sub>2,5</sub>, et 1,4- et 1,3-fois diminué chez HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>, respectivement comparés au groupe HC.

#### Teneurs en lipides du foie et du sérum (Tableau IV)

Au niveau hépatique, les teneurs en cholestérol (CT) total ne présentent aucune différence significative chez les groupes consommant le régime supplémenté avec 2,5% et 5% de grignons d'olives, alors que les valeurs sont 1,3-fois plus faibles chez le groupe HC-GO<sub>7,5</sub> comparés au groupe HC. Les concentrations en cholestérol libre (CL) sont 1,2-fois plus faibles chez le groupe HC-GO<sub>5</sub>, comparé au groupe HC. Les teneurs en esters de cholestérol (EC) sont significativement diminuées chez le groupe HC-GO<sub>7</sub>, comparé au groupe HC ( $P<0,05$ ). Les concentrations en triglycérides (TG) sont 1,3-et 2,7-fois plus faibles chez les groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub> comparés au groupe HC. Le contenu en phospholipides (PL) est réduit chez les groupes HC-GO<sub>2,5</sub> (-74%), HC-GO<sub>5</sub> (-84%) et HC-GO<sub>7,5</sub> (-73%), comparés au groupe HC. Au niveau sérique, les teneurs en CT sont réduites de 67%, 58% et 48% respectivement, chez les groupes HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub> comparés au groupe HC. Les valeurs du CL sont

diminuées de 64% et 54%, respectivement chez les groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub> par rapport au groupe HC. Une diminution significative des concentrations en EC est notée chez les groupes HC-GO<sub>2,5</sub> (-60%), HC-GO<sub>5</sub> (-58%) et HC-GO<sub>7,5</sub> (-49%), comparés au groupe HC. Les valeurs des TG sont 4,3- et 3,5-fois plus faibles respectivement, chez les groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>. Les teneurs en PL sont 1,7-et 2-fois plus faibles chez les groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub> comparés au groupe HC, alors que ces valeurs ne présentent aucune différence significative chez le groupe HC-GO<sub>2,5</sub>.

#### Teneurs en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) (Tableau V)

Comparé au groupe HC, les teneurs sériques en TBARS sont 1,4-fois plus faibles chez les groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>. Au niveau du foie, aucune différence significative n'est notée entre les différents groupes hypercholestérolémiques supplémentés ou non avec les grignons d'olives.

## Discussion

Dans ce travail, l'effet des grignons d'olives sur les teneurs en lipides et sur la peroxydation lipidique du foie et du sérum est étudié chez le rat rendu hypercholestérolémique, par ingestion d'un régime

**Tableau V. Teneurs en substances réactives à l'acide thiobarbiturique du foie et du sérum**

	HC	HC-GO <sub>2,5</sub>	HC-GO <sub>5</sub>	HC-GO <sub>7,5</sub>
Sérum (mmol.L <sup>-1</sup> )	15,05±4,58	15,67±5,08	10,73±1,37*	10,65±2,20*
Foie (mmol.mg <sup>-1</sup> protéines)	4,30±0,20	6,20±2,40	4,00±1,30	5,60±1,20

Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ES de 6 rats par groupe. La comparaison des moyennes est effectuée par le test 't' de student. \*P<0,05. HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> ou HC-GO<sub>7,5</sub>: groupes hypercholestérolémiques soumis aux régimes supplémentés, respectivement avec 2,5, 5 ou 7,5% de grignons d'olive, HC: groupe hypercholestérolémique.

enrichi en cholestérol. Le modèle utilisé est le rat en croissance qui a suffisamment d'analogies avec l'espèce humaine sur le plan métabolique, souvent utilisé dans l'étude des effets des régimes alimentaires sur le métabolisme lipidique. En général, les régimes enrichis en cholestérol alimentaire entraînent une augmentation du poids corporel chez le rat [17]. Après 28 jours d'expérimentation, le poids corporel est diminué chez les groupes HC-GO<sub>2,5</sub> et HC-GO<sub>5</sub> comparés au groupe HC, ce qui peut être dû probablement à la faible quantité de nourriture ingéré par ces animaux. Chez le groupe HC-GO<sub>7,5</sub>, le poids augmente et devient similaire à celui du groupe HC, ce qui laisse suggérer que les grignons d'olive à cette dose ont bien été acceptés par le rat. Fki *et al.*, [18] ont observé une diminution du poids corporel chez les rats soumis à un régime supplémenté en cholestérol (1%) et traités avec de l'hydroxytyrosol extrait des grignons d'olive pendant 16 semaines.

Suanarunsawat *et al.*, [19] ont montré que chez le rat hypercholestérolémique, le poids du foie est 3-fois plus important comparé au rat témoin. Nos résultats montrent que le poids du foie est diminué chez les groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>. D'autre part, le poids relatif du foie qui renseigne sur l'évolution de l'organe par rapport à celle de l'organisme, est plus élevé chez le groupe HC-GO<sub>2,5</sub>, cette augmentation est probablement due à une accumulation des lipides au niveau hépatique. Par ailleurs, le poids relatif est diminué chez les groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub> par rapport au groupe HC, ceci peut être due à la quantité des grignons d'olives contenant de l'huile riche en acide oléique et en polyphénols et qui pourrait réduire l'accumulation des lipides au niveau du foie. Le foie est le principal organe responsable du maintien de l'homéostasie du cholestérol. Plusieurs études ont montré que, chez

le rat soumis à un régime enrichi en cholestérol, les teneurs hépatiques en cholestérol [19] et en triglycérides [17] sont augmentées, comparé au témoin. La consommation de grignons d'olives diminue les teneurs en CT, TG et PL au niveau du foie, en particulier chez le groupe HC-GO<sub>7,5</sub> comparé au groupe HC, ce qui est probablement due à une synthèse diminuée et/ou un catabolisme augmenté du contenu hépatique en TG et en cholestérol. Plusieurs travaux ont montré l'effet du cholestérol alimentaire sur la cholestérolémie. La supplémentation des régimes alimentaires avec 0,5% de cholestérol et 0,5% d'acide cholique [20] ou avec deux doses de cholestérol (0,5% et 4%) avec ou sans acide cholique [21] entraîne une augmentation du CT sérique. Nos résultats montrent que la consommation des grignons d'olives, quelle que soit la dose administrée (2,5%, 5% ou 7,5%), diminue les teneurs sériques en cholestérol, laissant suggérer que les grignons d'olives agissent sur les deux enzymes clés du métabolisme du cholestérol: l'hydroxy-méthylglutary-coenzyme A réductase, enzyme responsable de la régulation de la biosynthèse du cholestérol et la cholestérol 7 $\alpha$ -hydroxylase, enzyme impliquée dans la transformation du cholestérol en acides biliaires. Chez les groupes HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub> comparés au groupe HC, une élimination considérable du cholestérol au niveau fécal est notée, probablement due à une baisse de l'absorption intestinale du cholestérol. De plus, nos résultats montrent une diminution des teneurs sériques en TG chez les groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>. L'effet hypotriglycéri-démiant peut être expliqué probablement par l'augmentation du catabolisme des lipoprotéines de très faible densité (VLDL), fraction qui permet l'exportation des TG hépatiques due à une augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase post-héparinée,

enzyme localisée au niveau de l'endothélium des capillaires sanguins de nombreux tissus périphériques. Cette enzyme hydrolyse les TG des VLDL en libérant des acides gras qui sont soit captés par le tissu adipeux en vue de leur stockage, ou bien captés par le muscle pour être oxydés, conduisant ainsi à la formation de particules ayant perdu les deux tiers de leur contenu en TG, appelés «remnants des VLDL» qui sont eux même captés via des récepteurs spécifiques situés au niveau du foie. Les produits collectés après extraction de l'huile d'olive contiennent des pectines [22]. Plusieurs études ont montré que les pectines contenus dans les végétaux et les fruits réduisent la cholestérolémie et augmentent l'activité de la lipoprotéine lipase du tissu adipeux qui peut être responsable de la diminution des TG sériques [23]. L'effet hypotriglycéridémiant et hypocholestérolémiant des polyphénols contenus dans les grignons d'olives est bien démontré. Chez les rats, la consommation d'un régime enrichi en cholestérol et supplémenté avec de l'oléuropéine, l'oléuropéine aglycone ou l'extrait hydroxytyrosol obtenus à partir des grignons d'olives réduisent les teneurs en CT et TG au niveau sérique [18]. Nos résultats indiquent que les doses de grignons d'olives à 2,5%, 5% et 7,5% contiennent suffisamment de polyphénols pour induire une diminution des teneurs en CT et en TG. La peroxydation lipidique, induite par les radicaux libres ou le stress oxydatif est connue dans la pathogenèse de plusieurs maladies, le niveau des TBARS étant un bon indicateur.

L'hypercholestérolémie induit non seulement l'athérosclérose, mais produit également un grand nombre de radicaux libres dans le sang et les tissus. Malgré l'activité antioxydante des grignons d'olives démontré par certains auteurs [24], nos résultats ne présentent aucune différence significative dans les teneurs en TBARS au niveau hépatique, chez tous les groupes consommant le régime à base de grignons d'olive (HC-GO<sub>2,5</sub>, HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub>), alors qu'elles sont diminuées au niveau sérique chez groupes HC-GO<sub>5</sub> et HC-GO<sub>7,5</sub> ce qui laisse suggérer que ces doses sont suffisantes pour réduire la peroxydation lipidique au niveau sérique.

## Conclusion

En conclusion, il ressort de cette étude que chez le rat rendu hypercholestérolémique, la supplémentation des régimes avec les grignons d'olives, en particulier avec la dose 7,5%, entraîne une augmentation du poids corporel et réduit les teneurs en lipides dans le foie. De plus, ces grignons diminuent la cholestérolémie et la triglycéridémie et atténuent la peroxydation lipidique sérique entraînée par la consommation du cholestérol alimentaire.

## Remerciements

Cette étude entre dans le cadre d'un Programme National de Recherche en Sciences fondamentales (PNR N°46) financé par L'agence Thématique de Recherche en Sciences de la Santé (ATRSS).

## Conflits d'intérêts

Aucun

## Références

1. Bisht K., Wagner KH., Bulmer AC. Curcumin, resveratrol and flavonoids as antiinflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology* 2009; 211:25-4.
2. Albuquerque JA., González J., Garcá D., Cegarra J. Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two phase centrifugation method for olive oil extraction. *Waste Res* 2004; 92:195-200.
3. Lazzeri Y. Les défis de la mondialisation pour l'oléiculture méditerranéenne. Centre d'Etudes et de Recherches Internationales et Communautaires & Université Paul Cézanne Aix-Marseille III. 2009; 24: 2-3.
4. Chiofalo B., Liotta L., Zumbo A., Chiofalo V. Administration of olive cake for feeding: effect on milk yield composition. *Small Ruminant Res* 2004; 55:169-6.
5. Theodora I., Andriana E., Lazou V., Sinanoglou E. Phenolic and antioxidant potential of olive wastes. *Food Chemistry* 2010; 176:88-98.

