

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biochimie-Biologie  
Cellulaire et Moléculaire

كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم الكيمياء الحيوية - البيولوجيا الخلوية والجزئية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : Biochimie

N° d'ordre :  
N° de série :

Intitulé :

---

Etude de quelques activités Biologiques et Antimicrobiennes de *Lawsonia inermis*.

---

Présenté par : Boulbaroud Khaoula Ferial  
Baadeche Radhia

Le 30/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mme. Bennamoun L. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Mme. Dakhmouche S. (MCA – ENS Constantine Assia Djébar université3).

Examineur 2 : Mme Klibet F. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire  
2021 - 2022

# *Remerciement*

*Tout d'abord, nos remerciements les plus sincères s'adressent à **ALLAH**, le tout puissant, qui a fait de nous ce que nous sommes aujourd'hui et nous a donné le courage et la santé pour achever ce travail.*

*Nous exprimons toutes nos gratitude à notre encadreur Mme **BENNAMOUN LEILA**, Maître de conférences B à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Constantine 1 pour les orientations, les encouragements et les fructueux conseils dans le suivi de ce travail.*

*Nous remercions très sincèrement à Mme **DAKHMOUCHE S.** Maître de conférences A à l'ENS Constantine Assia Djébar université 3 d'avoir acceptée d'examiner notre travail, ainsi que Mme **KLIBET F.** Maître de conférences B à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Université Constantine 1.*

*Nous remercions tous les ingénieurs des différents Laboratoires du Centre de Recherche en Biotechnologie (**CRBT**) spécialement Messieurs **SMAILI AMINE**, **MOKHTARI MOHAMED BADRE EDDINE** et Docteur **BENSOUICI CHAOUKI** maitre de recherche B, qui nous ont aidé dans l'accomplissement de ce modeste travail. Sans oublier, Mesdames **BENDEMENE SAMIA** et Mme **ABDELAZIZ WIDED** cheffe du département de microbiologie pour les efforts qu'elles ont déployés pour nous.*

*Nos vifs remerciements pour toute personne ayant contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.*

# *Dédicace*

*A celle qui a attendu avec patience les fruits  
de sa bonne éducation et de son dévouement*

*A ma chère mère*

*A celui qui a changé la nuit en jour pour  
m'assurer les bonnes conditions*

*A mon cher défunt père*

*A ma petite famille qui m'a toujours soutenue*

*A mes chers frères Borhan et Ramzi*

*A ma belle-sœur Asma*

*A ma petite princesse Ania Sibelle*

*A tous mes amis Meroua, Jihen*

*A mon binôme Radhia*

*Je dédie ce modeste travail*



*khaoula*

# **DEDICACE**

*Je dédie le fruit de mes humbles efforts*

*A ceux qui m'ont donné vie et espoir, et grandi avec l'Amour de la curiosité et de la connaissance, et qui m'ont appris à gravir les échelons de la vie avec sagesse et patience : **mon cher père, ma chère mère.***

*A la perdue de Mon cœur, à MA deuxième Mère, à celle qui attendait Mon diplôme plus de mille vies : **ma grand-mère aimée...et mon grand-père** aussi que **DIEU** garde leurs âmes dans son vaste paradis.*

*A mon compagnon de vie, à mon soutien permanent, à mon cher époux : **Abdou***

*A mon ami, mon soutien éternel, l'épaule ferme : ma tante **Noura***

*A celui qui a partagé avec moi le doux et l'amer de vie sous un même toit : **Ines, Badis et Ibtihel.***

*Aux **tantes** au goût de sœurs, à la source des conseils, et à leurs enfants.*

*À **mes oncles**, à mon soutien dans mon parcours académique, et leurs enfants.*

*À ma deuxième famille \* **Bouchiha** \*, à ma mère **Mahbouba**, et à toute ta famille, surtout les jeunes poussins.*

*A tous les amis de l'école.*

*A mon binôme **Khaoula.***

**Radhia**

## TABLE DES MATIERES

| Titre  | Page      |
|--|-----------|
| Remerciement   |           |
| Dédicace   |           |
| Liste des tableaux   |           |
| Liste des figures  |           |
| LISTE DES ABREVIATIONS   |           |
| INTRODUCTION   | 2         |
| <b>CHAPITRE 1: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>                           |           |
| <b>PARTIE 1 : LA PLANTE MEDICINALE ETUDIEE</b>                     | <b>4</b>  |
| <b>1-Historique</b>  | <b>5</b>  |
| <b>2-Présentation de la plante</b>                                 | <b>5</b>  |
| <b>3-Description de <i>Lawsonia Inermis</i></b>                    | <b>6</b>  |
| <b>3-1-Noms du Henné</b>   | <b>7</b>  |
| <b>3-2-Culture et récolte de henné</b>                             | <b>8</b>  |
| <b>3-3-Aspect botanique</b>  | <b>9</b>  |
| <b>4-Origine et répartition géographique</b>                       | <b>9</b>  |
| <b>4-1-Origine</b>   | <b>9</b>  |
| <b>4-2-Répartition géographique</b>                                | <b>10</b> |
| <b>5-L'utilisation de <i>Lawsonia Iermis</i></b>                   | <b>10</b> |
| <b>5-1-Domaine tinctorial</b>                                      | <b>10</b> |
| <b>5-2-Domaine pharmacologique</b>                                 | <b>11</b> |
| <b>5-3-Autres usages</b>   | <b>11</b> |
| <b>6-Composition chimique</b>                                      | <b>11</b> |
| <b>6-1-Les feuilles</b>  | <b>12</b> |
| <b>6-2-Les tiges</b>   | <b>12</b> |
| <b>6-3-Les fleurs</b>  | <b>12</b> |
| <b>6-4-Les fruits</b>  | <b>14</b> |
| <b>7-Effets secondaires</b>  | <b>14</b> |
| <b>8-Biosynthèse de Lawsonsone</b>                                 | <b>15</b> |
| <b><u>PARTIE 2</u> : PHYTOTHERAPIE ET METABOLISMES SECONDAIRES</b> | <b>16</b> |
| <b>1-Définition DES METABOLITES SECONDAIRES</b>                    | <b>16</b> |
| <b>2-Fonction des métabolites secondaires</b>                      | <b>17</b> |
| <b>3-Classification</b>  | <b>18</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3-1-Composés phénoliques</b>   | <b>18</b> |
| 3-1-1-Structure chimique  | 19        |
| 3-1-2-Classification des composés phénoliques                                 | 19        |
| 3-1-2-1-Polyphénols monomériques  | 20        |
| 3-1-2-1-1-Les acides phénoliques  | 20        |
| 3-1-2-1-2-Flavonoïdes   | 21        |
| 3-1-2-2-Polyphénols sous forme de polymères                                   | 22        |
| 3-1-2-2-1-Tannins   | 22        |
| 3-1-2-2-2-Coumarines  | 23        |
| 3-1-3-Biosynthèse Des Polyphénols   | 23        |
| <b>3-2-Composés terpéniques</b>   | <b>23</b> |
| 3-3-Stéroïdes, stérols  | 25        |
| 3-3-1-Les huiles essentielles   | 25        |
| <b>3-4-Composés azotés ou alcaloïdes</b>                                      | <b>26</b> |
| 3-4-1-Définitions   | 26        |
| 3-4-2-Fonctions et propriétés   | 26        |
| 3-4-3-Classification  | 26        |
| 3-4-4-Physicochimiques et pharmacologiques                                    | 27        |
| <b><u>PARTIE 3 : LES ACTIVITES BIOLOGIQUES DE <i>LAWSONIA INERMIS</i></u></b> | <b>28</b> |
| 1-Généralités   | 28        |
| 2-Stress oxydatif)  | 28        |
| 3-Définition d'un radical libre   | 28        |
| a. Défenses de l'organisme contre les radicaux libres                         | 30        |
| 4-Les antioxydants  | 31        |
| a. Les antioxydants primaires   | 31        |
| b. Les antioxydants secondaires   | 32        |
| 4-1-Classification des antioxydants   | 32        |
| 4-1-1-Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes                            | 32        |
| 4-1-2-Systèmes antioxydants non-enzymatiques                                  | 32        |
| 4-2-Mécanismes d'action des antioxydants                                      | 33        |
| 4-3-Différentes localisations cellulaires des antioxydants                    | 34        |
| 4-4-Origines des antioxydants   | 35        |
| 4-5-Méthode d'évaluation de l'activité antioxydante                           | 36        |
| 5- L'activité antimicrobienne   | 38        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5-1-Définition de l'activité antimicrobienne</b>                           | <b>38</b> |
| <b>5-2-Métabolites secondaires responsables de l'activité antimicrobienne</b> | <b>38</b> |
| <b>5-3-Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens</b>            | <b>39</b> |
| <b>5-3-1-Escherichia coli</b>   | <b>39</b> |
| <b>5-3-2-Staphylococcus aureus</b>  | <b>39</b> |
| <b>5-3-3-Pseudomonas aeruginosa</b>   | <b>39</b> |

