

Composition chimique, activités anti-inflammatoire, antalgique et cytotoxique in vivo de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea*

Chemical Composition, Anti-inflammatory, Analgesic and Cytotoxic Activities in vivo of the Methanolic Extract of *Olea europaea* Leaves

Z. Lakache · C. Tigrine · H. Aliboudhar · A. Kameli

© Lavoisier SAS 2019

Résumé *Olea europaea* est une plante médicinale largement utilisée en médecine traditionnelle en Algérie. Dans la présente étude, les activités anti-inflammatoire, antalgique et cytotoxique de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* sont évaluées. De même, une étude chromatographique analytique a été réalisée pour identifier les différentes familles de composés chimiques contenus dans cet extrait. Les résultats obtenus montrent que l'analyse qualitative de l'extrait méthanolique des feuilles d'olivier par CLHP a permis de mettre en évidence des composés majoritaires et des composés minoritaires. Les dosages des polyphénols et des flavonoïdes montrent leurs existences dans cet extrait avec des taux de $115,35 \pm 2,24$ mg EAG/g d'extrait, $7,19 \pm 0,19$ mg EQ/g d'extrait respectivement. L'activité anti-inflammatoire d'extrait méthanolique des feuilles d'olivier a été explorée in vivo par l'induction de l'œdème de la patte et de l'oreille chez la souris en utilisant la carragénine et l'huile de croton respectivement. Les résultats obtenus indiquent que l'administration de l'extrait méthanolique d'*Olea europaea* par voie orale a induit une forte inhibition de l'inflammation de la patte avec un pourcentage de réduction de 96 % à la concentration de 400 mg/kg. Cette activité a été confirmée par voie topique avec le test de l'œdème de l'oreille. De même, nos résultats obtenus indiquent aussi que l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* inhibe la douleur provoquée par l'acide

acétique chez la souris avec un pourcentage de 77,49 % pour la concentration 600 mg/kg. Aussi le test de « Brine shrimp » de l'extrait d'olivier ne présente aucune cytotoxicité contre les larves d'*Artemia salina* avec une valeur de DL_{50} de 9 800 µg/ml.

Mots clés *Olea europaea* · Extrait méthanolique · Activité anti-inflammatoire · Activité antalgique · Activité cytotoxique · Analyse CLHP

Abstract *Olea europaea* is a medicinal plant widely used in traditional medicine in Algeria. In this study, the anti-inflammatory, analgesic and cytotoxic activities of the methanolic extract of *Olea europaea* leaves were evaluated. Similarly, a phytochemical study was conducted to identify the different families of chemical compounds contained in these extract. The obtained results showed that the qualitative analysis of extract by HPLC, allowed highlighting majority compounds and minority compounds. The quantitative estimation of total polyphenols and flavonoids showed their existence in this extract, with a rate of 115.35 ± 2.24 mg EAG/g extract and 7.19 ± 0.19 mg EQ/g extract, respectively. The anti-inflammatory activity in vivo of methanolic extract of *Olea europaea* was evaluated by induction of paw and ear edema in mice using the carrageenan and croton oil respectively. The obtained results indicated that all samples exerted an inhibition, more or less effective, of the edema compared to the control. Thus, the oral administration of 400 mg/kg of methanolic extract of *Olea europaea* to mice induced a strong inhibition of paw edema with a percentage of 96%. This anti-inflammatory activity was confirmed topically by ear edema test. Similarly, the obtained results indicated also that the methanolic extract (600 mg/kg) of *Olea europaea* inhibited the pain caused by acetic acid in mice with a percentage of 77.49%. Finally, the cytotoxicity test against *Artemia salina* larvae "Brine shrimp test" showed that the methanolic extract

Z. Lakache (✉) · C. Tigrine · A. Kameli
Laboratoire d'ethnobotanique et de substances naturelles,
École normale supérieure, Kouba, Alger, Algérie
e-mail : lakache.zineb@yahoo.fr

H. Aliboudhar
USTHB, laboratoire d'analyse organique fonctionnelle, faculté
de chimie, université des sciences et de la technologie
Houari-Boumediene, El-Bab-Ezzouar, Alger, Algérie

of leaves showed no cytotoxicity against these larvae with DL_{50} value of 9,800 $\mu\text{g/ml}$.

Keywords *Olea europaea* · Methanolic extract · Anti-inflammatory activity · Analgesic activity · Cytotoxic activity · CLHP analysis

Introduction

En Algérie, beaucoup de plantes sont traditionnellement utilisées pour traiter les maladies inflammatoires, cardiovasculaires et en particulier le diabète. L'utilisation des feuilles d'olivier en phytothérapie remonte très loin dans l'histoire. En médecine traditionnelle, les feuilles d'olivier sont utilisées pour désinfecter les blessures cutanées et traiter le diabète et l'hypertension. Les fruits et les feuilles d'olivier peuvent être considérés comme une source potentielle d'antioxydants naturels pouvant être utilisés dans l'industrie pharmaceutique. Les feuilles d'*Olea europaea* sont connues pour leurs vertus bénéfiques pour la santé humaine dues à leurs richesses en plusieurs composants naturels d'une bioactivité importante, tels que les antioxydants dont les tocophérols, les flavonoïdes et les composants phénoliques ; parmi lesquels les plus abondants sont les sécoiridoïdes comme l'oleuropéine. Ces composés possèdent aussi des pouvoirs antioxydant, anti-inflammatoire, antimicrobien et anticancéreux qui les rendent très importants pour les domaines de la santé et de l'industrie agroalimentaire [1–4].