6. Ait Baddi G., Albuquerque J.A., Gonzalez J., Cegarra J., Hafidi M. Chemical and spectroscopic analyses of organic matter transformations during composting of olive mill wastes. *Inter Biodeterior Biodegrad* 2004; 54:39-4.
7. Sayadi S., Allouche N., Jaoua M., Aloui F. Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry* 2000; 35:725-35.
8. Cardinali A., Cicco N., Linsalata V., Minervini F., Pati S., Pieralice M., et al. Biological activity of high molecular weight phenolics from olive mill wastewater. *J Agric Food Chemical* 2010; 11:8585-90.
9. Paredes C., Cegarra J., Roig A., Sanchez-Monedero MA., Bernal MP. Characterization of olive mill wastewater (alpechin) and its sludge for agriculture purposes. *Bioresource Technology* 1999; 67:111-5.
10. Cardoso SM., Coimbra MA., Lopes da Silva JA. Calcium mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydrate Polymers* 2003; 52:125-33.
11. Tabera J., Guinda A., Ruiz-Rodriguez A., Senorans F.J., Ibanez E., Albi T. et al. Countercurrent supercritical fluid extraction and fractionation of high-added-value compounds from a hexane extract of olive leaves. *J Agric Food Chemical* 2004; 52:4774-9.
12. Delsal J. Nouveaux procédés d'extraction des lipides du sérum par la méthylal: application aux microdosages du cholestérol total, des phosphoaminolipides et des protides. *Bull Soc Biol* 1944; 26:99-104.
13. Singleton VL., Orthofer R., Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidant substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999; 299:152-78.
14. Council of European Communities. Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigation. Official J 1987 L358 of 18-12-1986; Corrigendum Official J. L117 of 05-05-1987.
15. Quintanilha AT., Packer L., Davies JM., Racanelli TL., Devies KJ. Membrane effects of vitamin E deficiency: bioenergetic and surface charge density studies of skeletal muscle and liver mitochondria. *Annals NY Academy Sci* 1982; 393:32-7.
16. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-58.
17. Xie N., Cui Y., Yin Y-N., Zhao X., Yang JW., Wang ZG., et al. Effects of two Lactobacillus strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC Complement Altern Med* 2011; 11:53.
18. Fki I., Sahnoun Z., Sayadi S. Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill waste water in rats fed a cholesterol-rich diet. *J Agric Food Chem* 2007; 55:624-31.
19. Suanarunsawat T., Ayutthaya DNA., Songsak T., Thirawarapan S., Pongshompoo S. Lipid-lowering and antioxidative activities of aqueous extracts of ocimum sanctum L. leaves in rats fed with a high-cholesterol diet. *Oxid Med Cell Longev* 2011; 2011:1-9.
20. Minhajuddin M., Beg ZH., Iqbal J. Hypolipidemic and antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food Chem Toxicol* 2005; 43:747-53.
21. Tanaka M., Nakaya S., Kumai T., Watanabe M., Matsumoto N., Kobayashi S. Impaired testicular function in rats with diet-induced hypercholesterolemia and/or streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Endocr Res* 2005; 27:109-17.
22. Cardoso SM., Coimbra MA., Lopes da Silva JA. Calcium mediated gelation of an olive pomace pectic extract. *Carbohydr Polym* 2003; 52:125-33.
23. Hirunpanich V., Utaipat A., Morales NP., Bunyaphatsara N., Sato Y., Herunsale A., et al. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of Hibiscus sabdariffa L. in hypercholesterolemic rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 103:252-60.
24. Lafka TI., Lazou AE., Sinanoglou VJ., Lazos ES. Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chem* 2010; 125:92-8.



## Composés bioactifs

### Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*

Antimicrobial activity of essential oil extracted from *Citrus reticulata* peels

Ali BOUGUERRA <sup>1</sup>, Louiza HIMED, Malika BARKAT

Laboratoire de Biotechnologie et Qualité des aliments (BIOQUAL).  
Département des Biotechnologies Alimentaires. Institut de la Nutrition de  
l'alimentation et des Technologies Agroalimentaires (I.N.A.T.A.A.),  
Université Constantine 1. 7<sup>e</sup> Kilomètre du centre-ville.

Reçu le 30 septembre 2013, Accepté le 09 mai 2014

<sup>1</sup>Auteur correspondant : [ali.bouguerra@umc.edu.dz](mailto:ali.bouguerra@umc.edu.dz)

**Résumé** *Introduction.* Les conservateurs alimentaires synthétiques ont été limités dans plusieurs pays, en raison de leurs effets indésirables sur la santé. En plus, la tendance actuelle des consommateurs à chercher une alimentation plus naturelle a augmenté durant ces dernières décennies. Plusieurs travaux de recherche ont été concentrés sur les extraits naturels. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques. **Objectif.** Le but de cette étude est d'évaluer *in vitro* l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*. **Matériel et Méthodes.** L'extraction a été réalisée par hydrodistillation. Afin de mettre en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles extraites et la détermination de la résistance ou la sensibilité des bactéries responsables d'altération des aliments, les méthodes de diffusion de disque et de microatmosphère ont été utilisées. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été estimées par la méthode de dilution d'Agar. **Résultats.** Les huiles essentielles des zestes de *Citrus reticulata* ont montré une activité antibactérienne contre *Bacillus cereus* plus élevée que celle de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Escherichia Coli* ATCC 25922. La méthode de microatmosphère des huiles essentielles des écorces de *Citrus reticulata* a permis de constater une absence totale de l'activité inhibitrice à une dose de 5µl/boîte. Les CMI obtenues de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *E. Coli* ATCC 25922 sont de 1%, 2% et >2% respectivement. **Conclusion.** Ces résultats laissent suggérer que les huiles essentielles des écorces de *Citrus reticulata* peuvent éventuellement remplacer les conservateurs chimiques.

**Mots clés :** *Activité antimicrobienne, Méthode de diffusion, Microatmosphère, Huile essentielle, CMI, Citrus reticulata*

**Abstract Introduction.** The synthetic food conservatives are limited in several countries, because of their undesirable effects on health. Moreover, the current trend of the consumers seeks a more natural food increased during these last decades. Several research tasks have concentrated on the natural extracts. The various results published have indicated that they are endowed with several biological properties. **Objective.** The aim of this study was to evaluate *in vitro* the antimicrobial activity of the essential oil extracted from *Citrus reticulata* peel. **Material and Methods.** The extraction was carried out using hydrodistillation. The disc diffusion and the microatmosphere methods were used in order to highlight the antimicrobial activity of the extracted essential oils and the sensitivity of some bacteria involved in food deterioration. Minimal inhibiting concentrations (MIC) was estimated by the agar dilution method. **Results.** Antimicrobial activity of *Citrus reticulata* peel essential oils extract against *Bacillus cereus* was higher than that of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *E. Coli* ATCC 25922. The microatmosphere method showed that there was no inhibiting activity when using 5µL/plate. The observed MIC for *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Escherichia Coli* ATCC 25922 were 1%, 2% and >2% respectively. **Conclusion.** These results suggest that the essential oils of *Citrus reticulata* peel could probably replace the conservative chemical agents.

**Keywords :** *Antimicrobial activity, Disc diffusion method, Microatmosphere, Essential oils, MIC, Citrus reticulata*

---

## Introduction

La valeur alimentaire est modifiée par la présence et la prolifération des microorganismes qui consomment des molécules à haute valeur énergétique [1]. Dans la plupart des cas d'altération, les microorganismes présents sur l'aliment ainsi que les produits de leur activité métabolique, ne constituent pas un réel danger pour la santé du consommateur. Cependant, le développement dans un aliment de certaines espèces microbiennes peut être à l'origine d'intoxications [2]. Les conservateurs alimentaires synthétiques font partie de la panoplie des techniques et des moyens qui permettent d'assurer la sécurité du consommateur, de rallonger la durée de vie des produits alimentaires et de limiter leurs altérations par les micro-organismes [3]. En raison de son efficacité et de son application facile et

pratique, l'utilisation des produits chimiques constitue à l'heure actuelle la technique la plus utilisée pour lutter contre les microorganismes nuisibles. Par la suite, plusieurs conservateurs synthétiques ont été limités dans plusieurs pays, en raison de leurs effets toxicologiques indésirables à long terme, y compris la cancérogénicité [4]. Pour cela, le retour vers le naturel est devenu indispensable. Cependant, il doit suivre certaines conditions en vue de son utilisation dans le monde vaste des anti-infectieux, qui s'élargit d'un jour à l'autre avec des substances plus puissantes, plus toxiques et plus coûteuses. Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antimicrobiennes [5] et pourraient servir d'agents de conservation alimentaire, ou approuvés comme additifs alimentaires. Dans la famille des *Rutaceae*, le genre *Citrus* est reconnu à travers les vertus de ses huiles essentielles qui peuvent avoir de multiples activités, à titre d'exemple des activités

biologiques. L'objectif de la présente étude est d'évaluer le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*, en vue de son utilisation comme agent aromatique et conservateur dans l'industrie agro-alimentaire. Ce choix est justifié par la richesse du zeste en huiles essentielles par rapport aux autres parties du fruit, la possibilité de valorisation d'un sous-produit agricole et l'absence de toxicité des huiles essentielles de la mandarine, ces dernières pouvant être employées comme agent aromatique et conservateur naturel.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Le matériel végétal choisi dans la présente étude est représenté par les écorces (zestes) de *Citrus reticulata*. La mandarine a été récoltée à la fin du mois de février 2011, durant laquelle le fruit était mature, au niveau de la région de Boumehra Ahmed (Wilaya de Guelma). La mandarine a subi un lavage, une élimination des taches et un essuyage, puis elle a été récupérée dans des sacs propres et conservée à 4°C pour servir ultérieurement à l'extraction.

### Extraction de l'huile essentielle de la mandarine

#### Principe de l'extraction

L'extraction de l'huile essentielle des écorces de la mandarine a été réalisée selon la méthode de Clevenger [6]. Cent grammes d'écorce de mandarine sont placés dans un erlenmeyer à vide de 2L contenant 600mL d'eau distillée, puis porté à ébullition. Les huiles essentielles sont alors entraînées par la vapeur d'eau et sont ensuite condensées. Le temps d'extraction est d'environ 3 heures. Le distillat obtenu est récupéré dans une ampoule à décanter. Le mélange est laissé au repos pendant 15 min. Le distillat est par la suite recueilli dans un collecteur et l'huile essentielle des écorces de mandarine est récupérée dans un flacon approprié. L'extrait d'huiles essentielles est déshydraté par le sulfate de sodium ( $Na_2SO_4$ , Biochem Chemopharma, Montréal, Québec) puis conservé à 4°C, à l'abri de l'air et de la lumière [7,8].

#### Détermination du rendement d'extraction

Selon la norme AFNOR (Association Française de

Normalisation) [9], le rendement en huile essentielle ( $R_{HE}$ ), est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction ( $M'$ ) et la masse de la matière végétale utilisée ( $M$ ). Il est donné par la formule suivante:  $R_{HE} = (M'/M) \times 100$

### Evaluation de l'activité antibactérienne

#### Origine et choix des souches bactériennes

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont des bactéries à Gram positif (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) et une bactérie à Gram négatif (*E. coli* ATCC 25922). Ces souches ont été fournies par le Service de Microbiologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Constantine. Le choix de ces souches nous a semblé d'autant plus intéressant qu'elles sont responsables de toxico-infections alimentaires.

#### Choix des milieux de culture

Pour obtenir une culture jeune de bactéries afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Citrus reticulata*, plusieurs milieux de culture ont été utilisés comme le milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, la gélose nutritive (GN) pour *Bacillus cereus* CHUC et Mac Conkey pour *E. coli* ATCC 25922.

Le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne est l'Agar de Muller Hinton (AMH) qui est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents anti-bactériens [10].

#### Préparation des suspensions bactériennes

Les bactéries à tester sont ensemencées sur des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) ou autres milieux, selon les souches, et incubées pendant 24h, afin d'obtenir une culture jeune de bactéries et des colonies isolées. A partir de ces boîtes, à l'aide d'une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 5mL de sérum physiologique stérile à 0,9% de NaCl. La suspension bactérienne est homogénéisée, et la densité optique lue à 625 nm est ajustée de 0,08 à 0,10. On admet que cette densité mesurée à 625 nm est équivalente à  $10^{+8}$  Colony Forming Units (CFU).L<sup>-1</sup> [11].