## **CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1-Matériel végétal</b>   | <b>41</b> |
| <b>1-1-Broyage, tamisage et technique de séchage</b>                  | <b>41</b> |
| <b>1-2-Méthode d'extraction</b>                                       | <b>41</b> |
| <b>1-2-1-Extraction par l'éthanol</b>                                 | <b>41</b> |
| <b>2-Détermination des rendements d'extraction)</b>                   | <b>44</b> |
| <b>3- Activités biologiques de <i>Lawsonia Inermis</i></b>            | <b>44</b> |
| <b>3-1-Dosages des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux</b> | <b>44</b> |
| <b>3-1-1-Contenu total flavonoïque (TFC)</b>                          | <b>44</b> |
| <b>A- Principe</b>  | <b>44</b> |
| <b>B- Instruments utilisés</b>  | <b>44</b> |
| <b>C- Réactifs utilisés</b>   | <b>45</b> |
| <b>D- Préparation des solutions</b>                                   | <b>45</b> |
| <b>E- Préparation de l'extrait de plante</b>                          | <b>45</b> |
| <b>F- Procédure</b>   | <b>45</b> |
| <b>G- Préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine</b>           | <b>45</b> |
| <b>3-1-2-Contenu total phénolique (TPC)</b>                           | <b>46</b> |
| <b>A- Principe de la réaction</b>                                     | <b>46</b> |
| <b>B- Instruments utilisés</b>  | <b>46</b> |
| <b>C- Réactifs utilisés</b>   | <b>46</b> |
| <b>D- Mode opératoire</b>   | <b>46</b> |
| <b>E- Procédure</b>   | <b>46</b> |
| <b>3-2-Les activités antioxydantes</b>                                | <b>47</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3-2-1-Activité DPPH</b>  | <b>48</b> |
| <b>A- Principe de la réaction</b>   | <b>48</b> |
| <b>B- Instruments utilisés</b>  | <b>48</b> |
| <b>C- Réactifs utilisés</b>   | <b>48</b> |
| <b>D- Mode opératoire</b>   | <b>48</b> |
| <b>3-2-2-Activité ABTS</b>  | <b>48</b> |
| <b>A- Procédure</b>   | <b>49</b> |
| <b>3-3-Activité enzymatique</b>   | <b>49</b> |
| <b>A- Principe de la réaction</b>   | <b>49</b> |
| <b>B- Procédure</b>   | <b>49</b> |
| <b>3-4-L'activité antimicrobienne</b>   | <b>49</b> |
| <b>3-4-1-Préparation des milieux de culture et ensemencement des souches bactériennes</b> | <b>51</b> |
| <b>3-4-2-Préparation de l'inoculum</b>  | <b>52</b> |
| <b>CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>  |           |
| <b>1-Le rendement de l'extraction</b>   | <b>53</b> |
| <b>2-Les activités biologiques</b>  | <b>54</b> |
| <b>2-1-Activité anti-radicalaire au DPPH</b>  | <b>54</b> |
| <b>2-2-Activité du piégeage du cation radical ABTS</b>                                    | <b>56</b> |
| <b>2-3-Activité antimicrobienne</b>   | <b>57</b> |
| <b>2-4-Activité de la butyrylcholinestérase</b>   | <b>63</b> |
| <b>2-5-Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes</b>     | <b>64</b> |
| <b>Conclusion</b>   | <b>68</b> |



# Liste des tableaux

**Tableau 1** : Origine des métabolites secondaires.

**Tableau 2** : Principales classes des composés phénoliques.

**Tableau 3** : Différents exemples des radicaux libres.

**Tableau 4** : Quelques méthodes d'évaluation de l'activité antioxydantes in vitro.

**Tableau 5** : Principales caractéristiques des souches microbiennes testées.

**Tableau 6** : Rendement des extraits de *Lawsonia Inermis*.

**Tableau 7** : Les différentes concentrations utilisées des extraits de *Lawsonia Inermis*.

**Tableau 8** : Les calculs des zones d'inhibition des bactéries et champignon et leurs activités sur les extraits de *Lawsonia Inermis*.

**Tableau 9** : Le contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes des extraits.

**Tableau 10** : Valeur de CI50 test DPPH pour les extraits bruts de *Lawsonia Inermis*.

**Tableau 11** : Valeur de CI50 test ABTS pour les extraits bruts de *Lawsonia Inermis*.

**Tableau 12** : Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase.

## Liste des figures

- **Figure 1** : les différentes parties de *L.inermis*.
- **Figure 2**: Aspect general du henné.
- **Figure 3** : Partie aérienne avec fruit.
- **Figure 4** : Arbuste le *Lawsonia inermis*.
- **Figure 5** : Poudre et feuilles séchées de henné.
- **Figure 6** : Répartition géographique de la culture de henné.
- **Figure 7** : Jeunes feuilles de *Lawsonia inermis*
- **Figure 8** : Les fleurs de *Lawsonia inermis*.
- **Figure 9** : Schéma de la transformation de la fleur fécondée en fruit.
- **Figure 10** : Fruits de *L.inermis*.
- **Figure 11** : Constituent actifs des végétaux.
- **Figure 12** : Quelques composés phénoliques de base, acide salicylique, acide caféique.
- **Figure 13** : Structure de base de flavonoïde.
- **Figure 14** : Les différentes classes des flavonoïdes.
- **Figure 15** : Structure d'une molécule de coumarine.
- **Figure 16** : Structure chimique du noyau stérane des stéroïdes.
- **Figure 17** : Les systèmes de défense contre les radicaux libres.
- **Figure 18** : Réaction du DPPH avec un antioxydant.
- **Figure 19** : Site d'action des nutriments antioxydants (en rouge) et des enzymes antioxydantes (en noir).
- **Figure 20** : Protocole de l'extraction des molécules bioactifs.
- **Figure 21** : Filtration de l'extrait éthanolique.
- **Figure 22** : Séchage des extraits éthanoliques.
- **Figure 23** : Préparation d'une gamme de dilution d'extrait brute.
- **Figure 24** : Ecoulement et séchage de la gélose.
- **Figure 25**: Séchage des disques.
- **Figure 26** : Ensemencement des souches bactériennes choisies.
- **Figure 27**: Préparation de l'inoculum.
- **Figure 28** : Incubation des souches microbiennes testées.
- **Figure 29** : Plaque de dosage de l'activité anti-radicalaire (DPPH des extraits de *L.inermis*).
- **Figure 30** : Représentation d'IC50 de l'activité anti-radicalaire (DPPH).
- **Figure 31** : Plaque de dosage du radicale ABTS des extraits *L.inermis*.
- **Figure 32** : Représentation d'IC50 de l'activité ABTS.
- **Figure 33** : Observation de l'activité antimicrobienne.
- **Figure 34** : Zone d'inhibition sur staphylococcus aureus.
- **Figure 35** : Zone d'inhibition sur pseudomonas aeruginosa.
- **Figure 36** : Zone d'inhibition sur Escherichia coli.
- **Figure 37** : Zone d'inhibition des Fusarium oxysporium.
- **Figure 38** : Principe d'évaluation de l'activité antimicrobienne.

## LISTE DES ABREVIATIONS

**ABTS** : L'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

**DPPH** : 2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle.

**CI50** : Concentration d'inhibition à 50%.

**EQ** : Équivalent de la quercétine.

**FCR** : Folin-Ciocalteu

**EAG** : Équivalent de l'acide gallique

**MeOH** : Méthanol

**TFC** : Contenu total flavonoïde.

**RE** : rendement d'extraction en pourcentage.

**PBE** : poids des boites pleines après séchage (contient l'extrait brut) en gramme.

**PBV** : poids des boites vides en gramme.

**PP** : poids des plantes sèches en gramme.

**TPC** : Contenu total phénolique.

**BHA** : Butylhydroxytoluene.

**BHT**: hydroxytoluène butylé.

**BChE**: butyrylcholinestérase.



# **Introduction**

### INTRODUCTION

Depuis 150 ans, les plantes médicinales ont fourni à la pharmacie des médicaments très efficaces, cette découverte de nouveaux médicaments s'est effectuée en recherchant les principes actifs de plantes médicinales qui pour la plupart, était des plantes toxiques.

Ainsi, au cours des dernières décennies le corps médical a pris conscience de l'intérêt thérapeutique des plantes pour soigner efficacement un grand nombre d'affections d'où la plupart d'entre elles n'ont pas attiré l'attention des chercheurs et leurs potentialités thérapeutiques restants à découvrir (*Aquaron, 2005*).

En effet, les résultats des recherches conduit par des spécialistes (médecins, biologistes, pharmaciens, botanistes, agronomes, écologistes et économistes) concourent à démontrer les effets néfastes des médicaments à base de produits chimiques pour l'organisme de l'être humain , c'est pour cela que ces produits naturels sont très demandés dans le monde , donc il est temps de multiplier nos efforts pour faire évaluer ce domaine <<plante médicinale et culture biologique >>, par l'application des résultats de recherches scientifiques et de techniques appropriées de production et de dosage (*Messaoudi, 2005*).

Presque tous les produits utilisés par l'être humain pour soulager leurs maux ont trouvé leur origine dans le végétale. Sans doute aussi ancienne que la conscience humaine, la correspondance entre les plantes et les vertus des aliments naturels, à des fins thérapeutiques, est illustrée par cette citation d'Hippocrate (Vers 460,377 av J.C, « la nature est le médecin des malades » (*Aquaron, 2005*).