Dans ce contexte, l'objectif global de ce travail est d'évaluer le dosage colorimétrique des polyphénols totaux et des flavonoïdes et l'analyse qualitative par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* cultivé en Algérie et de mettre en évidence leurs activités anti-inflammatoire, antalgique et cytotoxique.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Les feuilles de l'espèce *Olea europaea* ont été récoltées dans la région de Larbaatach, wilaya de Boumerdès au mois d'octobre 2011. Après leur identification, les feuilles récoltées et triées sont nettoyées puis mises à sécher à température ambiante dans un endroit aéré à l'ombre et ensuite finement broyées.

Matériel animal

Les différentes activités biologiques in vivo ont été effectuées sur des souris albinos de souche Swiss provenant de

l'institut Pasteur (Alger). Au total, une centaine de souris de sexe mâle et dont le poids varie entre 20 et 28 g ont été utilisées. Ces animaux ont été stabulés dans des cages en plastique à la température ambiante (25 °C), et un éclairage de 12 heures par jour, avec un régime alimentaire de granulés d'origine ONAB et de l'eau ad libitum.

Extraction par macération

Vingt grammes de poudre des feuilles d'*Olea europaea* sont mises à macérer dans 600 ml de méthanol absolu pendant 48 heures à température ambiante du laboratoire. L'opération de macération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant pour extraire le maximum du produit bioactif. Après filtration sur papier filtre, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur (BÜCHI). Le résidu sec pesé est conservé à 4 °C.

Détermination du rendement

Le poids en extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide.

Analyse de l'extrait méthanolique par chromatographie liquide à haute performance

La technique analytique de CLHP a été utilisée pour les composés phénoliques de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea*. L'élution a été réalisée à température ambiante de 23 °C en mode gradient grâce à un mélange de solvants binaire composé d'eau acidifiée par 5 % d'acide chlorhydrique (solvant A) et de méthanol à 100 % (solvant B). Le flux de la phase mobile est de 0,6 ml/min, et le volume d'injection de chaque échantillon était de 20 μl . Les composés phénoliques ont été détectés à 254, 265, 280, 293, 320 nm. Les pics des composés phénoliques ont été identifiés par comparaison de leur temps de rétention à ceux des standards et en vérifiant leur spectre caractéristique.

Dosage colorimétrique

Dosage des polyphénols totaux

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) qui sont réduits lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène [5].

À 0,25 ml d'extrait est ajouté 0,25 ml du réactif de Folin Ciocalteu et 3,5 ml de H_2O . Le mélange est incubé à température ambiante pendant trois minutes. Ensuite 1 ml de la solution de carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) 20 %

est ajouté au mélange. Après 40 minutes d'incubation à la température du laboratoire, l'absorbance est lue à 685 nm contre un blanc sans extrait [6]. La concentration des polyphénols est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0–40 µg/ml). Les résultats sont exprimés en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

Dosage des flavonoïdes

La formation d'une liaison covalente entre le trichlorure d'aluminium et les groupements hydroxyles (OH) des flavonoïdes produit un complexe de couleur jaune ayant une absorbance maximale à 430 nm.

La méthode du trichlorure d'aluminium de Bahorun et al. [7] est employée pour quantifier la teneur en flavonoïdes totaux dans l'extrait des feuilles d'*Olea europaea*. Un millilitre de l'échantillon est ajouté à 1 ml de la solution d'AlCl₃ (2 % dans le méthanol), le mélange est vigoureusement agité. Après dix minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0–40 µg/ml) et est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait).

Étude de la toxicité

Plusieurs concentrations en extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* ont été testées (600, 1 000, 2 000, 4 000 mg/kg), diluées dans l'eau physiologique (NaCl 0,9 %). Nous avons constitué cinq lots contenant chacun six souris. Le premier recevra par voie orale l'eau physiologique (témoin –), et les autres lots sont traités par les différentes concentrations de l'extrait méthanolique qui sont ensuite mises à l'observation durant 72 heures concernant les symptômes de toxicité et le taux de mortalité [8].

Étude de l'activité anti-inflammatoire in vivo

Activité anti-inflammatoire aiguë

L'activité anti-inflammatoire est évaluée par la méthode de l'inhibition de l'œdème de la patte de souris induit par la carragénine [9]. Les animaux ont été mis à jeun 12 heures avant l'expérimentation et pesés. Au moment de l'expérimentation, cinq lots de six souris ont été constitués de façon aléatoire. L'épaisseur initiale de la patte postérieure de chaque souris est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse numérique avant d'administrer l'extrait méthanolique par voie orale. Les souris ont été traitées avec les concentrations suivantes :

- lot témoin : la solution d'eau physiologique ;

- lot de référence : la solution de l'aspirine à la concentration de 100 mg/kg ;
- lot traité 1 : la solution de l'extrait à la concentration de 200 mg/kg ;
- lot traité 2 : la solution de l'extrait à la concentration de 400 mg/kg ;
- lot traité 3 : la solution de l'extrait à la concentration de 600 mg/kg.

Une heure après l'administration, 5 µl d'une solution de carragénine à 1 % est injectée par voie sous-cutanée au niveau de l'aponévrose de la patte postérieure gauche de la souris. L'épaisseur de la patte a été mesurée toutes les heures jusqu'à la quatrième heure.

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = [(\Delta T - \Delta E) / \Delta T] \times 100$$

ΔT : différence entre la moyenne des pattes postérieures (droites–gauches) pour le lot témoin – (eau physiologique 0,9 % NaCl).

ΔE : différence entre la moyenne des pattes postérieures (droites–gauches) pour le lot essai (extrait méthanolique ou témoin +).