### Tests de l'activité antibactérienne

#### Méthode de diffusion

La méthode des aromatogrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle testée. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Elle permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cette huile essentielle. La méthode de diffusion sur disques appliquée est celle décrite par Hussain et al. [10], avec quelques modifications. Vingt mL d'Agar de Muller Hinton en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, la suspension bactérienne ( $10^{+8}$  CFU/ml) testée est étalée en surface. Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques de papier filtre imbibés d'huiles essentielles de *Citrus reticulata* (2 disques/boîte) sont déposés sur l'agar, précédemment inoculé avec le microorganisme choisi. Les boîtes sont maintenues à 4°C pendant 1h pour que l'huile essentielle puisse diffuser. L'érythromycine et l'acide fusidique sont utilisés comme contrôle positif, ce choix est dû à la sensibilité des souches choisies à ces antibiotiques. Les boîtes ont été incubées dans une étuve à 37°C pendant 24h. La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque en millimètre. D'après Ponce et al. [12], les résultats peuvent être symbolisés par des signes selon la sensibilité des souches vis-à-vis de l'huile essentielle : non sensible (-) ou résistante: diamètre <8mm ; sensible (+) : diamètre compris entre 9 et 14 mm ; très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm ; extrêmement sensible (+++) : diamètre > 20 mm.

#### Méthode des microatmosphères

L'activité antibactérienne des composés volatils des écorces de *Citrus reticulata* a été testée par la méthode des microatmosphères [13]. Vingt mL d'Agar Muller Hinton (AMH) en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, la suspension bactérienne à tester est étalée en surface. Un disque stérile de papier filtre (6 mm), imbibé par 5  $\mu$ L d'huile essentielle de zeste de *Citrus reticulata*, a été placé

au centre du couvercle de chaque boîte de Pétri. Les boîtes sont fermées par du parafilm (dépôt en position inversée, sur le couvercle de la boîte de Pétri). Ces dernières ont été incubées (sur le couvercle de sorte que les composés volatils puissent atteindre les souches bactériennes) à l'étuve à 37°C pendant 24h. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose de contour plus ou moins net. Les résultats sont lus avec une règle et sont exprimés par un diamètre moyen en mm [13].

#### Méthode de dilution d'agar

Cette technique donne un intervalle de valeurs de la CMI, elle est économique puisqu'elle permet de tester plusieurs souches bactériennes dans la même boîte. Pour déterminer les concentrations d'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata*, la méthode de dilution d'agar rapportée par Hammer et al. [14] a été utilisée avec quelques modifications.

Une série de dilution de l'huile essentielle de *Citrus reticulata* a été préparée en AMH (20 mL) additionnée de 0,5% (v/v) de tween 20, allant de 2% à 0,0625% (v/v). Le mélange est homogénéisé et ramené à 45°C. Ce mélange, à différentes concentrations, est immédiatement coulé dans des boîtes de Pétri (90 mm de diamètre). Après solidification de la gélose, les boîtes ont été séchées à 37°C pendant 1h. Chaque boîte de Pétri est ensuite partagée en trois parties dans lesquelles sont mises les trois souches bactériennes, sous forme de stries ( $10^{+8}$  UFC/mL). Des témoins négatifs (AMH + tween 20) sont réalisés pour chaque souche. Les boîtes de Pétri (avec et sans huile essentielle) ont été incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h. Les boîtes de Pétri, dont les concentrations ayant montré une absence totale de croissance bactérienne, ont été sélectionnées pour déterminer les CMI. Cette dernière représente la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute croissance visible à l'œil nu, après 24h d'incubation à 37°C.

#### Analyse statistique

Les différents résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  l'écart type de deux essais.

## Résultats

### Rendement

L'huile essentielle obtenue est de couleur jaune-pâle avec une odeur aromatique et un rendement de  $0,88 \pm 0,08\%$ .

### Sensibilité des bactéries à l'huile essentielle

La détermination de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* a été réalisée par la méthode de diffusion sur disques (aromatogramme). Cette dernière est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne, ensuite, viennent des méthodes plus détaillées.

Dans la présente étude, nous avons testé l'huile essentielle à une seule concentration. Selon Bagamboula *et al.* [15], il n'y a aucun rapport entre la concentration d'huile essentielle ou du composé actif et la zone d'inhibition; cette dernière semble dépendre de la capacité des huiles essentielles à diffuser uniformément sur l'agar. Généralement, les huiles essentielles sont insolubles dans l'eau, ce qui pose beaucoup de problèmes pour étudier leur activité antibactérienne.

La méthode de diffusion des disques est intensivement employée pour étudier l'activité antibactérienne des substances naturelles et des extraits des plantes. Cette technique est basée sur l'utilisation des disques comme réservoirs contenant la solution des substances à examiner. Elle nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de

l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* vis-à-vis des souches bactériennes.

Les mesures des halos d'inhibition ont permis de classer les bactéries suivant leur degré de sensibilité à l'huile essentielle de l'écorce de *Citrus reticulata*.

Dans le Tableau I, il est à noter que *B. cereus* est la bactérie la plus sensible. En effet, l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* a montré une activité contre cette bactérie à une valeur de halo d'inhibition de plus de 26 mm.

### La sensibilité bactérienne aux composés volatils des huiles essentielles

Bien que de nombreux rapports existent sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles par la méthode de contact direct (aromatogramme), des informations sur l'activité antibactérienne de la phase volatile d'huile essentielle sont rares. Les composés volatils de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* se sont avérés dépourvus d'activité antibactérienne. Dans la présente étude, la vapeur de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* n'a montré aucune activité inhibitrice à une dose de  $5\mu\text{L}/\text{boite}$ .

### Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les huiles essentielles peuvent être utiles en tant qu'agents antimicrobiens parce qu'elles affectent plusieurs cibles simultanément et il n'y a aucun

Tableau I. Diamètres (mm) des zones d'inhibition de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata*

Produit Espèce	Huile essentielle de <i>Citrus reticulata</i> ( $5\mu\text{L}/\text{disque}$ )	Degré de sensibilité	Acide Fusidique	Erythromycine
<i>Bacillus cereus</i>	$26,5 \pm 3,8$	+++	$17 \pm 1,4$	$36,5 \pm 2,1$
<i>E. coli</i> ATCC 25922	$7 \pm 0$	-	/	$10 \pm 1,4$
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	$10,5 \pm 0,7$	+	$38 \pm 1,4$	$38,5 \pm 0,7$

/ : Aucun effet inhibiteur ; - : non sensible ou résistante ; + : sensible ; +++ : Extrêmement sensible. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type

**Tableau II. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata***

<i>Souches bactériennes</i>	<i>CMI (%)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	1%
<i>Bacillus cereus</i>	2%
<i>E. coli</i>	> 2%

rapport de résistance ou d'adaptation des micro-organismes à cause de la diversité des composés chimiques [16]. Plusieurs travaux ont confirmé la présence de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata*. De même, nos résultats montrent l'existence de cette activité et indiquent que les huiles essentielles des écorces de *Citrus reticulata* ont une activité antibactérienne qui n'est pas négligeable. Avant d'utiliser une molécule antibactérienne comme conservateur dans un aliment, la concentration minimale inhibitrice (CMI) doit être estimée. Par conséquent, ces concentrations sont mesurées dans le but de définir les frontières de l'acceptabilité sensorielle et l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles [17]. Dans ce contexte les valeurs des CMI de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata* de la mandarine sont déterminées par la méthode de dilution d'agar et sont présentées dans le Tableau II. L'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* n'a pas montré une bonne susceptibilité contre les trois souches bactériennes, suite aux valeurs élevées de CMI.

## Discussion

D'après la classification de Ponce *et al.* [12], *B. cereus* est extrêmement sensible à l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata*. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les bactéries à Gram+ possèdent des dispositifs structuraux qui sont plus susceptibles aux huiles essentielles.

Bien que la bactérie *Staphylococcus aureus* est à Gram<sup>+</sup>, et selon les résultats obtenus, elle représente un degré de sensibilité (10,5 mm) plus faible que *B. cereus*. Ceci peut être expliqué par le fait que les composants actifs d'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* auraient des difficultés pour détruire les *Staphylococcus aureus* à cause

de leur association en amas. Selon Bassole *et al.* [18], les staphylocoques sont déjà connus par leur antibio-résistance.

Les résultats obtenus montrent que les souches bactériennes testées n'ont pas la même zone d'inhibition, ce qui signifie que le type de bactérie est un facteur important influençant l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Ces résultats ont été déjà rapportés par plusieurs auteurs, notamment Hammer *et al.* [14]. Il est bien connu que les espèces bactériennes n'ont pas la même sensibilité vis-à-vis d'un agent antibactérien. De même, dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Ainsi, l'action antibactérienne est parfois partielle et après une diminution du nombre de bactéries, il y a une reprise de la croissance bactérienne. Malgré l'existence des zones d'inhibition relativement faibles, nos résultats montrent l'existence d'une activité antibactérienne contre les trois souches testées, qui sont des microbes pathogènes impliqués dans les intoxications alimentaires, d'où l'intérêt d'estimer les CMI. En effet, les trois souches testées ont exprimé une résistance considérable vis-à-vis de l'huile essentielle vue l'absence totale des halos d'inhibition pour les trois souches. La méthode de microatmosphère n'a pas été concluante pour l'huile essentielle de l'écorce de mandarine, ceci pourrait être expliqué par le fait que les composants d'huile essentielle de *Citrus reticulata* ne sont pas actifs. D'après Kalemba & Kunicka [19], la sensibilité d'un microorganisme aux huiles essentielles dépend des propriétés de l'huile essentielle et du microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries à Gram<sup>+</sup> sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries à Gram<sup>-</sup>. Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des huiles essentielles confirment ce phénomène [20,21]. Les interactions entre les agents émulsifiants (Tween 20) et les constituants des huiles essentielles représentent un facteur important pour la mesure de leur activité antibactérienne car elles peuvent diminuer l'activité antimicrobienne [14]. L'absence de relation entre les trois méthodes d'étude pourrait s'expliquer par l'environnement où se trouve l'huile essentielle ainsi que le type de contact. Dans la méthode de diffusion, les constituants actifs ont trouvé une

difficulté pour diffuser sur la gélose, alors qu'avec la méthode de dilution, les constituants actifs sont en émulsion avec les ingrédients du milieu de culture et sont donc en contact direct avec les constituants du milieu de culture.

En revanche, dans la méthode des microatmosphères, les molécules ne sont pas en contact direct (état volatil).

Beaucoup de questions technologiques devraient être soulevées avant que de nouveaux conservateurs naturels puissent être considérés comme additifs. Le mécanisme d'action, la solubilité et la stabilité dans les aliments, l'impact sur la saveur ou la couleur du produit et la concentration appropriée requise sont importants pour les industries alimentaires. Dans beaucoup de cas, des antimicrobiens d'origine naturelle n'ont pas pu répondre à certaines de ces questions (la solubilité, l'odeur et la couleur sont les limites les plus communes).

Indépendamment des questions ou des préoccupations mentionnées tout en recherchant de nouvelles sources de conservateurs naturels, la culture des plantes ou les conditions climatiques devraient être prises en considération. Ces facteurs influencent la composition des plantes et donc leurs propriétés. Néanmoins, la recherche devrait se poursuivre pour trouver des sources prometteuses d'antioxydants et d'antimicrobiens ou effectuer des investigations détaillées, sur l'optimisation des techniques d'isolement, sur des études biochimiques vers la sûreté des sources nouvellement découvertes, et la disponibilité biologique des composés actifs.