Parmi les produits du terroir algérien et qui n'est autre qu'un des plus anciens remèdes naturels, nous avons le cas de Henné (*Lawsonia Inermis*), henné de Zribet El Oued ou " El Hanna Zribiya ".

Les feuilles de henné font l'objet de commerce au niveau international. La demande mondiale de henné a commencé à augmenter véritablement entre 1960-1980 et depuis, elle ne cesse d'augmenter (*Aweke et al., 2005*).

Les principaux pays importateurs sont : L'Arabie saoudite (environ 3000 t/an), la France (250 t/an), la Grande Bretagne (100 t /ans) et les Etats-Unis (plusieurs centaines de tonnes /an) (*Aweke et al., 2005*).

Il faut préciser que le Niger entretient également un lieu d'exportation avec l'Algérie. De plus, l'*Inermis* prends de l'ampleur, économiquement.

C'est dans ce contexte que se déroule notre étude visant à identifier l'effet antioxydant, anti-microbien. La composition en polyphénols et en flavonoïdes du henné à l'état frais et sécher par deux méthodes à savoir : séchage à l'air libre et séchage au séchoir.

Le mémoire est divisé en trois chapitres :

- Le premier chapitre présente une étude phytochimique de la plante *Lawsonia Inermis*, sa composition chimique, en décrivant les différents métabolites secondaires à savoir : coumarine, terpenoïde, alcaloïde, stérol, et composés phénoliques, ...
- Le second chapitre est consacré à la partie matériels et méthodes : dosage du DPPH, dosage de l'ABTS, dosage de l'activité enzymatique Butyrylcholinestérase, dosage des polyphénols et des flavonoïdes, ainsi que l'évaluation de l'activité antimicrobienne.
- Les différents résultats obtenus occupent le troisième chapitre, et enfin on termine notre travail avec une discussion et une conclusion.



# **Chapitre 1**

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Historique

*Lawsonia Inermis* est une espèce native d'Afrique du Nord et du Sud Est Asiatique (Malekzadeh, 1968).

Il serait originaire d'une région allant du sud de l'Iran et de la Mésopotamie au Béloutchistan. De là, il aurait gagné, dès l'antiquité, le nord de l'Inde où ses usagers sont très anciennement attestés et vers l'ouest, la Palestine, la Syrie et l'Egypte suivant en cela la migration des peuples).

L'utilisation du henné est donc très ancienne, en même temps que le sens à lui donner demeure souvent obscure. Puis l'Islam l'a faite sien, au point de lui être, de nos jours, associée dans les représentations les plus courantes. Ainsi, la nuit du henné, l'un des temps forts des cérémonies de mariage dans les sociétés musulmanes, est-elle devenue emblématique de ce rituel.

Par contre, pour ce qui est de l'Afrique du Nord, il semble bien que l'emploi du henné soit effectivement lié à son islamisation. La plante y croît dans les régions présahariennes et Sahariennes, les seules qui soient propices à sa culture. Il a fait, et fait encore de nos jours, l'objet d'importantes transactions commerciales à partir des oasis productrices ainsi que depuis la Libye et l'Egypte (Touzain, 1998).

## 2. Présentation de la plante

Le mot henné qui désigne <devenir reine >, est une preuve que la plante a une valeur d'élégance chez les civilisations qui l'utilisent. Pendant des siècles, les feuilles de la plante de henné ont été connues comme étant des agents colorants, utilisée dans plusieurs civilisations.

Forme de tatouage varié et éphémère, le rituel du henné se présente comme un phénomène à la fois esthétique, médicinale et spirituel (Gallo et al., 2008). Depuis l'antiquité, les femmes s'y adonnent en Afrique du Nord, au moyen Orient et en Inde. Elles l'adoptent comme moyen de fascination et d'embellissement, celui-ci représente un symbole d'amour, de joie et de bonheur'' (Gouti, 2006).

Le henné est une plante de renommée, comme non seulement comme agent ayant des propriétés cosmétiques pour teindre les cheveux, la peau, les ongles etc. ... mais également comme un agent efficace ayant des propriétés médicinales intéressantes (Malekzadech, 1968 ; Sharma ; 1990, Gupta et al., 1992).

Connu communément sous le nom vernaculaire d'El Hanna, d'Alkana ou de réséda, le henné est en réalité la préparation obtenue à partir de la plante qui porte le nom scientifique de *Lawsonia Inermis* Linn (Ernst, 2000 ; Joy et al., 2001).



C'est un arbuste qui appartient à la famille des lythracées et qui porte plusieurs – noms scientifiques *Lawsonia alba*, *Lawsonia Spinosa*, *Ligusturum Egypticum* (*wichtl, 1999*).

Il doit son nom scientifique au botaniste Suédois Carl Linnaeus, qui lui donna le nom de son assistant, l'Écossais physicien, Isaac *Lawson*. *Inermis*, est un mot latin qui signifie non armer (*Kazandjjeva et al., 2007*).



**Figure 01 :** Les différentes parties de *L. Inermis*.

### 3. Description de *Lawsonia Inermis* :

- Ordre : Myrtales
- Famille : Lythracées
- Genre : Lawsonia
- Type : Arbuste épineux
- Type de végétation : vivace
- Origine : Arabie saoudite, Emirats arabes du Moyen et Proche-Orient
- Rusticité : -5 C sur de courte période
- Croissance : Moyennement rapide
- Lieu de culture : Serre chaude, véranda
- Exposition : Chaude et ensoleillée
- Hauteur : 2 à 6 m
- Port : étalé, ramifié, buissonnant
- Feuillage : persistant
- Floraison : Printemps, été / blanche, blanc rosé, rouge violacé
- Multiplication : semi, bouture, prélèvement des rejets, marcottage de tige

*Lawsonia Inermis* est un arbuste épineux tinctorial pourvu d'une écorce grisâtre et ridée.



**Figure 02 :** Aspect général du henné (Cartwright, 2015).



**Figure 03 :** partie aérienne avec fruit



**Figure 04 :** Arbuste de *Lawsonia Inermis*

### 3.1. Noms du Henné

- Français : Henne ; Alcanna ; troène d'Égypte.
- Anglais : Henna plant ; Alcanna
- Arabe : Héna le plurielle Hénane, les fleurs appelées Faghia et la plante el Héna et le fruit Tamer Héna.
- Turc : Kina
- Persan : Draht ; Ihana
- Grec : Cupros ; Kyros (MAHMOUDI, 1990).

### 3.2. Culture et récolte de henné

La culture du henné nécessite une certaine écologie. Le henné craint le froid, les terres lourdes et les eaux saumâtres. Il a besoin de beaucoup d'eau, de chaleur et de terres pouvant être labourées profondément et fumées abondamment (*Lemordant et al., 1983*).

Le henné est conduit en culture herbacée, La culture est installée pour une longue durée (une vingtaine d'années). Mais dès la 8ème ou la 10ème année, les rendements commencent à chuter. Ce qui fait que les agriculteurs ont tendance à renouveler la plantation tous les 8 ou 10 ans (*Chattaoui, 1974*).

La multiplication de henné est possible aussi bien par bouturage que par semis. C'est surtout cette dernière méthode qui est pratiquée même si les graines de henné ont la réputation de pourrir en terre.

Pour le bouturage, on dispose une branche de henné en cercle dans un trou large et peu profond puis on inonde d'eau pour former une sorte de boue.

Pour le semis, les graines sont préalablement trempées dans de l'eau chaude pendant une semaine environ puis sont soit semées sur des planches immergées dans une sorte de boue, soit tenues humides dans des couffins jusqu'à germination (*Lemordant et al., 1983*).

Le henné est récolté à tout moment quand il est parvenu à maturité et après floraison.

Il existe deux méthodes principales pour la récolte.

- ✓ La première consiste à l'effeuillage le long de la branche et faisant tomber les feuilles au sol et on les rassemble par la suite.
- ✓ La deuxième consiste à couper les tiges de henné au ras du sol à l'aide d'une courte faucille traditionnelle droite et dentelée.

Le henné donne en général 3 coupes par an. Une 4ème coupe est possible dans des conditions très favorables. La première coupe a lieu deux mois environ après le repiquage (Juillet-Août).

Le deuxième vers fin Septembre début Octobre et la dernière au cours du mois de Novembre.



**Figure 05 :** Poudre et feuilles séchées du henné

### 3.3. Aspect botanique

Les différentes recherches aboutissent à l'identification de trois plantes :

- Le henné naturel, *Lawsonia Inermis*
- Le henné neutre, *Cassia Obovata*
- Le henné noir, *Indigoferatinctoria*.

Il est toutefois admis de tous que le henné naturel est bien entendu le vrai henné.

## 4. Origine et répartition géographique

### 4.1. Origine

La zone géographique d'où est originaire le henné est la savane tropicale et les zones arides tropicales (*Malekzadeh, 1968*).