Activité anti-inflammatoire au niveau de l'œdème de l'oreille

Les souris ont été mises à jeun 12 heures avant l'expérimentation et pesées. Une inflammation cutanée a été induite sur la face interne de l'oreille droite de chaque souris, et cela par l'application de 15 µl de la solution d'huile de croton [10,11]. Les souris ont été réparties au hasard en cinq lots de six souris chacun. Une demi-heure avant l'induction de l'inflammation par une solution de 5 % d'huile de croton, les différents lots de souris ont reçu par application cutanée les différents traitements :

- lot témoin : la solution d'eau physiologique ;
- lot de référence : la solution de l'aspirine à la concentration de 0,5 mg/oreille ;
- lot traité 1 : la solution de l'extrait à la concentration de 0,5 mg/oreille ;
- lot traité 2 : la solution de l'extrait à la concentration de 1 mg/oreille ;
- lot traité 3 : la solution de l'extrait à la concentration de 2 mg/oreille.

Quatre heures après cette opération, les animaux ont été sacrifiés et des pièces circulaires de 5 mm de diamètre ont été coupées et retirées des oreilles traitées et non traitées, puis pesées. L'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au témoin négatif, selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = [(\Delta T - \Delta E) / \Delta T] \times 100$$

ΔT : différence entre le poids moyen des oreilles (droites–gauches) pour le lot témoin – (eau physiologique 0,9 % NaCl).

ΔE : différence entre le poids moyen des oreilles (droites–gauches) pour le lot essai (extrait méthanolique ou témoin +).

Étude de l'activité antalgique (test de contorsion)

Cette étude a été réalisée selon la méthode de Collier et al. [12]. Elle consiste à réduire, par substance antalgique, la douleur provoquée chez les souris par l'injection d'une substance irritante capable d'entraîner des mouvements de torsion.

L'activité antalgique a été évaluée sur des torsions provoquées par administration intrapéritonéale de la solution d'acide acétique à des souris. Les animaux ont été mis à jeun 12 heures avant l'expérimentation et pesés. Dans cette étude, cinq lots ont été constitués contenant chacun six souris. Les différentes concentrations d'extrait sont administrées par voie orale à l'aide d'une sonde gastrique selon les concentrations suivantes :

- lot témoin : la solution d'eau physiologique ;
- lot de référence : la solution de l'aspirine à la concentration de 100 mg/kg ;
- lot traité 1 : la solution de l'extrait à la concentration de 200 mg/kg ;
- lot traité 2 : la solution de l'extrait à la concentration de 400 mg/kg ;
- lot traité 3 : la solution de l'extrait à la concentration de 600 mg/kg.

Une heure après administration orale d'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea*, une injection de 0,2 ml d'une solution d'acide acétique à 3 % par voie intrapéritonéale à des souris. Le nombre de contorsions (NC) pour chaque souris est compté dix minutes après l'injection de l'acide acétique pendant dix minutes.

$$\% \text{ de réduction de la douleur} = [(\Delta T - \Delta E) / \Delta T] \times 100$$

ΔT : moyenne du nombre de contorsions dans le lot témoin – (eau physiologique 0,9 % NaCl).

ΔE : moyenne du nombre de contorsions dans le lot essai (extrait méthanolique ou témoin +).

Étude de l'activité cytotoxique par le test de « Brine shrimp »

Récemment, plusieurs tests de toxicité sont développés pour lesquels la réponse a été mesurée chez les invertébrés. Ces tests sont souvent peu coûteux, reproductibles et faciles. L'*Artemia salina* est largement utilisée dans les applications toxicologiques.

Ce test est très utile pour établir la cytotoxicité d'extraits de la plante. Il permet également la détermination de la concentration qui tue 50 % des *Artemia* (DL_{50}) pendant 24 heures sous des conditions standardisées [13]. Les œufs de crevettes (*Artemia salina*) ont été fournis par le Centre national de recherche, de développement et de la pêche (CNRDPA), Tipaza. Environ 1 g d'œufs de crevettes sont placés dans un récipient rectangulaire en plastique muni d'une source d'oxygène contenant initialement 1 l d'eau de mer préparée (36 g de sel de mer dans 1 l d'eau distillée). Après une période d'éclosion de 24 heures à 26 °C et à lumière constante, les larves sont récupérées et comptées en utilisant un microscope.

L'extrait méthanolique des feuilles d'olivier est solubilisé dans l'eau salée de manière à obtenir une concentration de 10 000 µg/ml pour obtenir les concentrations suivantes : 1 000, 100, 10, 1 µg/ml. 2,5 ml de chaque concentration sont ajoutés aux tubes à essai contenant chacun dix larves d'*Artemia salina*. Trois répétitions ont été réalisées pour chaque concentration. Une solution saline sans extrait ajouté est utilisée comme témoin. Le pourcentage de mortalité des larves est déterminé après 24 heures d'incubation à l'obscurité et à la température ambiante. Les larves survivantes sont comptées à l'aide d'une loupe binoculaire, et le pourcentage de mortalité est déterminé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ Mortalité} = (NLM / NLT) \times 100$$

NLM : nombre de larves mortes ; NLT : nombre de larves testées.

La dose DL_{50} est déterminée à partir de la courbe de régression qui exprime le pourcentage des larves tuées en fonction du logarithme de la dose de l'échantillon testé.

Étude statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type. La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à un facteur (Anova), suivi par le test de Turky pour comparaison par paires. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme différence significative. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLStat 2012.

Résultats et discussion

Détermination du rendement

Les résultats obtenus montrent que l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* représente un rendement de 26,96 % par rapport à la matière végétale sèche.