## Conclusion

L'objectif de la présente étude est d'évaluer *in vitro* l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle extraite des écorces de *Citrus reticulata*, afin de la proposer comme agent aromatique et conservateur dans les industries agro-alimentaires. L'huile essentielle des zestes de *Citrus reticulata* a montré une activité antibactérienne contre *Bacillus cereus* plus élevée que celle de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *E. Coli* ATCC 25922. La méthode des microatmosphères a permis de constater l'absence totale d'activité inhibitrice des composés volatils de l'huile essentielle à une dose de

5µL/boîte. Les CMI obtenues de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *E.Coli* ATCC 25922 sont de 1, 2 et >2%, respectivement.

Au vu de ces résultats, l'huile essentielle des écorces de *Citrus reticulata* semble avoir un pouvoir antibactérien non négligeable. Par conséquent, il serait intéressant de tester cette huile dans les aliments pour développer de nouveaux agents antibactériens et pour empêcher ou ralentir la détérioration des denrées alimentaires.

## Conflit d'intérêts

Les auteurs n'ont aucun conflit d'intérêt vis-à-vis de cet article.

## Références

1. Guiraut JP. Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris : 2003; p.110-112.
2. Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G., Bourdais EV. Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Lavoisier, Paris, 2002; p.100-106.
3. Multon JL. Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries agroalimentaires. Paris: Lavoisier, 2002; p. 207-231.
4. Barkat M., Bouguerra A. Study of the antifungal activity of essential oil extracted from seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. For its use as food conservative. *Afric J Food Sci* 2012; 6(9): 239-44.
5. Valnet M. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth International. *J Food Microbiol* 2005; 85:73-81.
6. Clevenger JF. Apparatus for the determination of volatile oil. *J Am Pharm Assoc*, 1928; 17:345-9.
7. Bajpai VK., Shukla S., Kang SC. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Biores Technol* 2008; 99:8903-08.
8. Bruneton J. Pharmacognosie, Phytochimie. Plantes médicinales. Technique et documentation. 3<sup>e</sup> édition, Lavoisier, Paris : 1999 ; 1120p.
9. AFNOR. Recueil des Normes Françaises «huiles essentielles», AFNOR. Paris : 1986; 57p.

10. Hussain Al., Anwar F., Chatha SAS., Jabbar A., Mahboob S., Nigam PS. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian J Microbiol* 2010;41:1070-08.
11. OMS. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale. 4<sup>e</sup> Edition, *MSPRH selon les recommandations de l'OMS*, Algérie, 2005; 115 p.
12. Ponce AG., Fritz R., Del Valle C., Roura SI. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm Wiss Technol* 2003; 36:679-84.
13. Deans SG., Ritchie G. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int J Food Microbiol* 1987; 5:162-80.
14. Hammer KA., Carson CF., Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999; 86(6):985-90.
15. Bagamboula CF., Uyttendaele M., Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol* 2004; 21:33-42.
16. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem Toxicol* 2008: 446-75.
17. Tiwari BK., Valdramidis VP., O'donnell CP., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen PJ. Application of natural antimicrobials for food preservation. *J Agric Food Chem* 2009;57: 5987-6000.
18. Bassole HN., Kabore Z., Traore AS. Étude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliqués dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. *Pharm Méd Trad Afi* 2002; 11 : 113-22.
19. Kalembe D., Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Cur Med Chem* 2003; 10: 813-29.
20. Poole K. Multidrug resistance in Gramnegative bacteria. *Cur Opinion Microbiol* 2001; 4:500-8.
21. Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruyne T., Hermans N. *et al.* Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharm* 2002;79 : 213-20.



## Composés bioactifs

### ***Olea europaea* leave extracts and allopurinol alleviate oxidative stress in liver rats induced by oxonate**

L'extrait des feuilles d'*Olea europaea* et de l'allopurinol atténue le stress oxydatif du foie des rats induit par l'oxonate

Nesrine GDOURA<sup>1#</sup>, Imen GHORBEL<sup>2</sup>, Jean-Claude MURAT<sup>3</sup>, Khansa CHAABOUNI<sup>4</sup>, Fatma MAKNI-AYEDI<sup>4</sup>, Abdelfattah EL FEKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Animal Ecophysiology Laboratory, Life Sciences Department, UR 09-06, Sfax Faculty of Sciences, BP 1171, 3000 Sfax, University of Sfax, Tunisia.

<sup>2</sup>Animal Physiology Laboratory, Life Sciences Department, UR 08-73, Sfax Faculty of Sciences, BP1171, 3000, University of Sfax, Tunisia. <sup>3</sup>Cell Biology Laboratory, Faculty of Medicine, 37, allées Jules-Guesde, 31073 Toulouse, France. <sup>4</sup>Biochemistry Laboratory, CHU Habib Bourguiba, University of Sfax, Tunisia.

Received on 6<sup>th</sup> April, Accepted on 8<sup>th</sup> June 2014

#Corresponding author: [ngdoura@yahoo.fr](mailto:ngdoura@yahoo.fr)

**Résumé Introduction.** Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments. **Objectif.** Ce développement constitue une étape indispensable pour évaluer l'effet de la protection d'*Olea europaea* et de l'allopurinol sur les changements biochimiques et histologiques du foie des rats rendus hyperuricémiques par l'oxonate. **Matériel et Méthodes.** Des rats témoins ont reçu pendant 7 jours une injection intrapéritonéale (i.p.) quotidienne de NaCl à 0,9%. Un groupe de rats a reçu une injection i.p. d'oxonate de potassium (300 mg/kg poids corporel (PC) (oxonate de potassium) et traité soit par l'allopurinol 10mg/kg PC (oxonate de potassium+allopurinol), soit par l'extrait d'*Olea europaea* à une dose de 1500 mg de feuilles fraîches/kg PC (Oxonate de potassium+Olea). L'acide urique, l'aspartate et l'alanine amino transaminases et la phosphatase alcaline, le taux de peroxydation lipidique, l'activité antioxydante de la catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase ainsi que l'histologie hépatique ont été étudiés.

**Résultats.** Chez les rats hyperuricémiques traités par l'allopurinol ou par la décoction de feuilles d'olive, une réduction est notée au niveau de la peroxydation des lipides, de l'aspartate, de l'alanine amino transaminases, de la phosphatase alcaline et des changements histopathologiques ont été observés. **Conclusion.** Une amélioration plus prononcée est observée chez les rats traités avec la décoction d'*Olea europaea* que ceux traités avec de l'allopurinol.

**Mots-clés:** Rats hypoeruricémiques, Stress oxydatif, Foie, Feuilles d'*Olea europaea*, Allopurinol

**Abstract Introduction.** Facing the limits of therapeutic chemical drugs, the research development on medicinal plants has been directed towards obtaining herbal medicines. **Objective.** This development was an essential step in assessing the protection effect of *Olea europaea* and allopurinol on biochemical and histological changes in the liver of hyperuricemic rats induced by oxonate. **Material and Methods.** A control group received daily an intraperitoneally injection (i.p.) of 0.9% NaCl for seven days. Another group received i.p. injection of potassium oxonate (300 mg/kg body weight (BW) (potassium oxonate) and either treated by allopurinol (10mg/kg BW (potassium oxonate + allopurinol ) or fresh leaf *Olea europaea* extract at a dose of 1500 mg /kg BW (potassium oxonate+Olea). Uric acid, aspartate and alanine amino transaminase and alkaline phosphatase, lipid peroxidation, antioxidant activities of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase, and liver histology were assayed. **Results.** Our results showed a reduction of lipid peroxidation, aspartate, alanine transaminase, alkaline phosphatase and histopathological changes in hyperuricemic rats treated with allopurinol or decoction of olive leaves. **Conclusion.** There is a more pronounced improvement in rats treated with decoction of *Olea europaea* than those treated with allopurinol.

**Keywords:** Hyperuricemic rats, Oxidative stress, Liver, *Olea europaea* leaves, Allopurinol

---

## Introduction

Hyperuricemia is one of the risk factors causing gout. In addition, it has been demonstrated that hyperuricemia is closely associated with other life style related diseases. [1]. Uric acid is the final metabolite of endogenous and food-derived purine bases in humans.

Diet may play an important role in the development of hyperuricemia and gout. However, the association between dietary factors and hyperuricemia remains unclear, and few studies have investigated direct links between

food intake and hyperuricemia. Villegas et al. have shown an association between high purine-content foods and protein intake with the uric acid level increase [2]. Hyperuricemia is one of the most common and extensive metabolic diseases in populations, characterized by high uric acid levels in the blood, causing deposition of urate crystals in the joints and kidneys. It is well known as an important risk factor for gout arthritis, nephrolithiasis, cardiovascular and renal diseases, leading to hypertension [3].

Despite advances in the use of anti-hyperuricemic agents for the treatment of hyperuricemia and

gout, allopurinol a compound used frequently as a xanthine oxidase (XOD) inhibitor could cause in 2% of the users a severe hypersensitivity, an agranulocytosis and aggravate renal toxicity by impairing pyrimidine metabolism [4]. Therefore, the available anti-hyperuricemic agents are needed, especially medicinal plants [5].

The olive tree *Olea europaea*, belonging of Oleaceae family, has been cultivated for more than a thousand years in the Mediterranean regions. Olive oil has been used for medicinal purposes [6]. In many countries, they are known as a folk remedy for hypertension and diabetes [7]. It has been traditionally used to cure rheumatic and neuralgic diseases in Lebanon [8] and also to alleviate muscle and joint pain in some regions of Iran [6].

Olive leaf extract could exert antinociceptive effects on chemical and thermal models of pain and influence morphine analgesic/hyperalgesic properties in rats. Despite the number of papers published on olive leaf extracts and the effects of their constituents, there are no reports focused on their effects on nociceptive threshold and their analgesic activity. Previous studies have demonstrated that olive leaf extracts have analgesic property in chemical and thermal nociceptive tests in rats [6].

It is well known that oleuropein, hydroxytyrosol, tyrosol and caffeic acid are the main compounds of olive leaves, which are considered to be responsible for their pharmacological effects. Furthermore, olive leaves contain p-coumaric acid, vanillic acid, vanillin, luteolin, diosmetin, rutin, luteolin-7-glucoside, apigenin-7-glucoside, and diosmetin-7-glucoside [9-11].

Recent studies suggested that olive leaf was a significant source of bioactive phenolic compounds compared to olive oil and fruits. Identifying appropriate extraction methods were thus an important step to increase the yield of such bioactive components from olive leaf [12].

Therefore, the aim of the present study was to find a scientific basis that could support the use of *Olea europaea* in medicine. In this study, the effects of *Olea europaea* decoction were compared to allopurinol, a standard non-steroidal anti-inflammatory drug, in oxonate induced uricemic rats.

## Materials and methods

### Experimental design

Adult male Wistar rats, weighing  $250 \pm 5$  g, were purchased from the Central Pharmacy (The Society of Pharmaceutical Industries, Tunisia). They were housed at ambient temperature  $22 \pm 3^\circ\text{C}$  in a 12 hour light/dark cycle and a minimum relative humidity of 40%. The animals had free access to commercial pellet diet (Industrial society optimized packaging, ISOP Sfax, Tunisia) and water. The general guidelines for the use and care of living animals in scientific investigations were followed [13]. The handling of the animals was approved by the Tunisian Ethical Committee for the Care and Use of Laboratory Animals.

Rats were randomly divided in to four groups (n=6). The control group received daily for seven days i.p. injection of 0.9% NaCl. The (potassium oxonate) group was intraperitoneally given potassium oxonate at a dose of 300 mg/kg BW, as reported by Liu et al. [14], then either treated by allopurinol (10mg/kg BW) (potassium oxonate + allopurinol) group or *Olea europaea* extract (1500 mg fresh leaf/kg BW) (potassium oxonate + *Olea*). Allopurinol, an analog of hypoxanthine and a common remedy to treat hyperuricemia was used in our study in order to compare its effect with those of *Olea europaea* extract.

### Blood and liver samples

After 7 days of treatment, 6 fasted rats of each group were sacrificed under anaesthesia by i.p. injection of chloral hydrate. Serum samples were drawn from blood after centrifugation at  $3000 \times g$  for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ .