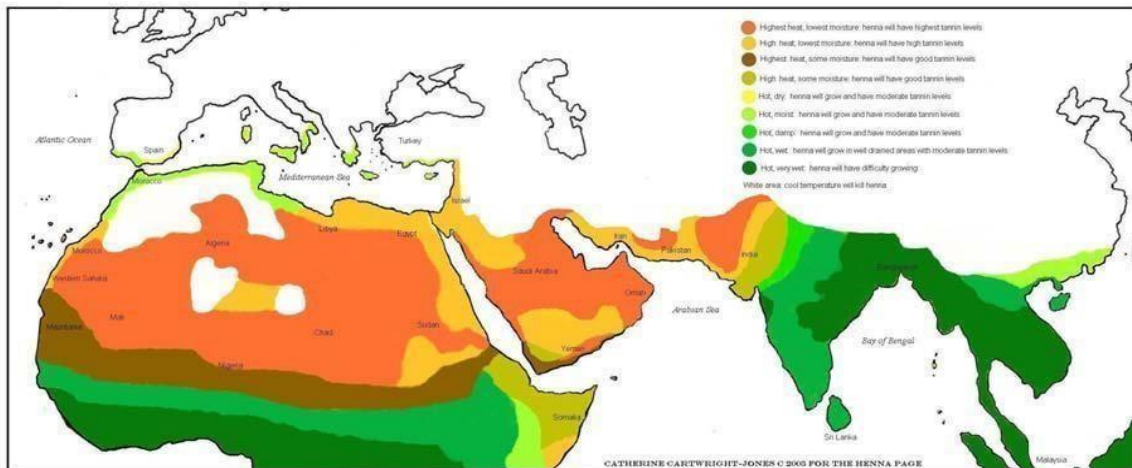
En général, cette plante est cultivée dans les latitudes entre 15° et 25° N et S de l'Afrique à la bande pacifique occidentale. Elle supporte bien le climat subtropical. Originnaire d'Inde occidentale, la plante *L. Inermis* s'est répandue aussi bien vers l'Ouest que vers l'Est au point qu'on la trouve maintenant cultivée dans la plupart des régions tropicales et subtropicales du monde.

En Asie, *L. Inermis* est cultivée dans tout le Proche Orient, Iran, Perse, l'Inde occidentale et en Chine. En Afrique, elle est cultivée dans le Maghreb, le Sénégal, le Mali, Soudan (*Lekouch et al., 2001*). La plante ne grandit pas lorsque les températures minimales sont inférieures à 1°C. La molécule responsable des propriétés colorantes de la plante, la Lawsonsone est produite à son haut niveau là où la température est entre 35°C et 45°C. Ses feuilles sont récoltées au cours de la saison printanière (*Paul, 2001*).

#### 4.2. Répartition géographique

On le trouve désormais partout dans les régions tropicales essentiellement dans les jardins familiaux et sa production commerciale se limite à quelques endroits en Inde, au Pakistan, en Iran, en Egypte, en Libye, au Niger et au Soudan.

En Afrique, il s'est souvent naturel Madagascar, il est devenu tellement commun le long de certaines rivières qu'il n'a pas besoin d'être cultivé (*Burkill, 1995*).



**Figure 06 :** Répartition géographique de la culture de henné (*Lemordant et al., 1983*).

### 5. L'utilisation de *Lawsonia inermis*

#### 5.1. Domaine tinctorial

Le mot henné désigne également le colorant tiré de *Lawsonia inermis* et dont l'usage est très ancien, à travers les différents rituels auxquels il participe. (*Steer et al., 2004*).

En effet, le tatouage au henné est utilisé depuis des siècles dans diverses cultures : juive, chrétienne, musulmane, indoue et bouddhiste à des fins rituelles, sociales ou esthétiques lors des événements tels que les mariages (*Kluger et al., 2008*).

Les propriétés colorantes du henné ont été utilisées dès les premiers temps de l'islam, il fut recommandé par le prophète Mohamed (paix et prière sur lui) qui l'utilisait pour colorer sa barbe (*Forestier, 1981 ; 2007*).

Il est actuellement en vogue dans les pays occidentaux pour des raisons multiples comme son utilisation facile, son caractère indolore, sa durée éphémère et le faible risque de transmission virale (*Lamchahab et al., 2011*).

De nos jours, il est utilisé partout dans le monde et il est même utilisé dans l'industrie cosmétique comme ingrédient dans beaucoup de colorants capillaires et de produits préconisés pour les cheveux fins et dévitalisés (*Sauriasari et al., 2007*) et certains produits de shampoings (*Ernst, 2000*).

## 5.2. Domaine pharmacologique

Dans la tradition, on dit que le henné est un signe de bonne chance, une tache de henné dans la main droite permet de se protéger contre le mauvais sort (*Steer et al., 2004*).

En plus de ses vertus tinctoriales (antipelliculaire, anti-séborrhéique, cicatrisante...), le henné est aussi reconnu pour beaucoup d'autres qualités pharmacologiques dont notamment celles testées au niveau des feuilles et énumérées.

Selon certaines citations du prophète Mohamed (paix et prière sur lui), des préparations à base de henné étaient recommandées pour divers maux (migraine, ulcère). A partir du 14<sup>ème</sup> siècle, l'imam Ibn Elkaim Eljawzia recommandait le henné sous forme de cataplasme pour cicatriser les blessures et pour calmer les douleurs. (*Al-jawziyya, 1998 ; rahmoun, 2009*).

Ainsi, plusieurs chercheurs ont démontré que l'extrait éthanolique de la plante entière de *L.inermis* présentait une activité antibactérienne (*Bakkalil et al ., 1997 ; Rahmoun, 2009*) et antifongique (*Ahmed et a ., 2000 ; rahmoun , 2009*).

Certains tests biologiques ont permis d'évaluer différentes activités biologiques telles que l'activité antihelminthique (l'ascaride lombricoïde), antiprotozoaire (contre la maladie de Sommeil), antispasmodique (*Bakkalil et al., 1997 ; Rahmoun, 2009*) et même des propriétés antituberculeuses (Sharma, 1990). D'autres tests révèlent que l'extrait de la plante *L.Inermis* sert par voie externe comme antiparasitaire, antiseptique, antimycotique, contre la Gale et comme traitement de l'abcès (*Yogisha et al ., 2002*). Par contre, l'utilisation interne de l'extrait de la plante sert contre la dysenterie amibienne, les ulcères gastro-intestinaux et comme anti-diarrhéique (*Wichtl, 1999*).

## 5.3. Autres usages :

En artisanat, *L. Inermis* était utilisée pour l'apprêt des peaux fines destinées à la maroquinerie de luxe et pour la teinture de la laine et de la soie, après addition de tartre et de sulfate de fer (*Badri etal, 1993 ; Rahmoun , 2009*).

D'autre applications apparaissent dans certaines régions de l'Afrique du Nord et du sud-ouest d'Asie où le henné est largement cultivé comme plante ornementale de haie et colorante (*Siddiqui et a., 2001*).

## 6. Composition chimique

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur la composition chimique de *L. inermis* ainsi que ses activités pharmacologiques. Les composés chimiques isolés sont des dérivés Naphtoquinoniques, des composés phénoliques, des Terpénoides, des stérols, des dérivés

aliphatiques, des Xanthones, une coumarine, des acides gras, des acides aminés (*Makhija et al., 2011*)

### 6.1. Les feuilles

La drogue, c'est-à-dire la partie employée, est représentée par les feuilles. Sur l'arbre, elles sont typiquement opposées-décussées, plus rarement en verticilles trimères et exceptionnellement alternes sur quelques rameaux (*Lemordant et al., 2017*).

Ce sont des feuilles simples, lancéolées ovales, aiguës, munies d'un pétiole très réduit.

Les tiges rameuses portent des feuilles coriaces et simples (*Bruneton , 1987*). Les feuilles sont odoriférantes, de saveurs non caractéristiques, un peu astringentes et amères. Le limbe est glabre, ovale, aigu avec une bordure lisse et évoluée (*Herraouya , 1862 ; Delaveau , 1985*).

Selon les conditions climatiques et l'âge, leur taille est variable. Les dimensions moyennes les plus souvent rencontrées sont les suivantes : 2 à 3 centimètres de longueur par 1 centimètre de largeur. Elles peuvent cependant mesurer de 0,5 à 6,5 centimètres de long sur 0,6 à 3 centimètres de large (*Lemordant et al., 1983*).



**Figure 07** : jeunes feuilles de *Lawsonia Inermis*.

### 6.2. Les tiges

Les tiges de la plante renferment différentes substances complexes. Il a été rapporté que l'écorce de la plante contient des dérivés naphthoquinoniques tels que : la 2-méthyl -8-hydroxy- 1,4-naphthoquinone,

En plus, deux triterpènes pentacycliques ont été isolés à partir de l'écorce et identifiés comme étant le 3,13,30-dihydroxylup-20(29)-ène (hennadiol) et le (20S)-3,13,30-dihydroxylupane (*Gupta, 1993*).

### 6.3. Les fleurs

D'après **ARBONNIER 2002** et **POUSSET 2004**, le henné présente de petites fleurs de couleurs blanches ou crème, roses ou rouges parfumées, groupées en cymes terminales, glabres, à 4 pétales et 4 sépales, 8 étamines très odorante (Figure 8).

La teinte variable de la corolle a permis de distinguer deux variétés :

- *L. Inermis* var. *alba* à fleurs blanches ou rosées ;
- *L. Inermis* var. *purpurea* à fleurs rouge vif.