Dosage colorimétrique des polyphénols totaux et des flavonoïdes

Les résultats des polyphénols totaux des feuilles d'olivier sont exprimés en mg EAG/g d'extrait plante (Fig. 1). L'estimation quantitative des polyphénols totaux montre que l'extrait de méthanol d'*Olea europaea* est riche en composés phénoliques ($115,35 \pm 2,24$ mg EAG/g d'extrait).

Les résultats du dosage des flavonoïdes sont exprimés en mg EQ/g d'extrait (Fig. 2). Nos résultats montrent que l'extrait de méthanol d'*Olea europaea* ($7,19 \pm 0,19$ mg EQ/g d'extrait) est riche en flavonoïdes. Dans une étude faite sur huit variétés d'olivier, Ben Salah et al. [14] ont déterminé la teneur des composés phénoliques des feuilles d'un extrait éthanolique (7/3 (v/v)). Ils ont trouvé que les teneurs des polyphénols totaux et des flavonoïdes varient entre 73 et 144 mg EAG/g et 56 et 125 mg EQ/g respectivement. Ces teneurs sont relativement élevées. Nashwa et Abdel-Aziz [15] montrent que les teneurs des polyphénols totaux et des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* sont de l'ordre de 90,48 mg EAG/g et 21,45 mg EQ/g respectivement. Ce résultat est relativement similaire à celui trouvé dans nos études. Dans une étude faite sur la même espèce végétale pour un extrait méthanolique,

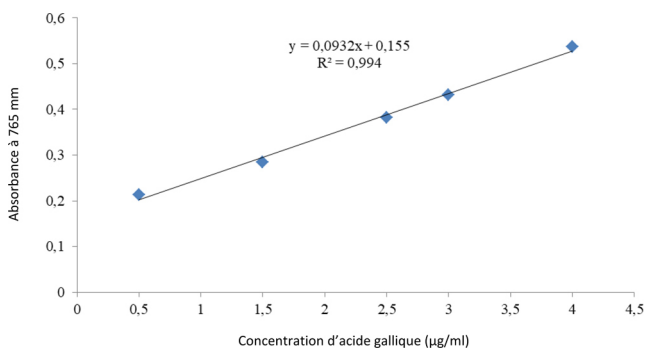


Fig. 1 Droite d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

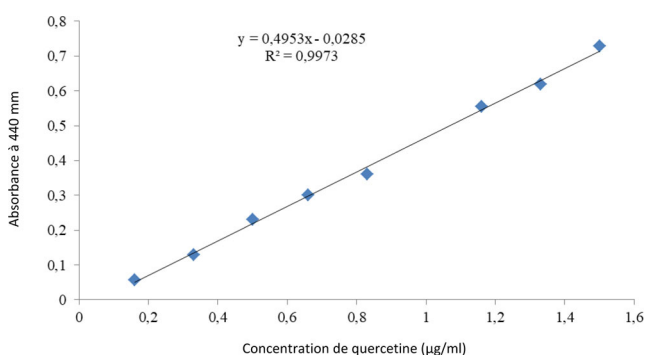


Fig. 2 Droite d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

Abaza et al. [16] ont déterminé la teneur en polyphénols totaux (24 mg EAG/g), ils ont trouvé que cette teneur est relativement faible.

Analyse de l'extrait par chromatographie liquide à haute performance

Une analyse chromatographique, par CLHP, a été effectuée pour étudier la composition phénolique dans l'extrait méthanolique des feuilles d'olivier. Afin d'identifier nos composés séparés, nous avons utilisé plusieurs standards des acides phénoliques et des flavonoïdes de différentes natures (Fig. 3) (Tableau 1). La comparaison des temps de rétention et des spectres UV des pics obtenus avec ceux des standards nous a permis d'identifier ces composés phénoliques dans l'extrait d'olivier : la rutine, la naringine et la naringénine.

Étude de la toxicité

Les résultats obtenus ne montrent aucun symptôme de toxicité et aucune mortalité chez les différents essais des souris ayant reçu par voie orale l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* aux concentrations de 600, 1 000, 2 000, 4 000 mg/kg.

Étude de l'activité anti-inflammatoire in vivo

Activité anti-inflammatoire aiguë

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire sont rapportés sur la figure 4 et dans le tableau 2 qui présentent les variations de la cinétique de réduction de l'œdème des pattes postérieures gauches (PPG) des souris des différents essais (T+, CME) par rapport au témoin négatif (eau physiologique).

L'injection de 100 µl de carragénine à 0,6 %, au niveau de la patte postérieure gauche de souris, provoque une inflammation visible dans les différents lots. Une heure après l'injection, cet œdème diminue progressivement avec le temps jusqu'à la fin de l'expérience (quatre heures). Le témoin négatif, traité avec l'eau physiologique, est le lot qui a présenté l'épaisseur de gonflement le plus important.

Durant cette étude cinétique, le prétraitement des souris par l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* a induit une forte inhibition de l'inflammation avec un pourcentage de réduction de 96 % à la concentration de 400 mg/kg.

L'inflammation aiguë induite chez la souris par l'injection de la carragénine est un modèle standard et pratique, largement utilisé pour l'évaluation des propriétés anti-inflammatoires de différents agents [17]. La carragénine stimule la libération de l'histamine et de la sérotonine par les mastocytes, débutant par cela une cascade d'événements produisant d'autres médiateurs qui contribuent à l'établissement de la réaction inflammatoire aiguë.