The liver was removed, rinsed with ice-cold saline and kept at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis. Some samples were homogenized in phosphate buffer (pH 7.4) and centrifuged. The resulting supernatants were used for biochemical assays. Other samples were immediately fixed in Bouin solution for histological studies.

### Biochemical assays

#### Estimation of uric acid concentrations

Uric acid levels in serum and liver samples were measured by the uricase colorimetric test using a commercial reagent kit (Biomaghreb Diagnostic



Ariana, Tunisia).

### **Biomarkers of liver injury**

Serum aspartate and alanine amino transaminases (AST and ALT) and phosphatase alkaline (PAL) activities were measured using commercial kits (Biomaghreb Diagnostic Ariana, Tunisia).

### **Lipid peroxidation assay**

Liver lipid peroxidation was estimated colorimetrically by measuring thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) which were expressed in terms of malondialdehyde content according to Yagi [15]. Supernatant (125 µL) from liver homogenate was mixed with 125 µL of trichloroacetic acid in order to precipitate proteins and after centrifugation at 1000g for 10 min at 4°C, 200 µL of the new supernatant was mixed with 40 µL 0.6 M HCl and 160 µL of 20% thiobarbituric acid in Tris buffered Saline. The mixture was heated at 80°C for 10 min, and after cooling, the absorbance was read at 530 nm. The amount of TBARS was calculated by using an extinction coefficient of  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### **Antioxidant enzyme activities**

Superoxide dismutase (SOD) activity was estimated according to Beyer and Fridovich [16]. The reaction mixture contained 50 µL of tissue homogenate in potassium phosphate buffer (pH 7.8), 0.1 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), 13 mM methionine, 2 mM riboflavin and 75 mM Nitro Blue Tetrazolium (NBT). The developed blue color in the reaction was measured at 560 nm. Units of SOD activity were expressed as the amount of enzyme required to inhibit the reduction of NBT by 50% and the activity was expressed as units/mg protein. Catalase (CAT) activity was assayed by the method of Aebi [17]. Enzymatic reaction was initiated by adding an aliquot of 20 µL of the homogenized tissue and the substrate (hydrogen peroxide,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) to a concentration of 0.5 M in a medium containing 100 mM phosphate buffer, pH 7.4. Changes in absorbance were recorded at 240 nm. The enzyme activity was expressed as µmol  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumed/min/mg protein. Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured according to the method of Flohe and Gunzler [18]. The enzyme activity was expressed as µmol of GSH oxidized/min/g protein. Protein content in the

supernatant was determined according to Lowry *et al.* [19]

### **Histopathological study in liver**

Some portions of liver tissues were fixed for 48 h in Bouin solution, dehydrated in an ascending graded series of ethanol, cleared in toluene and embedded in paraffin. Sections of 5–6 µm thickness were made by using a rotary microtome and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for microscopic observations Gabe [20]. Six slides were prepared from each group. All sections were evaluated for the degree of liver injury. Each liver slide was examined and assigned for severity of changes using scores on a scale of none (-), mild (+), moderate (++) and severe (+++) damages.

### **Statistical analysis**

Results were reported as means  $\pm$  standard deviation (SD) for at least 6 determinations throughout the study. The results were analysed by one-way ANOVA followed by the Duncan multiple range test. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 11.0 for Windows) software was used for statistical evaluation.  $P \leq 0.05$  was considered significantly different.

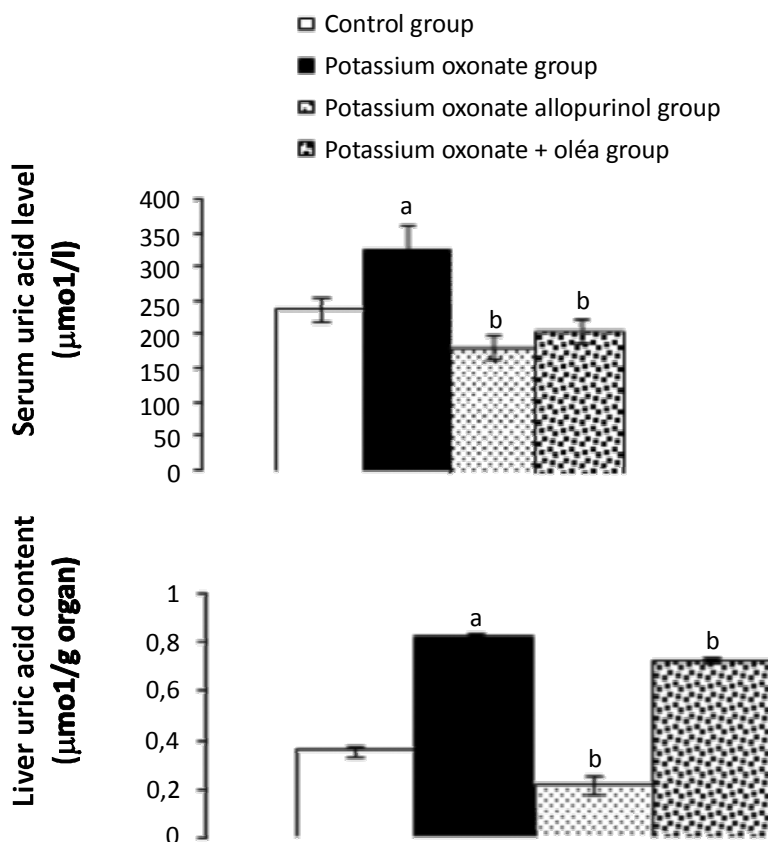
## **Results**

### **Serum and liver uric acid levels**

Serum and liver uric acid concentrations were increased significantly by 36 and 129 % respectively in potassium oxonate rats compared to controls ( $P < 0.05$ ) (Fig. 1). Allopurinol treatment of hyperuricemic rats restored partially serum uric acid level. Interestingly, a similar effect was observed in rats receiving *Olea europaea* extract. Moreover, the hypouricemic effect was more pronounced in serum than in liver content.

### **Biomarkers of liver injury**

The activities of AST, ALT and PAL, increased significantly by 26, 25 and 20 % respectively in hyperuricemic rats compared to controls ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2). After treatment of rats by Allopurinol or *Olea europaea* extract, these activities were significantly decreased by 54, 48 and 36 % and by 20, 18 and 11%, respectively as compared to those of potassium oxonate rats.



**Fig. 1. Uric acid levels in serum and liver tissue after 1 week of allopurinol or *Olea europaea* extracts treatment in hyperuricemic rats**

Values are means  $\pm$  SD of 6 rats. Comparison of means was performed by Duncan multiple range test with a significant difference at  $p < 0.05$ : a : as compared to controls; b as compared to potassium oxonate rats.

#### Liver lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities

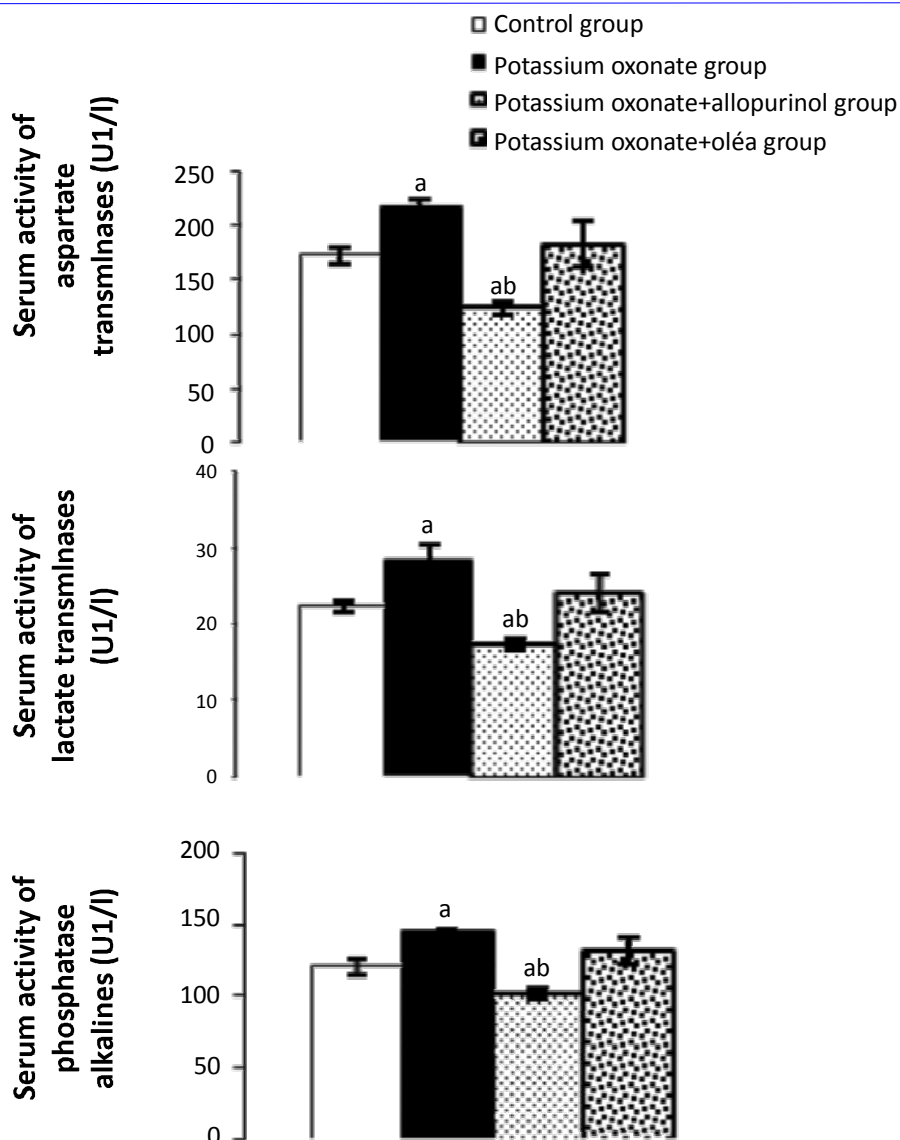
Liver TBARS values were significantly increased by 78% in potassium oxonate-induced hyperuricemic rats when compared to controls ( $P < 0.05$ ). The administration of Allopurinol or *Olea europaea* significantly reduced the level of liver TBARS in hyperuricemic rats (Fig. 3).

In potassium oxonate rats, antioxidant enzyme activities of SOD, CAT and GPx increased, respectively by 62, 45 and 62% when compared to controls (Fig. 4). Allopurinol or *Olea europaea* leaves decreased these enzyme activities. Indeed, SOD, CAT and GPX activities were lowered by 49, 47 and 53% in uricemic rats treated with Allopurinol and by 121, 91 and 90% when treated with *Olea europaea* compared to those of untreated hyperuricemic group.

#### Liver histopathology assessment

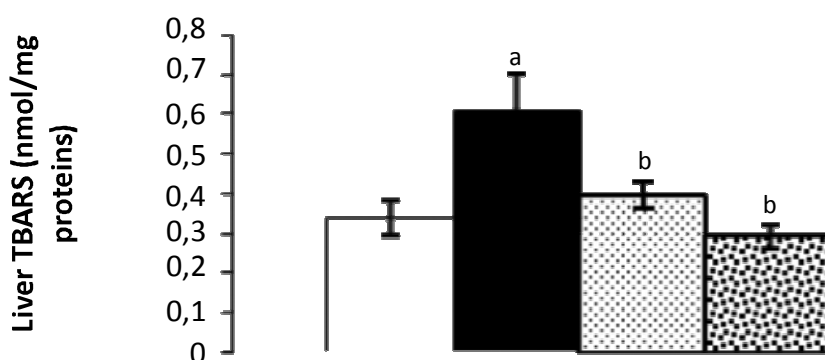
In control group, normal liver histological aspect, with distinct hepatic cells and sinusoidal spaces, was observed (Fig. 5.A). Hyperuricemic rat developed a significant hepatic damage as compared to controls. Potassium oxonate intoxication exhibited, in hepatocytes of dams, several histopathological changes, such as marked leucocytes infiltration, sinusoidal dilatation (moderate peliosis) and granuloma inflammatory disorders surrounded by few necrotic cells (Fig. 5.B).