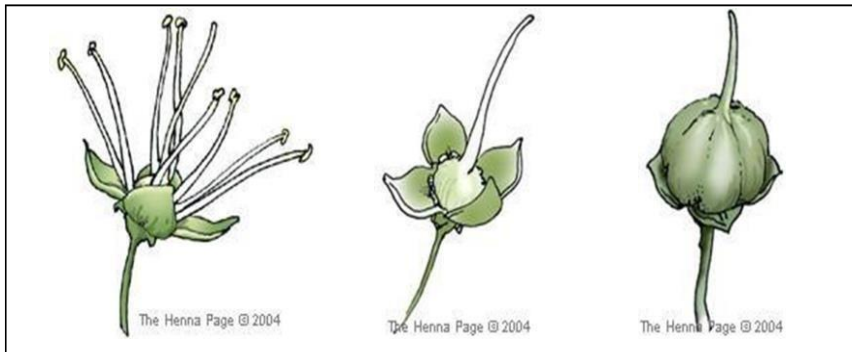


**Figure 8 :** Les fleurs de *Lawsonia Inermis*



#### 6.4. Les fruits

La fleur, une fois fécondée, va donner un fruit. Le fruit est petit, capsulaire, globuleux, rougeâtre renferment plusieurs graines anguleuses dans chaque loge (**Figure 9**).



**Figure 09 :** Schéma de la transformation de la fleur fécondée en fruit.



**Figure 10 :** Fruits de *L. Inermis* (Lebert, 2005)

#### 1. Effets secondaires

L'usage du henné pour prévenir ou embellir peut-être à l'origine, dans certains cas, de l'apparition de certaines pathologies telles que l'anémie hémolytique due à une déficience de la glucose -6-phosphate déshydrogénase, ainsi que de nécrose tubulaire rénale chez les animaux (*kok et al., 2004*). Cette anémie conduit dans certaines situations à une hyperbilirubinémie néonatale inexplicée (*El-Shaer et al., 2007 ;Rahmoun , 2009*).

Par ailleurs, le henné ingéré, contient des composés cytotoxiques (*Uygur et al., 2005*), mais il n'est pas réputé toxique pour les adultes en bonne santé, en usage externe et sur une peau saine, cependant, il peut se montrer écotoxique (toxique pour le sang) chez le jeune

enfant (*Kok et al., 2004*). Ainsi, la projection d'une solution de henné au niveau des yeux peut provoquer une irritation de ces derniers, due à la présence de tanins astringents (*Duke, 1985*).

## **2. Biosynthèse de Lawsonsone**

La présence de la Lawsonsone a été mise en évidence dans plusieurs plantes telles que *Lawsonia Inermis*, *Ammannia baccifera* (*Khare, 2007*), *Jugular regia* (*Grotzinger et al., 1974*), au niveau de la plante *L. Inermis* la Lawsonsone s'accumule dans la partie aérienne.

Les différentes études quant à l'extraction et la mise en évidence de la Lawsonsone ont permis de proposer un modèle de sa biosynthèse. Ce modèle a pu être généralisé pour la biosynthèse des systèmes à noyaux naphthoquinonique comme celui de la vitamine K (*Grotzinger et al., 1972*).

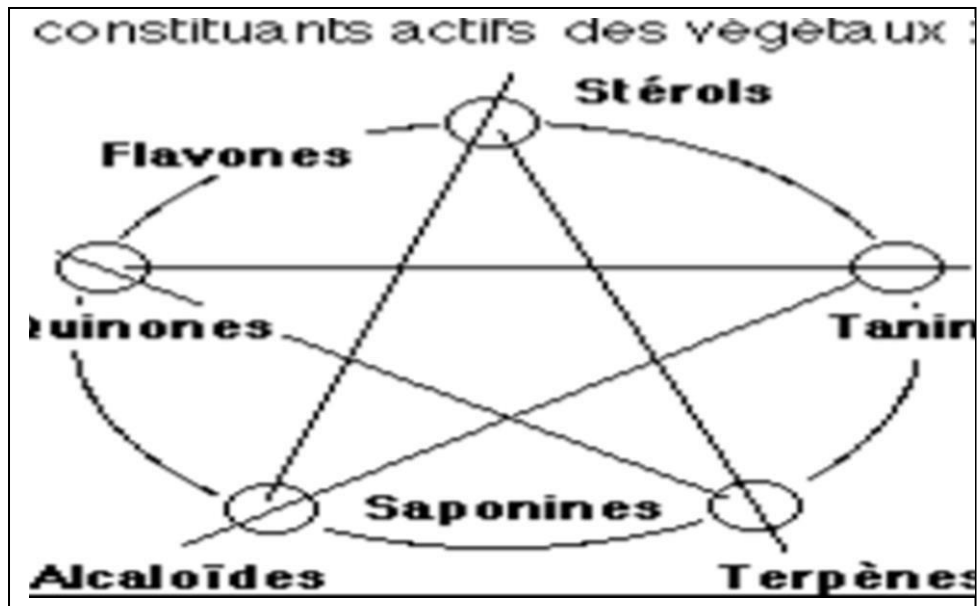
## 1. Définition DES METABOLITES SECONDAIRES

Les métabolites secondaires sont des produits à structure chimique souvent complexe, on recense plusieurs milliers de métabolites (au moins 30000 structures caractérisées) et sont classés selon leur appartenance chimique (*Judd et al., 2002*).

Donc les métabolites secondaires sont des molécules qui ne participent pas directement au développement des plantes mais plutôt intervenaient dans des relations avec les stress biotique et abiotique ou améliorent l'efficacité de la reproduction (*Leurent , 2012*). On trouve des métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue : (*Bruneton, 1999 ; Zenk et al., 2007*).

- Les composés phénoliques qui interviennent dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, on citera les polyphénols, les lignines, les stilbènes, les flavonoïdes, les phényl propanoïdes, les anthocyanes et les tannins.
- Les alcaloïdes, renferme un atome d'azote dans la structure. Parmi ces derniers, certains relèguent de l'acide cyanhydrique quand les plantes sont abîmées. Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On citera la nicotine, l'atropine, la codéine, la lupinine.
- Les mucilages : Ce sont des polymères complexes de fructose, d'acide gluconique et d'acide manuronique. Les mucilages sont des mélanges colloïdaux qui gonflent avec l'eau (agar-agar).

Les métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grandes familles, les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (*Abderrazak et al., 2007*).



**Figure 11 :** Constituants actifs des végétaux (Abderrazak et al., 2007)

## 2. Fonction des métabolites secondaires

Ils ont des fonctions très différentes, exemples :

- Protection de l'attaque des pathogènes ou des herbivores.
- Attraction des pollinisateurs.
- Ils participent à des réponses allélopathiques (compétition entre les plantes pour la germination et la croissance).
- Ils sont des molécules qui sont aussi très utiles pour l'homme, comme colorants, arômes, antibiotiques, herbicides, drogues etc... (Wink, 2010)

**Tableaux 01** : origine des métabolites secondaires.

| Molécules     | Origine  |
|---------------|--|
| Terpènes      | L'IPP (isopentenylidiphosphate) une molécule à 5 C |
| Alcaloïdes    | Acides aminés                                      |
| Acides aminés | Voie de l'acide Shikimique et acétate/malonate     |

### 3. Classification

D'après leur biosynthèse, les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois classes : Polyphénols ; terpénoïdes ; stéroïdes et alcaloïdes (*HENNEBELLE et al., 2004*).

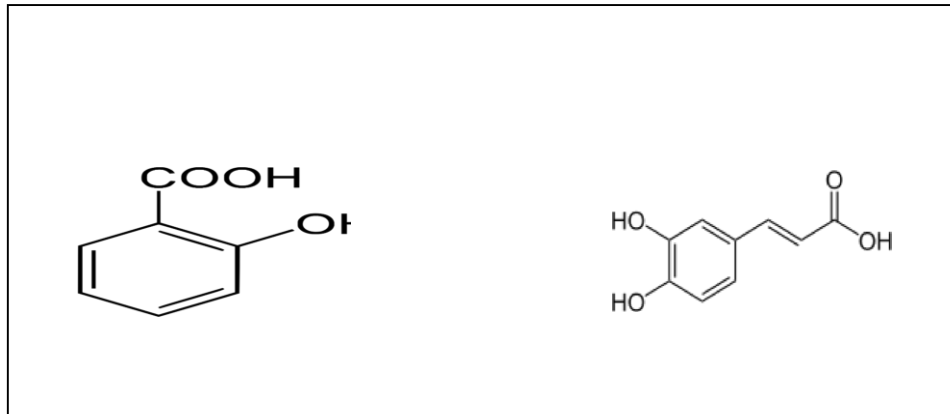
#### 3.1. Composés phénoliques

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc. (*Bruneton, 1999 ;Lugasi et al., 2003*). La grande majorité de composés phénoliques dérivent de l'acide cinnamique formé par la voie du Shikimate (*GORHAM, 1977*).

Sont solubles dans la solution de carbonate de sodium. Chimiquement, ils sont réactifs et donnent souvent lieu à des liaisons hydrogènes, ou chélater des métaux pour les O-dihydroxyphénols (catéchol) ; Enfin, ils sont sensibles à l'oxydation (*GORHAM, 1977*).