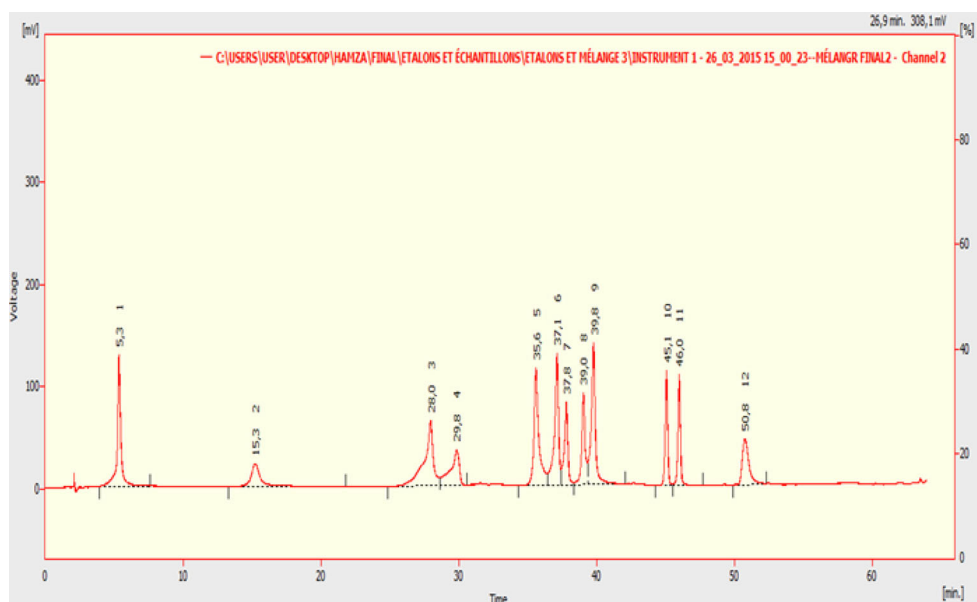


Fig. 3 Chromatogramme HPLC des standards visibles à 254 nm (acide gallique, acide caféique, rutine, naringine, quercétine, naringénine, hespérétine, kaempférol, apigénine, flavone, metoxyflavone, gossypine)

Tableau 1 Temps de rétention des différents témoins polyphénoliques obtenus par la séparation avec HPLC			
N° de pic	Composé phénolique	tR (min)	λ max (nm)
1	Acide gallique	5,34	272,5
2	Acide caféique	15,25	327
3	Rutine	27,98	354,5
4	Naringine	29,83	288,9
5	Quercétine	35,62	372,7
6	Naringénine	37,14	292,2
7	Hespérétine	37,81	291,1
8	Kaempférol	39,02	362,9
9	Apigénine	39,79	344,4
10	Flavone	45,08	325,9
11	Metoxyflavone	45,99	325,0
12	Gossypine	50,75	382,4

D'après nos résultats, l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* exerce une activité anti-inflammatoire remarquable. Lors du traitement de nos souris par 100 mg/kg de l'aspirine, il induit une inhibition significative de l'inflammation de 71,42 %. De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire, par l'inhibition des enzymes de régulation. Par ailleurs, l'acide arachidonique peut être métabolisé par la voie de la lipo-oxygénase pour aboutir à la formation de leucotriènes et par la voie de la

cylo-oxygénase pour produire des thromboxanes et des prostaglandines, molécules fortement impliquées dans le processus inflammatoire. En effet, certains flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la production des prostaglandines, molécules pro-inflammatoires très actives. Cet effet serait dû à la réduction du métabolisme de l'acide arachidonique par l'inhibition de la lipo-oxygénase, de la cyclo-oxygénase et de la phospholipase A2 [18–20].

Les flavonoïdes inhibent la migration des leucocytes en bloquant leur adhésion à la paroi vasculaire. Cet effet serait dû à l'inhibition de la synthèse de l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), principaux inducteurs de l'expression des molécules adhésives sur la paroi vasculaire. L'acide gallique, à son tour, inhibe la migration des leucocytes en inhibant les molécules d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM-1), les molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM-1) et la sélectine-E dans les cellules endothéliales vasculaires. Cette inhibition est due à l'inhibition de l'IL-1, le TNF- α , et le NF- κ B. Il a été rapporté, en effet, que la quercétine bloque aussi l'adhésion des leucocytes à la paroi endothéliale des veines ombilicales par l'inhibition de l'expression des ICAM-1 [21,22]. La présence de tanins, de flavonoïdes, et d'anthocyanes dans les feuilles d'olivier contribue à cet effet anti-inflammatoire. Ces composés ont le pouvoir d'inhiber la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que les leucotriènes et les prostaglandines (PGI2, PGD2 et PGE2). Cependant, la différence des niveaux d'inhibition entre les deux extraits alcooliques est probablement due à la différence de la composition chimique [23,24].

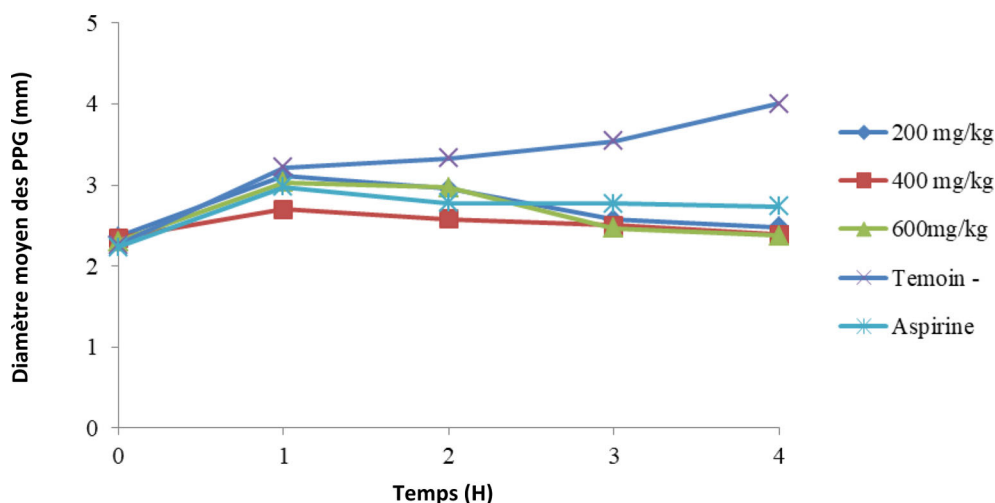


Fig. 4 Cinétique de réduction de l'œdème dans les pattes postérieures gauches (PPG) des souris de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea*