The administration of allopurinol showed no significant effect on reducing the injuries of liver (Fig. 5.C), whereas improved effect was obtained in potassium oxonate-induced hyperuricemic rats and treated with *Olea europaea* compared to the control group (Fig. 5.D). The histopathological changes are summarized in the Table.



**Fig. 2. Aspartate and alanine amino transaminases and phosphatase alkaline after 1 week of allopurinol or *Olea europaea* extracts treatment in hyperuricemic rats**

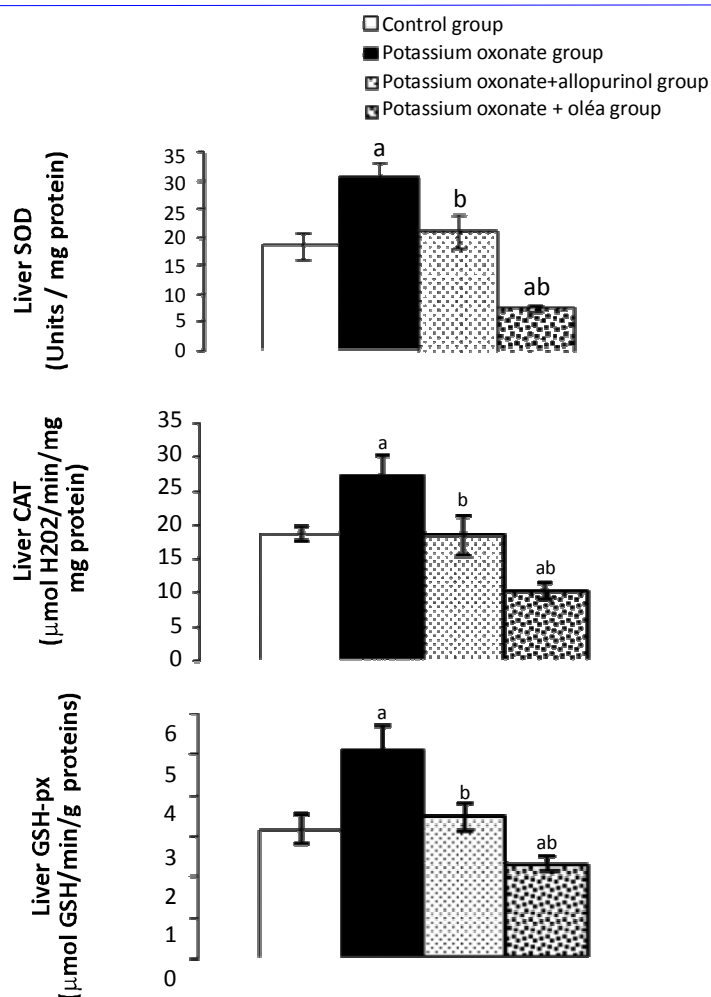
Values are means  $\pm$  SD of 6 rats. Comparison of means was performed by Duncan multiple range test with a significant difference at  $p < 0.05$ . a: as compared to controls; b: as compared to potassium oxonate rats.



**Fig. 3. Liver lipid peroxidation after 1 week of allopurinol or *Olea europaea* extracts treatment in hyperuricemic rats**

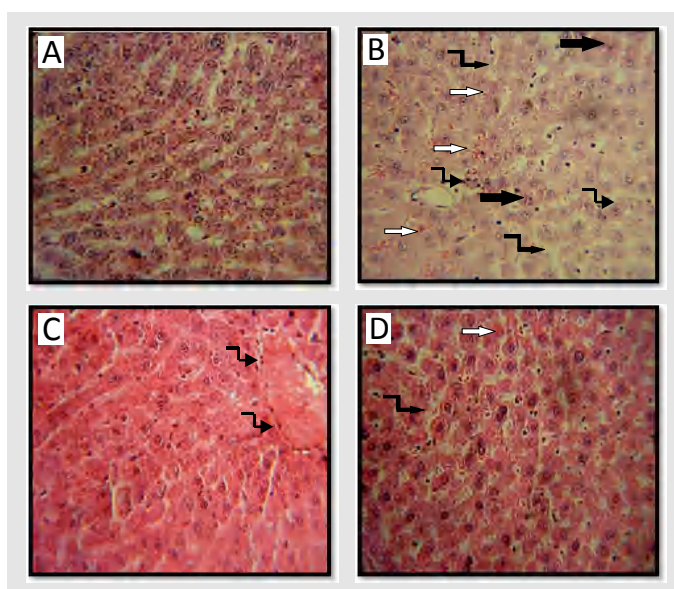
Values are means  $\pm$  SD of 6 rats. Comparison of means was performed by Duncan multiple range test with a significant difference at  $p < 0.05$ . a: as compared to controls; b: as compared to potassium oxonate rats.

## Composés bioactifs



**Fig. 4. Antioxidant enzyme activities after 1 week of allopurinol or *Olea europaea* extracts treatment in hyperuricemic rats**

Values are means  $\pm$  SD of 6 rats. Comparison of means was performed by Duncan multiple range test with a significant difference at  $p < 0.05$ . a: as compared to controls; b: as compared to potassium oxonate rats.



**Fig. 5. Liver histological sections of adult rats: Controls (A), Potassium oxonate group (B), Potassium oxonate+allopurinol (C), Potassium oxonate+*Olea europaea* (D)**

Optic microscopy; hematoxylin–eosin stain; magnification A, B, C, D: (x 400)

↳ : Leucocytes infiltration; ↯ : sinusoidal dilatation; ⇨ : granuloma inflammatory disorders; ↯ : necrotic cells.

## Discussion

In this study, olive leaf extract were compared to Allopurinol treatment in potassium oxonate Wistar rats on oxidative stress and protective effects against hyperuricemia.

Potassium oxonate a selective competitive uricase inhibitor blocks the effect of hepatic uricase and produces hyperuricemia in rodents [21]. Indeed, potassium oxonate rats could serve as a useful animal model of hyperuricemia to evaluate drugs that affected serum uric acid levels and also to evaluate the possible therapeutic agents in certain disorders associated with abnormal uric acid levels. Uric acid was generated when purine catabolism of hypoxanthine and xanthine was catalyzed by xanthine oxidase.

In recent years, several data documented low rates of adherence to gout medication treatments. These facts suggest a major role for therapeutic education in patients with gout [22-23].

Allopurinol, often used in clinical drugs to decrease uric acid levels, was assayed in the present study to treat hyperuricemia in rats. The activity of xanthine oxidase was inhibited by flavonoids, leading to reduced synthesis of uric acid [24]. Despite advances in the use of anti-hyperuricemic agents for the treatment of hyperuricaemia and gout, allopurinol as a frequently used xanthine oxidase

(XOD) inhibitor, could cause 2% of the users to induce severe hypersensitivity and agranulocytosis, and aggravate renal toxicity by impairing pyrimidine metabolism [4]. Therefore, it is for urgent need of available anti-hyperuricemic agents, especially medicinal plants [5,25]. Around the world, millions of people use medicinal plants as a part of traditional medicine for a large range of medical disorders [26]. Olive tree (*Olea europaea L.*) leaves have been widely used for traditional remedies in European and Mediterranean countries such as Greece, Spain, Italy, France, Turkey, Israel, Morocco, and Tunisia. They have been used in the human diet as an extract, an herbal tea, and a powder. These leaves also contain many potentially bioactive compounds that may have antihypertensive, anti-atherogenic, anti-inflammatory, hypoglycemic, hypocholesterolemic and antioxidant properties [11-12,27].

We demonstrated that in the hyperuricemic model, olive leaf extracts fully prevented the uric acid increase compared with the control group. This is most likely due to the characteristics of absorption or the metabolism of the compounds responsible for the effect after oral administration in vivo. Thus, the present study suggested that olive tree could be more useful to treat gout attacks, than allopurinol.

**Table. Grading of the histopathological changes in liver sections of Controls, Potassium oxonate, Potassium oxonate+allopurinol, and Potassium oxonate+*Olea europaea* rats**

Groups	Leucocytes infiltration	Sinusoidal dilatation (peliosis)	Granuloma inflammatory disorders	Necrosis
Control	-	-	-	-
Potassium oxonate	++	++	+++	++
Potassium oxonate + allopurinol	+	-	+	-
Potassium oxonate + <i>Olea europaea</i>	+	-	+	-

[Scoring was done as follows: none(-), mild(+), moderate(++) and, severe(+++) damage]

Drugs frequently used to treat gout, such as allopurinol, probenecid, benzbromarone, sulfipyrazone, and colchicine, often caused secondary effects [28]. Therefore, such phytochemicals, containing flavonoids, may be considered as another choice to treat hyperuricemia and gout. found to inhibit xanthine oxidase activity, which reduced uric acid, but their side effects were not studied [29]. The present study demonstrated that *Olea europaea* effectively lowered serum uric acid level, which was the key factor for preventing gout. Flavonoids and other phytochemicals have been found to inhibit xanthine oxidase activity, which reduced uric acid, but their side effects were not studied [29]. The present study demonstrated that *Olea europaea* effectively lowered serum uric acid level, which was the key factor for preventing gout. Drugs reducing uric acid levels were agents usually: uricolytic which promoted the excretion of uric acid or uricostatic agents which arrested the synthesis of uric acid agents.

The bioactive compounds in traditional plant reduced uric acid through inhibiting xanthine oxidase. Here, *Olea europaea* inhibited the uric acid synthesis by a different mechanism than allopurinol. We found that *Olea europaea* significantly lowered uric acid involving uric acid excretion. This result seemed independent of the human mechanism to reduce uric acid and thus suggesting possible new treatment options for patients with gout [30]. *Olea europaea* may be able to prevent gout arthritis. Although previous studies have indicated that the flavonoids can inhibit xanthine oxidase activity, some in vitro experiments have found that flavonoids have minimal or no xanthine oxidase activity. They fail to reduce uric acid and may have limited effectiveness [31]. Antioxidants can potentially decrease serum uric acid levels [32].

We therefore postulate that olive leaf extract exerted an anti-toxicity effect. The olive (*Olea europaea*) plant belongs to the Oleracea family, and its leaves and oil are used for medicinal purposes. Furthermore, olive leaf extract has anti-oxidant and anti-inflammatory properties [33]. oxidant and anti-inflammatory properties [33]. Like many natural herbs, olive leaves are also known to be an antioxidant and contain some of the most powerful known antioxidants [34]. Olive

leaf extracts were shown in real promise in both of these areas. In animal and basic laboratory studies, olive leaf extracts and oleuropein have been found to lower blood sugar through several mechanisms [35-36]. Indeed, a slow digestion of starches in simple sugars, a slow absorption of these sugars from the intestine, and increased glucose uptake by tissues from the blood were observed [36]. Moreover, tissue protection from the oxidant damage caused when glucose binds to proteins in the process called glycation were also observed [35].

In our experimental conditions, hyperuricemia was accompanied by a high marked oxidative impact as evidenced by the significant increase of hepatic lipid peroxidation and antioxidant enzymes including SOD, CAT, and GPX activities and liver damage biomarkers. Relationship between hyperuricemia and biomarkers of liver damages, including aspartate, alanine amino transaminases and phosphatase alkaline was indicated.