### 3.1.1. Structure chimique

Les polyphénols se caractérisent par la présence au moins d'un cycle aromatique à 6 carbones dans leur structure, lui-même porteur d'un nombre variable de fonction hydroxyles OH (Hennebelle *et al.*, 2004). La structure et le nombre de noyaux aromatiques sont la base de la classification des composés phénoliques (Figure 12) (Bruneton, 2009).



(a) : acide salicylique

(b) : Acide caféique

**Figure 12 :** Quelques composés phénoliques de base, acide salicylique (a), acide caféique (b) (Hannebelle *et al.*, 2004).

### 3.1.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (**Tableau 02**), qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C6 à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modifications de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation ...etc.), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides et protéines) (Macheix *et al.*, 2005).

**Tableau 02.** Principales classes des composés phénoliques (*Manchando et al., 2006*).

| Squelette Carbone             | Classe                             | Exemple                          | Origine                           |
|-------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>C6</b>                     | Phénols simples                    | Catéchol                         | Nombreuses espèces                |
| <b>C6-C1</b>                  | Acide hydroxy benzoïques           | P-hydroxy benzoïque              | Epices, frais                     |
| <b>C6-C3</b>                  | Acide hydroxycinnamiques coumarine | Acide caféique scopolétin        | Pomme de terre, pomme, citrus     |
| <b>C6-C4</b>                  | Naphtoquinones                     | Juglone                          | Noix                              |
| <b>C6-C2-C6</b>               | Stilbénes                          | Resvérato                        | Vigne                             |
| <b>C6-C3-C6</b>               | Flavonoïdes Iso flavonoïdes        | Quercétine, cyanidine, daidzéine | Fruit, légumes, fleurs soja, pois |
| <b>(C6-C3)<sub>2</sub></b>    | Lignane                            | Pinorésinol                      | Pin                               |
| <b>(C6-C3-C6)<sub>n</sub></b> | Tanins condensés                   |                                  | Raisin, kaki                      |

### 3.1.2.1. Polyphénols monomériques

#### 3.1.2.1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques, ou acides phénols ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols, Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature (*HASLAM, 1994*).

Ils se divisent en deux classes :

- ✓ Les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxycinnamiques).
- ✓ Les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxybenzoïques) (*PANDEY et al., 2009*).

### A -Acides phénols dérivés d'ACIDES BENZOÏQUES

Sont des hydroxy benzoïques et ont une structure générale de base de type (C6-C1) (figure 02), ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (*HARRAR, 2012*). Les plus répandus sont : l'acide salicylique et l'acide gallique (*BRUNETON, 1999*).

### B-acide phénols dérivés d'ACIDES CINNAMIQUES

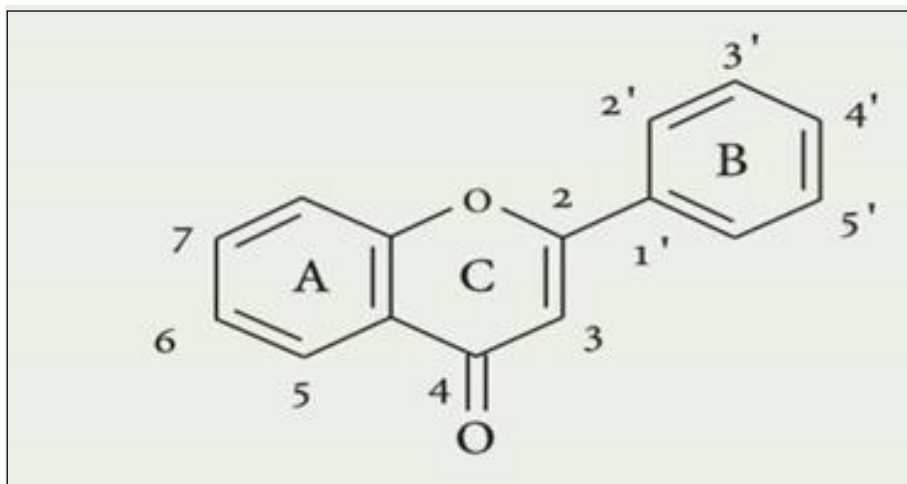
Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (figure 03) sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide P-coumarique et l'acide synaptique (*HASLAM, 1994*).

#### 3.1.2.1.2. Flavonoïdes

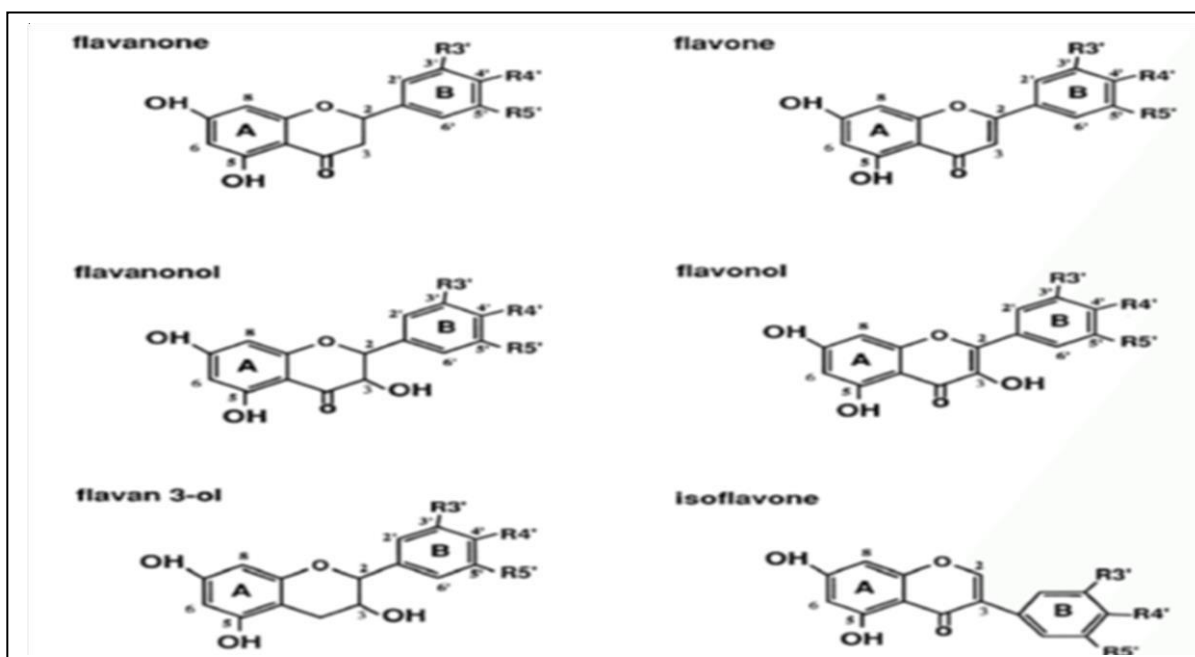
- Le terme flavonoïde signifie jaune en latin Flavius (*Ribereau, 1968*).
- Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux presque toujours hydrosolubles larges (*Bruneton, 2009*).
- Ils présentent plus de 4000 structures décrites (responsables des colorations jaunes, orange, et rouges de différentes organes végétaux (*Ghedira, 2005 ; Marouf et al., 2007*). Les flavonoïdes sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbones (C6-C3-C6) (**Figure 13**) (*Collin et al., 2011*).
- Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (*Seyoum et al., 2006*), ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. À l'état naturel les flavonoïdes se trouvent le plus souvent sous forme d'hétérosides (*Ghestem et al., 2001 ; Bruneton, 1999*).
- Les flavonoïdes sont dépourvus de toxicité et ont des propriétés tinctoriales et vitaminiques P (diminution de la perméabilité capillaire) : les plantes qui en contiennent sont fréquemment des diurétiques ou des antispasmodiques, certaines ont des propriétés oestrogéniques.
- Les flavonoïdes se répartissent en fonction de la structure de molécule. En effet, plus de 6400 Structures ont été identifiées (*Harborne et al., 2000*).

Ce groupe comprend plusieurs Classes subdivisées selon le degré d'oxydation du noyau puranique central (*Bruneton, 1999 ; Marfak, 2003 ; Skerget et al., 2005*).





**Figure 13 :** Structure de base de flavonoïde (Collin *et al.*, 2011).



**Figure 14 :** Les différentes classes des flavonoïdes (Manchando *et al.*, 2006).

### 3.1.2.2 Polyphénols sous forme de polymères

#### 3.1.2.2.1 Tannins

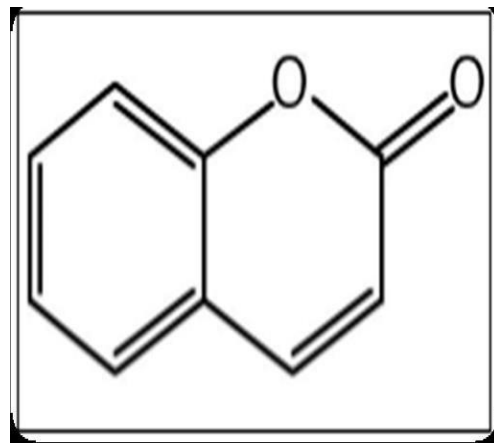
Les tanins sont des composés phénoliques complexes, hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Da (KAMRA *et al.*, 2006). Ces composés naturellement produits par les plantes et se caractérisent par leur facilité à se combiner aux protéines (MAKKAR, 2003 ; MANGAN, 1988 ; MCSWEENEY *et al.*, 2001). Grâce à la présence de plusieurs groupements hydroxyles phénoliques (KHENAKA, 2011), Aussi à



alcaloïdes, pour former avec eux des complexes stables (HASLAM, 1998). Ils sont très répandus dans le règne végétal, mais ils sont particulièrement abondants dans certaines familles comme les conifères, les Fagacée, les Rosacée (GHESTERM *et al.*, 2001). Ils peuvent exister dans divers organes : l'écorce, les feuilles, les fruits, les racines et les grains (KHANBABAE *et al.*, 2001). En général, ils sont subdivisés en deux groupes distincts en fonction du type de l'acide phénolique et du type de liaisons qui déterminent la taille et la réactivité chimique de la molécule (RIRA, 2006).