Traitements	Dose (mg/kg)	% réduction de l'œdème
Extrait méthanolique d' <i>Olea europaea</i>	200	93,71 % (a)
	400	96,00 % (a)
	600	97,71 % (a)
Aspirine	100	71,42 % (a)

Traitements	Dose (mg/oreille)	% réduction de l'œdème
Extrait méthanolique d' <i>Olea europaea</i>	0,5	42,42 (b)
	1	26,81 (b)
	2	17,57 (c)
Aspirine	0,5	81,66 (a, c)

Activité anti-inflammatoire au niveau de l'œdème de l'oreille

L'étude de l'activité anti-inflammatoire de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* est réalisée par la mesure du pourcentage de réduction de l'œdème induit par l'huile de croton dans les différents essais, par rapport au témoin négatif (eau physiologique 0,9 % NaCl). Les résultats sont représentés dans le tableau 3.

Le calcul du pourcentage de réduction de l'œdème a révélé que le lot traité par l'extrait méthanolique d'olivier présente un taux élevé où la réduction était de 42,42 % à 0,5 mg/oreille. L'activité anti-inflammatoire locale a été évaluée chez la souris par la mesure de la réaction inflammatoire à l'application locale d'un agent irritant (huile de croton) au niveau de l'oreille [25]. L'application topique de cette huile, qui contient des esters de phorbol, induit une réaction inflammatoire aiguë caractérisée par une vasodilatation, infiltration des leucocytes polynucléaires dans les tissus et la formation de l'œdème [26].

Le traitement local des souris par l'extrait méthanolique des feuilles d'olivier (200 mg/kg) conduit à une réduction significative de la taille de l'œdème par rapport à celle obtenue par l'aspirine. L'activité anti-inflammatoire de ces extraits pourrait s'expliquer par la présence des stéroïdes, des triterpènes, des polyphénols [27,28]. Leur mécanisme d'action correspondrait à celui des anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) qui consiste à l'inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique par blocage de la phospholipase A2 au niveau des phospholipides membranaires.

Il est mentionné, dans plusieurs articles de synthèse, que les feuilles d'*Olea europaea*, contenant en quantité importante des flavonoïdes et des tanins, sont utilisées depuis longtemps comme anti-inflammatoire. Les flavonoïdes limitent la production des superoxydes en inhibant la synthèse des prostaglandines. Ces radicaux libres responsables des lésions tissulaires sont également produits par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles au cours de la phagocytose. Selon Tapas et al. [29], les flavones et les flavonols, sous forme glycosylée ou libre comme la quercétine, le kaempférol, la myrecétine, ont une activité inhibitrice de cyclo-oxygénase (COX).

Étude de l'activité antalgique

Cette étude consiste à induire une action algogène par l'administration à des souris de l'acide acétique (1 %), par voie intrapéritonéale. Cette injection provoque une sensation de douleur qui se manifeste chez la souris par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorsoabdominale appelés contorsions abdominales. L'effet analgésique est apprécié par le dénombrement de ces crampes pendant 30 minutes après l'injection de l'agent algogène. Au cours du test, une forte inhibition de la douleur a été observée avec l'extrait méthanolique d'*Olea europaea* à 600 mg/kg avec un pourcentage d'inhibition de la douleur de 77,49 % (Tableau 4) (Fig. 5).

L'activité antalgique a été évaluée sur des torsions provoquées par administration intrapéritonéale de la solution d'acide acétique à des souris. L'acide acétique provoque une lésion tissulaire responsable de la libération d'un certain nombre de médiateurs chimiques tels que la bradykinine, l'histamine, la sérotonine, l'acétylcholine et les prostaglandines. Ces dernières sensibilisent les nocicepteurs aux stimuli douloureux. Il en résulte une douleur plus tardive et diffuse. Cette douleur se manifeste chez les souris par un mouvement d'étirement des pattes postérieures et de torsion

Tableau 4 Activité antalgique de l'extrait méthanolique des feuilles d' <i>Olea europaea</i>		
Traitements	Dose (mg/kg)	% réduction de contractions
Extrait méthanolique d' <i>Olea europaea</i>	200	56,20 (b)
	400	68,21 (a)
	600	77,49 (a)
Aspirine	100	52,76 (b, c)