Since, the olive leaves have been recommended in the literature as a remedy for the hyperuricemia treatment due to their antioxidant agents compounds. The high levels of TBARS suggested a cell aggression by free-radicals and reactive oxygen species resulting from uric acid toxicity and could be partly responsible for the oxidative stress and liver injury. The administration of Allopurinol or *Olea europaea* significantly decreased the levels of TBARS in the liver of the potassium oxonate-induced hyperuricemic rats. Studies demonstrated that plants reduced inflammation and aging, and inhibited free radical activity [27,37].

Our histological studies substantiated liver dysfunction. Nevertheless, rats treated with oxonate developed a significant hepatic damage as compared to controls. Free radical formation during the metabolism of uric acid by hepatic microsomes, caused lipid peroxidation of the cellular membrane leading to the necrosis of hepatocytes. An ameliorative effect was obtained in hyperuricemic rats treated with olive leaves decoction.

The present study is the first to demonstrate that *Olea europaea* has a significant antioxidant and anti-uricemic effects in oxonate-induced hyperuricemic rats. This study confirms the fact that olive leaves decoction is a basic component in

folk medicine. Further studies on this species may yield fruitful results and isolation of some active constituents may lead to the provision of new drugs for treatment of hyperuricemia and gout.

## References

- Chen JH., Pan WH., Hsu CC., Yeh WT., Chuang SY., Chen PY., *et al*. Impact of obesity and hypertriglyceridemia on gout development with or without hyperuricemia: a prospective study. *Arthrit Care Res* 2013;65:133–40.
- Villegas R., Xiang YB., Elasy T., Xu WH., Cai H., Cai Q., *et al*. Purine-rich foods, protein intake, and the prevalence of hyperuricemia: The Shanghai Men's Health Study. *Nutr Metab Cardiovas* 2012;22:409–16.
- Chen JH., Chuang SY., Chen HJ., Yeh WT., Pan WH. Serum uric acid level as an independent risk factor for all-cause, cardiovascular, and ischemic stroke mortality: a chinese cohort study. *Arthrit Care Res* 2009;61:225–32.
- Mari E., Ricci F., Imberti D., Gallerani M. Agranulocytosis: an adverse effect of allopurinol treatment. *Italian J Med* 2011;5:120–3.
- An J., Yang HJ., Park K., Lee J., Kim BW. Reparatory and preventive effects of oriental herb extract mixture (OHEM) on hyperuricemia and gout. *Food Sci Biotechnol* 2010;19: 517–24.
- Esmaeili-Mahani S., Rezaeezadeh-Roukerd M., Esmailpour K., Abbasneja M., Rasoulia B., Sheibani V., *et al*. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *J Ethnopharmacol* 2010;132:200–5.
- Cherif S., Rahal N., Haouala M., Hizaoui B., Dargouth F., Gueddiche M., *et al*. A clinical trial of a titrated *Olea* extract in the treatment of essential arterial hypertension. *J Pharmacie Belgique* 1996;51:69–71.
- El Beyrouthy M., Arnold N., Delelis-Dusollier A., Dupont F. Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *J Ethnopharmacol* 2008;120:315–34.
- Ryan D., Antolovich M., Prenzler P., Robards K., Lavee S. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae* 2002;92:147–76.
- Farag RS., El-Baroty GS., Basuny AM. Safety evaluation of olive phenolic compounds as natural antioxidants. *Int J Food Sci Nutr* 2003;54:159–74.
- El SN., Karakaya S. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr Rev* 2009;67:632–8.
- Brahmi F., Mechri B., Dabbou S., Dhibi M., Hammami M. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Ind Crop Prod* 2012;38:146–52.
- Council of European Communities. Council instructions about the protection of living animals used in scientific investigations. Official Journal of the European Communities, 1986, (JO 86/609/CEE) L358,1-18.
- Liu X., Chen R., Shang Y., Jiao B., Huang C. Lithospermic acid as a novel xanthine oxidase inhibitor has anti-inflammatory and hypouricemic effects in rats. *Chem Biol Interact* 2008;176:137-42.
- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med* 1976;15:212-6.
- Beyer WF., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem* 1987;161:559-66.
- Aebi H. Catalase *in vitro*. *Method Enzymol* 1984;105:121-6.
- Flohe L., Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Method Enzymol* 1984;105:114-21.
- Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- Gabe M. Techniques Histologiques (Histological Technics), Masson Publisher, Paris, 1968.
- Hall IH., Scoville JP., Reynolds DJ., Simlot R., Duncan P. Substituted cyclicimides as potential anti-gout agents. *Life Sci* 1990;46:1923–7.
- Reach G. Treatment adherence in patients with gout. *Joint Bone Spine* 2011;78:456–9.

23. Corp N., Pendry B. The role of Western herbal medicine in the treatment of gout. *J Herbal Med* 2013;3:157-70.
24. Van Hoorn DE., Nijveldt RJ., Van Leeuwen PA., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont DB. Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *Euro J Pharmacol* 2002;45:111-8.
25. Hua J., Huang P., Zhu CM., Yuan X., Yu CH. Anti-hyperuricemic and nephroprotective effects of modified Simiao Decoction in hyperuricemic mice. *J Ethnopharmacol* 2012;142: 248-52.
26. Namukobe J., Kasenene JM., Kiremire BT., Byamukama R., Kamatenesi-Mugisha M., Krief S., et al. Traditional plants used for medicinal purposes by local communities around the Northern sector of Kibale National Park, Uganda. *J Ethnopharmacol* 2011;136:236-45.
27. Brahmi F., Mechri B., Dhibi M., Hammami M. Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Ind Crop Prod* 2013; 49:256-64.
28. Stamp LK., Jordan S. The challenges of gout management in the elderly. *Drug aging* 2011;28:591-603.
29. Tung, YT., Hsu CA., Chen CS., Yang SC., Huang CC., Chang ST. Phytochemicals from *Acacia confusa* heartwood extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced mice. Their potential use as xanthine oxidase inhibitors. *J Agric Food Chem* 2010; 58: 9936-41.
30. Christopher MB., Robert LW. Gout therapeutics: New drugs for an old disease. *New Drug Class* 2011;377:165-77.
31. Huang J., Wang S., Zhu M., Chen J., Zhu X. Effects of Genistein, Apigenin, Quercetin, Rutin and Astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice. *Food Chem Toxicol* 2011;49:1943-7.
32. Haidari F., Shahi M., Keshavarz SA., Rashidi MR. Inhibitory effects of Tart Cherry (*Prunus cerasus*) juice on xanthine oxidoreductase activity and its hypouricemic and antioxidant effects on rats. *Malaysian J Nutr* 2009;15:53-64.
33. Visioli F., Poli A., Galli C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and oil. *Med Res Rev* 2002;22:65-75.
34. Lee OH., Lee BY. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource Technol* 2010;101:3751-4.
35. Jemai H., El Feki A., Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agric Food Chem* 2009; 57:8798-804.
36. Wainstein J., Ganz T., Boaz M., Bar Dayan Y., Dolev E., Kerem Z., et al. Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *J Med Food* 2012;15:605-10.
37. Anter J., Fernández-Bedmar Z., Villatoro-Pulido M., Demyda-Peyras S., Moreno-Millán M., Alonso-Moraga A., et al. A pilot study on the DNA-protective, cytotoxic, and apoptosis-inducing properties of olive-leaf extracts. *Mutat Res* 2011;723:165-70.



---

## INSTRUCTIONS AUX AUTEURS

2014

La revue intitulée "**Nutrition & Santé**" est un périodique semestriel, qui publie des articles en français et également en anglais. Elle publie particulièrement toute étude originale ayant trait à la :

- Connaissance de l'alimentation, diététique et nutrition
- Sciences alimentaires
- Physiopathologie métabolique et cardiovasculaire
- Santé
- Phytothérapie
- Biotechnologies

mais aussi des revues générales, des mises au point, des communications brèves et des « libres opinions » ou des « lettres à la rédaction se rapportant à des sujets d'actualité traités dans la revue.

### 1. RÈGLES DE PUBLICATION

**1.1.** Tout manuscrit envoyé à la revue est soumis à relecture. L'approbation du Comité de rédaction, après modifications éventuelles, est nécessaire pour la publication de l'article. **1.2.** Les articles ne doivent pas avoir été publiés antérieurement, ni être publiés simultanément dans une autre revue.

**1.3.** Le fait de soumettre un article sous-entend que le travail décrit est approuvé par tous les auteurs. En cas d'acceptation, il ne fera l'objet d'aucune autre publication en l'état, que ce soit en français ou dans toute autre langue, sans le consentement écrit de l'éditeur.

### Recommandations d'ordre éthique

L'auteur principal accepte la responsabilité du manuscrit soumis à la revue "Nutrition & santé", au nom des co-auteurs. Les co-auteurs reconnaissent, par leurs signatures au bas de la lettre d'intention, la qualité de leur participation à la rédaction du manuscrit.

**1.4.** Si des extraits d'autres travaux ou documents sous copyright sont inclus dans l'article, *les auteurs doivent fournir une autorisation écrite* émanant des détenteurs du copyright et citer les sources de la publication princeps dans l'article.

**1.5.** Les travaux soumis doivent être conformes aux lois en vigueur sur l'expérimentation biomédicale et aux recommandations des comités d'éthiques.

**1.6.** Enfin, la revue suit les pratiques internationales relatives aux conflits d'intérêt, en rapport avec les publications soumises. *Les auteurs sont priés de respecter les règles de fond et de forme rappelées ici.*

### 2. SOUMISSION DU MANUSCRIT

#### Soumission par e-mail

Les manuscrits (texte, tableaux et figures compris) doivent être adressés par courrier électronique à la rédaction de la revue "Nutrition & santé" à l'adresse suivante :

[nutrition-sante@san-dz.org](mailto:nutrition-sante@san-dz.org)

Joindre en pièces attachées :

- une lettre à l'éditeur
- un fichier pour le manuscrit complet (avec les figures et tableaux)

Tout manuscrit doit être soumis en format Word.

#### Informations générales

La revue "Nutrition & Santé" offre, à ses lecteurs, différentes rubriques. Les auteurs sont priés d'indiquer sous quelle rubrique ils souhaitent publier leur manuscrit, la Rédaction se réservant l'affectation définitive du manuscrit.

- **Les articles originaux :** Les articles originaux ne peuvent excéder 20 pages et comportent : un résumé en français et en anglais de 250 mots maximum, il ne doit pas dépasser 45 000 caractères (espaces compris) (env. 20 pages, 25 lignes par page, en double interligne), bibliographie et remerciements inclus. Le nombre de références bibliographiques ne devrait

---

pas excéder 40.

- **Les articles de synthèse** : Ces articles ont pour but de présenter une mise au point des connaissances, de souligner les acquisitions récentes, de bien montrer comment vont de pair les progrès en biologie et en médecine et, enfin, d'attirer l'attention sur les questions encore non résolues. Les articles ne devraient pas excéder 20 pages (non compris les références, les schémas, les tableaux et leurs légendes). Chaque article doit comporter un résumé en français et en anglais informatif d'environ 30 lignes, ainsi que les mots clés correspondants (3 à 6) servant à référencer l'article dans les bases de données. Les auteurs pour lesquels l'anglais n'est pas familier sont vivement encouragés à faire relire leur texte par des experts en la matière.

Les éditeurs se réservent le droit d'apporter des corrections s'ils l'estiment nécessaire.

Les articles pourront comporter jusqu'à 6 illustrations, tableaux ou figures.

Les références bibliographiques ne doivent pas prétendre à l'exhaustivité mais plutôt à la sélectivité.

- **Le point sur...** Cette rubrique est destinée à faire le point sur un sujet technique ou d'actualité et à mettre en perspective les articles de synthèse qui y sont consacrés. Le texte manuscrit comprend environ 5 pages dactylographiées et 10 références bibliographiques. Il est rédigé sur invitation de la Rédaction. Résumé et abstract en anglais ne sont pas requis. Les autres règles applicables pour la soumission de ces communications brèves demeurent identiques à celles mentionnées dans PRÉSENTATION DU MANUSCRIT, notamment s'agissant des mots clés et keywords.