#### 3.1.2.2.2 Coumarines

Les coumarines sont des molécules largement répandues dans tout le règne végétal, sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, considérées comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-7-cinnamiques (BENAYACHE, 2005). Elles existent sous forme libre solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés ou encore liées à des sucres (hétérosides) sont plus ou moins solubles dans l'eau (BRUNETON, 1999).



**Figure 15** : Structure d'une molécule de coumarine.

La coumarine et ses dérivés ont des actions phyto biologiques (HOSTETTMANN, 1992), bactériostatiques et anti fongiques (RUFINI *et al.*, 1977). Ils ont un effet anti- œdémateux (HOULT *et al.*, 1996).

#### 3.1.3. Biosynthèse Des Polyphénols

Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques :

- ✓ Celle de l'acide Shikimique (Shikimate).
- ✓ Celle issue de l'acétate-malonate (MOHAMMEDI, 2013).

#### 3.2. Composés terpéniques :

Appelés aussi terpènes, constituent un vaste groupe de métabolites secondaires, sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaîne ouverte (HELLAL, 2011). En effet les plantes synthétisent plus de vingt-deux milles dérivés isopréniques qui possèdent des

structures, des propriétés physiques et chimiques et activités biologiques très diverses (CONOLLY, 1992). Ils répondent dans la plupart de cas à la formule générale (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) (SEENIVASAN, 2006) c'est-à-dire leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'unité isoprénique à 5 atomes de carbone (HERNANDEZ, 2005).

Les précurseurs de tous les isoprénoïdes, le pyrophosphate d'isopentényle (IPP) et son isomère allylique pyrophosphate diméthylallyl (DMAPP), avec près de 40 milles structures moléculaires (YU *et al.*, 2009). Ils constituent une importante classe de produits secondaires, hydrophobes quelquefois volatils et unis par une origine commune (SEAMAN, 1982).

Ces composés peuvent agir comme antioxydants directs via des mécanismes de piégeage des radicaux libres et/ou comme antioxydants indirects en améliorant le statut antioxydant (enzymatique et non enzymatique). Les terpènes, l'un des composés structuraux les plus étendus et les plus variés présents dans la nature, présentent un large éventail d'activités biologiques et pharmacologiques. Ici, nous mettons en évidence leurs propriétés antioxydantes. En raison de leur comportement antioxydant, il a été démontré que les terpènes offrent une protection pertinente dans des conditions de stress oxydatif dans différentes maladies, notamment les maladies hépatiques, rénales, neurodégénératives et cardiovasculaires, le cancer, le diabète ainsi que dans les processus de vieillissement. (Gonzalez *et al.*, 2012).

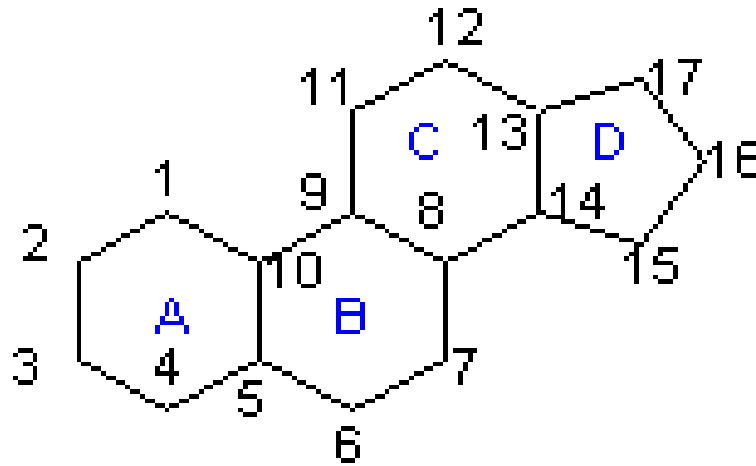
Certaines études ont montré aussi la relation entre la lumière et la synthèse des terpènes. En effet, on observe une régulation de la synthèse des monoterpène et caroténoïdes par le phytochrome, récepteur de la lumière rouge.

Par l'intermédiaire des caroténoïdes les terpènes vont aussi être lié à l'absorption de la lumière bleue.

### 3.3 Stéroïdes, stérols

- Substance chimique du groupe des alcools.
- Les stérols ont une structure complexe, faite d'une longue chaîne d'atomes repliée sur elle-même pour former plusieurs cycles. Dans l'organisme et dans l'alimentation, il existe de nombreux stérols et de nombreuses substances dérivées, appelées stéroïdes : cholestérol, vitamine D, acides biliaires, stéroïdes hormonaux (hormones de la glande surrénale, comme les corticostéroïdes, de l'ovaire et du testicule).
- Les stérols jouent un rôle important dans la qualité des graisses et des huiles.

- Ils sont appelés les phytostérols par contre leurs analogues saturés sont appelés les phytostérols, car ils possèdent généralement une double liaison ou plus (*Tanya, 1997 ; Robertetal, 2002*).



**Figure 16 :** Structure chimique du noyau stérane des stéroïdes.

Parmi les stérols ou phytostérols les plus fréquemment rencontrés chez les végétaux on cite : le stigmasterol et le  $\beta$ -sitostérol. Ils représentent 80% des stérols bio synthétisés à la surface du globe terrestre. Les stéroïdes et les tris terpènes peuvent être comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2méthylbutadiène. Chaque groupe de terpènes est issu de la condensation à queue d'un nombre variable d'unités isoprènes.

### 3.3.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des liquides aromatiques et volatils obtenus à partir de matières végétales par distillation à la vapeur et nommés d'après la plante dont elles sont issues. Les huiles essentielles peuvent être définies soit comme des produits ou des mélanges de substances parfumées, soit comme des mélanges de substances parfumées et inodores. Ces substances odorantes sont des composés chimiquement purs qui sont volatils dans des conditions normales. Les huiles essentielles varient considérablement, parfois en raison de causes génétiques, mais aussi en raison du climat, des précipitations ou de l'origine géographique. Ils sont composés principalement d'acides lipophiles. (*Lius-Rios, 2016*).

Le henné (*Lawsonia Inermis*) contient le Lawsone (2-hydroxy-1,4- Naphthoquinone), comme le principal ingrédient bioactif, ce qui est présent dans des feuilles sèches dans une concentration de (1.0-1.4) %. Le composé a été extrait à partir des feuilles et la préparation de divers dérivés de Lawsone a été rapportée (*Didry et al., 1968*).

La résolution de la chlorophylle, Lawsonie, 1,3dihydroxy naphthalène, 1.4-naphthoquinone et du 1,2-dihydroxy-4- Glucosyloxynaphthalene a été isolée dans l'extrait insoluble dans l'eau des feuilles de henné. Un Isoplumpagin dérivé de nouveau naphthoquinone a été isolé dans l'écorce de tige du henné (*Gupta et al., 1993*).

### 3.4 Composés azotés ou alcaloïdes

#### 3.4.1. Définitions

Les alcaloïdes sont des composés d'origine naturelle azotés basiques à forte activités biologiques, Typiquement comme les amines primaires, secondaires, ou tertiaires et cela confère la basicité à l'alcaloïde, en facilitant leur isolement et purification comme sels solubles dans l'eau formés en présence des acides minéraux (*HESS, 2002*). Toxiques pour la plupart, qui sont extrait en majorité de plante à fleurs (8,7% de Phanérogames, Dicotylédones).

Leur teneur est très variable, généralement comprise entre 0.1% et 2 à 3 % du poids sec de la drogue (*ROUX et al., 2007*).

Les alcaloïdes existent rarement à l'état libre dans la plante, mais le plus souvent ils sont combinés à des acides organiques ou à des tanins (*ZIEGLER et al., 2008*).

#### 3.4.2. Fonctions et propriétés

Les alcaloïdes sont des molécules très intéressantes au point de vue biologique car certaines sont le principe actif de plusieurs extraits de plantes anciennement utilisés comme médicaments, comme poisons ou encore comme psychotropes (*HESS, 2002*). Insolubles ou fort peu solubles dans l'eau ; ils sont solubles dans l'alcool plus à chaud qu'à froid, l'éther, les acides et dans l'ammoniaque (*COWAN, 1999*).