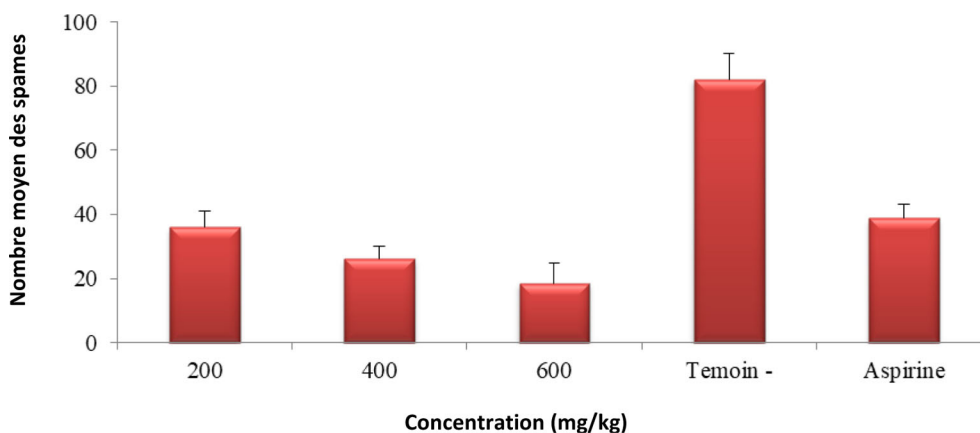


Fig. 5 Nombre moyen de contorsions pour chaque lot pendant dix minutes de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea*

de la musculature dorsoabdominale [30]. L'extrait méthanolique des feuilles d'olivier inhibe les contractions abdominales de manière significative et concentration-dépendante. Cet effet analgésique pourrait être lié à l'inhibition de la libération des médiateurs chimiques. Dans notre étude, l'activité antalgique de nos extraits est liée, probablement, à la présence de certaines molécules, notamment les flavonoïdes qui sont présents avec un taux élevé. L'aspirine, par une réaction chimique d'acétylation, inhibe de façon irréversible les enzymes cyclo-oxygénases (COX 1 et COX 2), des enzymes participant à la production de prostaglandines et de thromboxanes. Elle réduit la douleur en bloquant la production des hormones responsables des messages transmis aux récepteurs de la douleur dans le cerveau d'où son efficacité sur les douleurs d'origines diverses [31,32].

Étude de l'activité cytotoxique par le test de « Brine shrimp »

Le pourcentage de mortalité des larves est déterminé après une exposition de 24 heures aux échantillons testés, à différentes concentrations, et les résultats sont présentés sur la figure 6. Nos résultats montrent que le pourcentage de mortalité des larves augmente avec la concentration de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea*, et le maximum de mortalité (53 %) a été obtenu à partir de la concentration 100 µg/ml. Nous constatons aussi que cet extrait d'olivier ne présente aucune cytotoxicité contre les larves d'*Artemia salina* avec une DL₅₀ de 9 800 µg/ml. Selon Meyer et al. [33], les extraits sont non toxiques si leur DL₅₀ est supérieure à 1 000 µg/ml.

À ce jour et d'après la littérature scientifique, il n'existe aucun rapport ou publication scientifique rapportant le test de cytotoxicité de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea*. Toujours dans le même sillage, des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par plusieurs

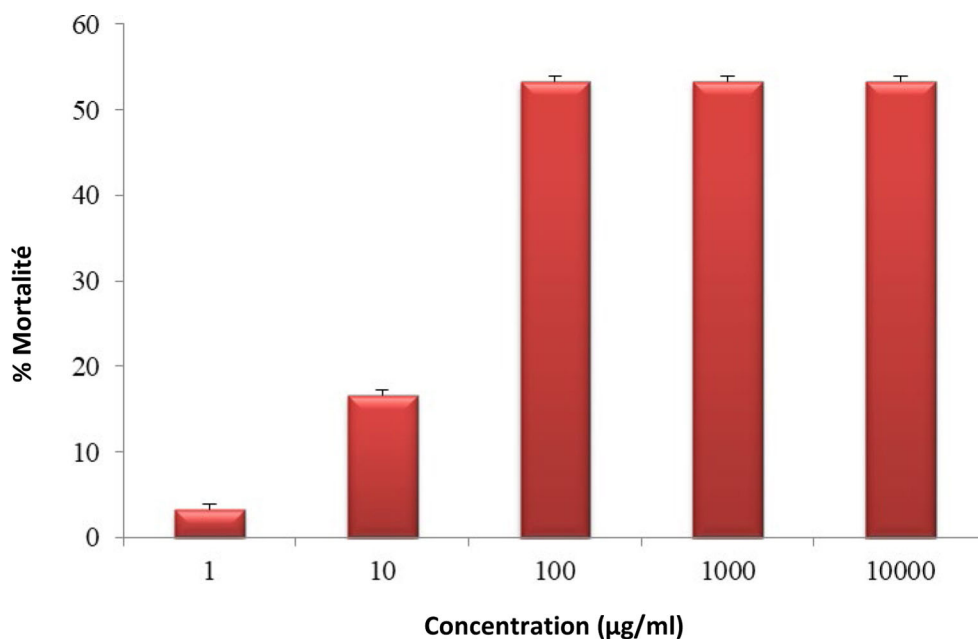


Fig. 6 Pourcentage de mortalité des larves d'*Artemia salina* de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Olea europaea* (chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm ET)

travaux scientifiques, mais sur d'autres plantes. McLaughlin et al. [34], dans une étude sur l'utilité de ce test comme un préscreening antitumoral des extraits de plantes, ont été capable de déterminer une corrélation positive entre la mortalité des larves d'*Artemia* et la cytotoxicité contre les cellules KB. Ils ont permis la découverte d'acétogénines d'Annonaceae comme une nouvelle classe de pesticides naturels et d'agents antitumoraux actifs. L'étude cytotoxique réalisée dans un test de létalité contre l'*Artemia salina* a révélé une activité significative de deux anthraquinones (chrysophanol et physcion) avec des valeurs de DL_{50} respectives de 289,0 et 158,1 µg/ml. Ces deux anthraquinones ont été isolées à partir de l'extrait d'éther de pétrole des racines [35].