- **Les brèves** rapportent une information récente ayant fait l'objet d'une ou de plusieurs publications. Elles sont limitées à 2 pages et à 5 références

### 3. PRÉSENTATION DU MANUSCRIT

Une page comporte, en double interligne, 60 caractères par ligne, 25 lignes par page (soit environ 1500 caractères par page). Sauf accord de la rédaction, les manuscrits ne doivent pas dépasser 45 000 caractères (espaces compris), bibliographie incluse. Ils comportent :

**3.1. Une page de titre donnant le titre long** de l'article (Calibri 12, Gras), aussi précis que possible et sa traduction en anglais. **Les auteurs** : Prénom (s) (en toutes lettres) et noms des auteurs, l'adresse et les coordonnées (téléphone, mail) du responsable de la correspondance et des co-auteurs (Calibri 12, italique). Aucune abréviation ne doit être mentionnée dans le titre.

**3.2. Une 2<sup>ème</sup> page avec un résumé en français** (Calibri 12, normal, maximum 250 mots), structuré en introduction, objectif, matériel & méthodes, principaux résultats et conclusions du travail. Le résumé sera suivi d'une liste de 3 à 7 mots-clés. Toute abréviation doit être explicitée à sa première apparition dans le texte.

**3.3. Une 3<sup>ème</sup> page avec un « abstract » en anglais**, qui est la traduction du résumé en français, suivi de 3 à 7 « keywords ».

**3.4. Un texte** (Calibri, 12, normal) **avec Introduction** (permettant au lecteur, même non spécialiste, de connaître l'orientation et l'étendue de l'article, **Matériel & méthodes, Résultats, Discussion et Conclusion**.

#### 3.5. Remerciements

Les personnes citées en remerciements doivent en être informées et avoir donné leur accord.

#### 3.6. Conflits d'intérêt

**Tous les auteurs doivent déclarer toutes les relations** qui peuvent être considérées comme ayant un potentiel conflit d'intérêt **en lien avec le texte publié**. Un conflit d'intérêt existe quand un auteur et/ou un co-auteur entretient des relations financières ou personnelles avec d'autres personnes ou organisations susceptibles d'influencer ses jugements professionnels concernant une valeur essentielle (bien du patient, intégrité de la recherche...). Dans le fichier de l'article, à la suite des remerciements et avant les références, la déclaration des conflits d'intérêt liés à l'article **doit** figurer. Les principaux conflits d'intérêt sont les intérêts financiers, les essais cliniques, les interventions ponctuelles, les relations familiales...

#### 3.7. Références bibliographiques

Les auteurs assument la responsabilité de l'exactitude des références bibliographiques.

##### 3.7.1. Citations dans le texte.

Chaque référence appelée dans le texte est présente dans la liste bibliographique (et inversement) **et numérotée et appelée par ordre d'apparition**.

Les résultats non publiés et les communications personnelles ne doivent pas figurer dans la liste bibliographique, mais pourront être mentionnés dans le texte. La citation d'une référence comme étant « à paraître » (« in press ») sous-entend que celle-ci a été acceptée pour publication, et doit dans ce cas figurer dans la liste bibliographique.

##### 3.7.2. Citations et listes de références sur Internet

Les références à des publications sur Internet doivent être incluses dans la liste bibliographique, et par conséquent

---

appelées dans le texte. Dans la liste bibliographique, l'URL complète doit être donnée au minimum, suivie de la date de consultation : accédée le... Toute information complémentaire, si elle est connue (noms des auteurs, dates, référence à une publication source, etc.) doit également être indiquée.

### **3.7.3. Liste bibliographique**

La liste des références en fin d'article est numérotée par ordre de citation dans le texte (et non dans l'ordre alphabétique des noms d'auteurs). Toutes les références de la bibliographie doivent correspondre à des références citées dans le texte, et vice versa. Le style et la ponctuation des références doivent être conformes aux modèles illustrés dans les exemples suivants :

– *référence à un périodique* : Ferrières J., Bongard V., Dallongeville J. Consommation de produits laitiers et facteur de risque cardiovasculaire dans l'étude MONICA. *Cah Nutr Diet* 2006;41:33–8.

– *référence à un ouvrage* : Moneret-Vautrin DA., Kanny G., Morisset M. Les allergies alimentaires de l'enfant et de l'adulte. Paris: Masson; 2006, p. 1–228.

– *référence à un chapitre d'ouvrage* : Fischler C. La régulation sociale des conduites alimentaires. In : Samuel-Lajeunesse B, Foulon C, editors. Les conduites alimentaires, Paris : Masson; 1994, p. 8–21.

### **3.8. Figures et tableaux**

Les tableaux et figures sont là pour faciliter la compréhension des résultats ou des méthodes. Ils sont un complément indispensable du texte, mais ne doivent pas être redondants. Tableaux et figures sont placés dans le texte à proximité de leur lieu d'appel. Les tableaux et les figures sont numérotés séparément, par un chiffre arabe. Chaque figure ou tableau comporte un titre et une légende. Les notes de bas de tableau ou de figure sont placées sous le corps du tableau ou de la figure, signalées par une lettre minuscule en exposant. Les filets verticaux doivent être évités sur les tableaux. Les tableaux doivent être en nombre réduit et leur dimension ne doit pas dépasser la largeur d'une page A4. Les figures doivent être d'une taille suffisante pour pouvoir être lues. Afin de faciliter les comparaisons, *l'échelle et le figuré des figures devront demeurer constants pour un même type de figures*. L'utilisation des couleurs n'est pas recommandée dans le manuscrit et devra se limiter à l'indispensable.

## **4. ACCEPTATION DU MANUSCRIT**

Les articles sont soumis au Comité de rédaction qui recueille l'avis motivé de deux membres du comité scientifique de la revue, ou d'experts choisis pour leur compétence et leur expertise en la matière. Une notification est adressée à l'auteur correspondant et dans un délai de 12 semaines, les auteurs sont informés du refus ou de l'acceptation avec modification. Dans ce dernier cas, les auteurs devront resoumettre le manuscrit modifié dans un délai d'un mois.

## **5. MISE EN PRODUCTION, CORRECTION D'ÉPREUVES, TIRÉS À PART, DEMANDE DE REPRODUCTION**

En cas de reproduction partielle ou totale, dans le manuscrit, d'un document ou d'une illustration déjà publiés, l'autorisation écrite de l'éditeur et des auteurs doit être impérativement fournie.

Le manuscrit reçu par l'éditeur est considéré comme étant fourni dans sa forme finale. Il sera envoyé en format PDF par courrier électronique à l'auteur, pour vérification du travail de composition et d'édition. Aucune modification importante ou addition par rapport au manuscrit accepté n'est autorisée à ce stade. Seules les corrections typographiques et orthographiques seront prises en compte. La relecture des épreuves relève de la seule responsabilité des auteurs.

Le comité de rédaction s'efforce de corriger et de publier les articles aussi rapidement et soigneusement que possible. Pour ce faire, la coopération des auteurs est indispensable. Après réception des épreuves en fichier PDF, l'auteur retournera toutes ses corrections en un seul envoi sous un délai de 7 jours. Aucune correction ultérieure ne sera possible. Lors de la mise en production du manuscrit accepté pour publication, l'éditeur enverra à l'auteur correspondant un formulaire de transfert de droits par courrier électronique, qui sera dûment complété et signé par l'auteur responsable de l'article pour le compte de tous les auteurs, puis retourné à l'éditeur dans les plus brefs délais. L'auteur recevra une version électronique en format PDF dès la parution de son article.

***Les instructions aux auteurs sont disponibles sur le site : [www.nutrition-sante.dz](http://www.nutrition-sante.dz)***



devenez membre de la san sur  
**www.san-dz.org**

## Adhésion



### Les avantages de l'adhésion

- Vous bénéficiez de réduction sur les frais d'inscription à nos congrès, journées scientifiques ou de formation
- Vous avez accès à la revue de la SAN « Nutrition & santé »
- Vous recevez toutes les informations sur la Nutrition, l'alimentation et la santé
- Vous avez accès à l'annuaire et à l'espace des membres de la SAN sur [www.san-dz.org](http://www.san-dz.org)

### Comment adhérer

- Vous devez disposer de deux lettres de parrainage motivées et signées de membres de la SAN et les adresser en même temps que la demande d'adhésion et un CV selon le modèle (CV pour membre titulaire ou CV pour doctorant) par voie électronique: [soc.nutrition.dz@gmail.com](mailto:soc.nutrition.dz@gmail.com)

Welcome to Nutricia Research

The main centre for Nutricia Research is located on the Utrecht Science Park, the Netherlands. In addition we have R&D satellites all over the world. Together, we ensure outstanding innovations.

# WHERE WE ARE

Where we are



## Where we come from

Martinus and Jan van der Hagen produced the first infant milk formula, based on research by Prof. Backhaus in Germany



1896

First Medical Nutrition for diabetes patients



1905

First Research Centre in Zoetermeer



1946

Relocation from Zoetermeer to Wageningen, broadening from Nutrition & Technology to Life Science and Food Sciences



1997

After acquisition of Danone in 2007, renamed into Danone Research - Centre for Specialised Nutrition



2008

Opening of our R&D Satellite in Biopolis, Singapore



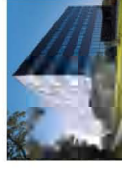
2011

Opening of our R&D satellite in Shanghai, China



2013

Opening of new Innovation centre on the Utrecht Science Park, combining R&D locations from The Netherlands, Germany and UK



2013

# INNOVATING FOR EARLY LIFE NUTRITION



**Our conviction...**  
Good nutrition needs to start early.

**1968**

Adapted protein (better whey casein ratio) to promote healthy growth

**1995**

Structured lipid with palmitic acid for digestibility & absorption

**Our discovery...**

Not only the amount and type of dietary fatty acids play a role in body development, but also the structure of the fat globules in the milk.

**PROVIDING FOR THE BEST POSSIBLE START IN LIFE**

Our aim is to provide the best possible nutrition for a healthy start in life. Our research programmes are addressing all key aspects of early life: from maternal physiology during pregnancy and lactation, via composition and health benefits of human milk, to development of gut function and microbiota, immune system, brain and metabolism of infants and young children.

Nutrition in early life is not only crucial for a child's incredible growth and development, but it can also influence life long health.



**INSPIRED BY HUMAN MILK**

For its optimal nutritional value and health benefits, our dedicated research team strives to understand the causes and consequences of the variation in human milk composition. In our effort to be the 'best after breast', our human milk research has already resulted in several innovations in formula composition, such as:

- 1992** LCP added to preterm formula
- 1993** LCP added to term formula
- 1998** sGGOS (9:1) patent filed
- 2000** sGGOS, lGFOS (9:1) added to formula

LCP = Long-chain polyunsaturated fatty acids i.e. DHA, AA

sGGOS / lGFOS = probiotic mixture of short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides

**OPTIMAL NUTRITION FOR HEALTHY GROWTH**

A young child needs up to 6 times more micronutrients per kg of body weight than an adult to fuel the stupendous growth. At the same time, their intestinal tract, immune system and brain, are still maturing. As young children metabolise foods and nutrients differently, we design specialised nutrition appropriate for their developmental stage.

**EARLY LIFE NUTRITIONAL PROGRAMMING**

Differences in nutritional exposures at critical periods in early life, both pre- and post-natally, can programme a person's health for the future. We are committed to bring breakthrough nutrition innovation not only to support optimal functioning of the developing organs but also to cope with challenges later in life i.e. reducing susceptibility for obesity, metabolic disorders, allergic disease and cardiovascular disease.