Conclusion

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les feuilles d'*Olea europaea* ont des propriétés anti-inflammatoires et antalgiques qui pourraient justifier l'utilisation de cette plante en médecine traditionnelle contre les maladies inflammatoires. Les feuilles d'olivier peuvent être considérées comme une source potentielle de produits naturels et de composés à activités biologiques et pharmacologiques pouvant être utilisés dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- Susalit E, Agus N, Effendi I, et al (2010) Olive (*Olea europaea*) leaf extracts effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine* 18:251–8
- Tayoub G, Sulaiman H, Hassan AH, et al (2012) Determination of oleuropein in leaves and fruits of some Syrian olive varieties. *Int J Med Arom Plants* 2:428–33
- Vogel P, Machado IK, Garavaglia J, et al (2015) Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutr Hosp* 31:1427–33
- Lamzira Z, Ghabbour N, Rokni Y, et al (2014) Characterization of Phenolic Profile of Moroccan Picholine Olive Variety. *JMES* 5:490–497
- Ribereau-Gayon P (1968) Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, 254 p
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *ASEV* 16:144–58
- Bahorun T, Gressier B, Trotin F, et al (1996) Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei-Forschung* 46:1086–9
- Hilan C, Bouaoun D, Aoun J, et al (2009) Antimicrobial properties and toxicity by LD_{50} determination of an essential oil of *Prangosa sperula* Boissier. *Phytothérapie* 7:8–14
- Sy GY, Fall AD, Diatta W, et al (2009) Analgesic and anti-inflammatory activity of aqueous root extract of *Cassia sieberiana* D. C. (Caesalpinaceae). *AFR J Pharm Pharmacol* 3:651–3
- Sosa S, Altinier G, Politi M, et al (2005) Extracts and constituents of *Lavandula multifida* with topical anti-inflammatory activity. *Phytomedicine* 12:271–7
- Al-Reza SM, Yoon JI, Kim HJ, et al (2010) Anti-inflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujuba*. *Food Chem Toxicol* 48:639–43

12. Collier HO, Dinneen LC, Johnson CA, et al (1968) The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J Pharmacol Chemother* 32:295–310
13. Turker AU, Camper ND (2002) Biological activity of common mullein, a medicinal plant. *J Ethnopharmacol* 82:117–25
14. Ben Salah M, Abdelmelek H, Abderraba M (2012) Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Med Chem* 2:107–11
15. Nashwa FSM, Abdel-Aziz ME (2014) Efficiency of olive (*Olea europaea* L.) leaf extract as antioxidant and anticancer agents. *J Agroalimnet Processes Technol* 20:46–53
16. Abaza L, ben Youssef N, Manai H, et al (2011) Chetoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas Aceites* 62:96–104
17. Cuzzocrea S, Constantino G, Caputi AP (1998) Protective effect of melatonin on cellular energy depletion mediated by peroxynitrite and poly (ADP-ribose) synthetase activation in a non-septic shock model induced by zymosan in the rat. *J Pineal Res* 25:78–85
18. Viji V, Helen A (2008) Inhibition of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 enzymes by extracts isolated from *Bacopa monniera* (L.) Wettst. *J Ethnopharmacol* 118:305–11
19. Min HP, Ching SL, Chi TH (2010) Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct* 1:15–31
20. Anilkumar M (2010) Ethnomedicinal plants as antiinflammatory and analgesic agents. In *Ethnomedicine: a source of complementary therapeutics*. Chattopadhyay D (ed). Research Signpost, Kerala India, pp 267–93
21. Napimoga MH, Clemente-Napimoga JT, Macedo CG (2013) Quercetin inhibits inflammatory bone resorption in a mouse periodontitis model. *J Nat Prod* 76:2316–21
22. Gustavo SQ, Melina H, Fábri A, et al (2015) Antibacterial and anti-inflammatory activities of *Bunchosia armeniaca*. *Rec Nat Prod* 9:419–31
23. Chebbi MR, Khemiss M, Dhidah M, et al (2011) Chloroformic and methanolic extracts of *Olea europaea* L. leaves present anti-inflammatory and analgesic activities. *Pharmacology* 6:1–5
24. Giner E, Recio MC, Ríos JL, et al (2013) Oleuropein protects against dextran sodium sulfate-induced chronic colitis in mice. *J Nat Prod* 76:1113–20
25. Cabrini DA, Moresco HH, Imazu P, et al (2011) Analysis of the potential topical anti-inflammatory activity of *Averrhoa carambola* L. in mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 11:1–7
26. Rahman A, Fazal F (2011) Blocking NF- κ B: an inflammatory issue. *Proc Am Thorac Soc* 8:497–503
27. Kumar D, Bhat ZA, Kumar V, et al (2012) Effects of *Stachys tibetica* essential oil in anxiety. *Eur J Integr Med* 4:169–176.
28. Nabavi SF, Habtemariam S, Ahmed T, et al (2015) Polyphenolic composition of *Crataegus monogyna* Jacq: from chemistry to medical applications. *Nutrients* 7:7708–28
29. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB (2008) Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Trop. J. Pharm. Res* 7:1089–99
30. Prabhu VV, Nalini G, Chidambaranathan N, et al (2011) Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of *Tridax procumbens* Linn against formalin, acetic acid and CFA induced pain models. *Int J Pharm Pharm Sci* 3:126–30
31. Blobaum AL, Marnett LJ (2007) Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. *Eur. J. Med Chem* 50:1425–41
32. Botting RM (2010) Vane's discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. *Pharmacol Rep* 62:518–25
33. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, et al (1982) A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45:31–4
34. McLaughlin JL, Rogers LL, Anderson JE (1998) The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J* 32:513–24
35. Amatya S, Tuladhar SM (2005) Eupatoric acid: a novel triterpene from *Eupatorium odoratum* L. (Asteraceae). *Zeitschrift für Naturforschung C-A. J Biosci* 60:1006–11