#### 3.4.3. Classification

##### A. Selon l'origine biosynthétique

On distingue trois types d'alcaloïdes :

- **Alcaloïdes vrais** : d'après certains auteurs, ils sont issus seul règne végétal. Ils existent à l'état de sels et l'on peut ajouter qu'ils sont bio synthétiquement formés à partir d'un acide aminé (*BRUNETON, 1999*).
- **Pseudo-alcaloïdes** : ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés (*BRUNETON, 1999*).
- **Proto-alcaloïdes** : ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique ; ils ont une réaction basique et sont élaborés in vivo à partir d'acides aminés (*BRUNETON, 1999*).

## B. Selon leur composition chimique et structure moléculaire

Les alcaloïdes peuvent être divisés en plusieurs groupes.

- **Phénylalanines** : comme capsaïcine chez piment, colchicine chez colchique.

Alcaloïdes iso quinoléïques : comme : morphine, éthylmorphine, codéine et papavérine continues dans l'opium du pavot ; et des alcaloïdes indoliques : ergométrine, ergotamine et ergo toxine de l'ergot des céréales (*GONZALEZ et al., 1984*).

- **Alcaloïdes quinoléïques** : se trouvent dans les écorces de Cinchona (*DONATIEN, 2008*).
- **Alcaloïdes pyridiques et pipéridiques** : par exemple : ricinine chez ricin.
- **Alcaloïdes dérivés du tropane** : comme scopolamine et atropine chez la belladone.
- **Alcaloïdes stéroïdes** : racine de véatrate, douce-amère ou aconite (aconitine) par exemple (*GONZALEZ et al., 1984*).

### 3.4.4. Physicochimiques et pharmacologiques

Si dans les plantes, les alcaloïdes en tant que composés du métabolisme secondaire jouent un rôle écologique de défense contre des herbivores, chez l'homme ils trouvent cependant plusieurs applications pharmaceutiques (*MCCALLEY, 2002 ; STÖCKIGT et al., 2002*).

- Les alcaloïdes présentent fréquemment de propriétés pharmacologiques marquées et ont de nombreuses utilisations en thérapeutique, notamment au niveau de système nerveux central, du système nerveux autonome et du système cardiovasculaire (*GAZENDEL et al., 2013*).
- On notera aussi l'existence d'antitumoraux, d'antiparasitaires, de curarisants, les alcaloïdes sont utilisés comme anticancer, sédatifs et pour leur effet sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson) (*ISERIN et al., 2007*).

Ces nombreuses activités conduisent à une utilisation importante des drogues à alcaloïdes, soit sous forme de préparations galéniques, soit le plus souvent, pour l'extraction des alcaloïdes qu'elles renferment, ces alcaloïdes étant utilisés eux-mêmes ou servant de matière première d'hémisynthèse (*GAZENDEL et al., 2013*).

### 1. Généralités

Parmi les activités biologiques des plantes médicinales, ces dernières années l'attention s'est portée sur l'activité antioxydante en raison du rôle qu'elle joue dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies du cœur, le cancer, le diabète, l'hypertension, et la maladie d'Alzheimer en combattant le stress oxydant (*Meddour, 2001*).

### 2. Stress oxydatif

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance oxydants /antioxydants est en équilibre. Cependant dans certains cas, en raison d'une surproduction radicalaire ou d'une diminution des capacités antioxydantes. Un déséquilibre entre la génération d'espèces oxygénées activées (EOA) et les défenses antioxydantes de l'organisme appelé stress oxydatif (*Bendif, 2017*).

Les espèces activées de l'oxygène de par leur structure électronique instable peuvent attaquer les composants cellulaires. Les molécules biologiques : protéines, les lipides, glucides et l'ADN sont sujettes à l'attaque radicalaire, provoquant ainsi un dysfonctionnement dans les activités vitales des cellules à l'origine du développement de diverses pathologies (*Mohammed, 2013*).

### 3. Définition d'un radical libre

Les radicaux libres sont des entités chimiques (Espèces, atomes, molécules ou des fragments moléculaires) possédant un électron (ou plus) non apparié « Célibataire » sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Cet électron naît suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant pour se réapparier, qui a tendance à attirer les électrons d'autres atomes et molécules pour gagner en stabilité, déstabilisant ainsi d'autres molécules (*Bendif, 2017*).

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux libres primaires, qui dérivent directement de l'oxygène. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires (radical peroxy  $\text{ROO}\bullet$ , radical alkoxy  $\text{RO}\bullet$ ), se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule (*Novelli, 1997*).

L'ensemble des radicaux libres primaires est souvent appelé "espèces réactives de l'oxygène" (ROS). Cette appellation n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde  $\text{O}_2\bullet^-$ , radical hydroxyl  $\text{OH}\bullet$ , monoxyde d'azote  $\text{NO}\bullet$ , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est



importante : l'oxygène singulet  $1O_2$ , peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , peroxyde d'azote  $ONOO^-$  (Favier, 2003).

**Tableau 03** : Différents exemples des radicaux libres (MOHAMMEDI, 2012).

| Nomenclature         | Structure     | Principales réactions  |
|----------------------|---------------|--|
| Superoxyde           | $\bullet O=O$ | Catalyseur de la réaction de Haber-Weib par<br>Recyclage de $Fe^{2+}$ et $Cu^+$ ;<br>formation du<br>Peroxyde d'hydrogène et<br>peroxyde d'azote |
| Peroxyde d'hydrogène | $HO=OH$       | Formation du radical<br>hydroxyle ; inactivation<br>d'enzymes ; oxydation de<br>biomolécules   |
| Radical hydroxyle    | $\bullet OH$  | Abstraction de d'hydrogène,<br>production de radicaux<br>libres et peroxydes<br>lipidiques, oxydation des<br>thiols                              |
| Ozone                | $-O=O+=O$     | Oxydation de biomolécules,<br>spécialement cellescontenant<br>des doubles liaisons,<br>formations des ozonides et<br>des aldéhydes cytotoxiques  |
| Oxygène singulet     | $\bullet O=O$ | Réaction avec les doubles<br>liaisons, formation de<br>peroxydes, décomposition<br>des aminoacides et<br>nucléotides                             |
| Oxide nitrique       | $\bullet N=O$ | Formation de peroxyde d'azote,<br>réaction avec autres<br>Radicaux   |

|                |              |   |
|----------------|--------------|---|
| Peroxynitrite  | $O=N=O=O$    | Formation du radical hydroxyle, oxydation des groupements thiols et aromatiques, conversion de la xanthin déshydrogénase en xanthine<br>Oxydase, oxydation des biomolécules |
| Hypochlorite   | $ClO^-$      | Oxydation<br>Des groupements amine et sulfure, formation de chlore  |
| Radical        | $R\cdot$     | Abstraction d'hydrogène, formation des radicaux peroxy et autres radicaux, décomposition des<br>Lipides et autres biomolécules  |
| Radical peroxy | $R=O=O\cdot$ | Abstraction d'hydrogène, formation des<br>Radicaux, décomposition des lipides et autres<br>Biomolécules   |
| Hydroperoxyde  | $R=O=OH$     | Oxydation des biomolécules, destruction des membranes biologiques   |

#### a. Défenses de l'organisme contre les radicaux libres

Pour protéger ses tissus contre les effets nocifs des radicaux libres, l'organisme possède des mécanismes de riposte anti-radicalaire polymorphe, à la fois préventive et curative (HALIWELL, 1994). Elle dispose de différents systèmes antioxydants naturels et synthétiques. Un antioxydant peut être défini comme toute substance qui est capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder

ou empêcher l'oxydation de ces substrats (*MATES et al., 1999 ; COMHAIR et al., 2002 ; DROGE, 2002*).

#### 4. Les antioxydants

Sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques (*Mohammedi, 2013*).

Systèmes enzymatiques sont des systèmes de défense très efficaces. Selon (*Lehucher, 2001*) cette ligne de défense est constituée de Superoxyde dismutase (Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde), Catalase (Métabolise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Glutathion peroxydase (Action réductrice sur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type ROOH en ROH).

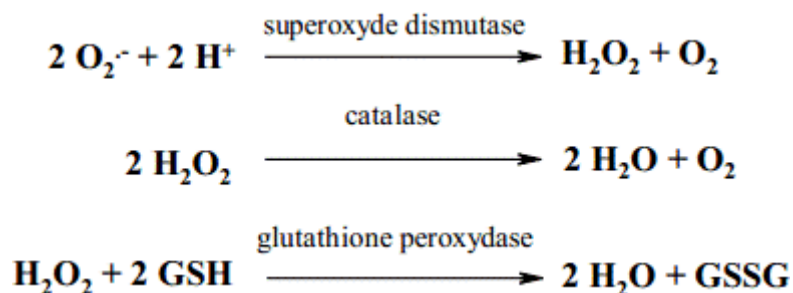
Systèmes non enzymatiques, comme les vitamines E ( $\alpha$ -tocophérol) et vitamines C (Acide ascorbique) et les polyphénols issus des végétaux (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines, etc).

La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation (*Bendif, 2017*).

##### A. Les antioxydants primaires

La cellule est pourvue d'enzymes antioxydantes qui sont des systèmes de défense très efficaces. Cette ligne de défense est constituée de superoxyde dismutase (SOD), de catalase et de peroxydase (glutathion et ascorbate) (*Favier, 2006*).

Ces enzymes antioxydantes permettent l'élimination des radicaux libres primaires, selon les réactions suivantes :

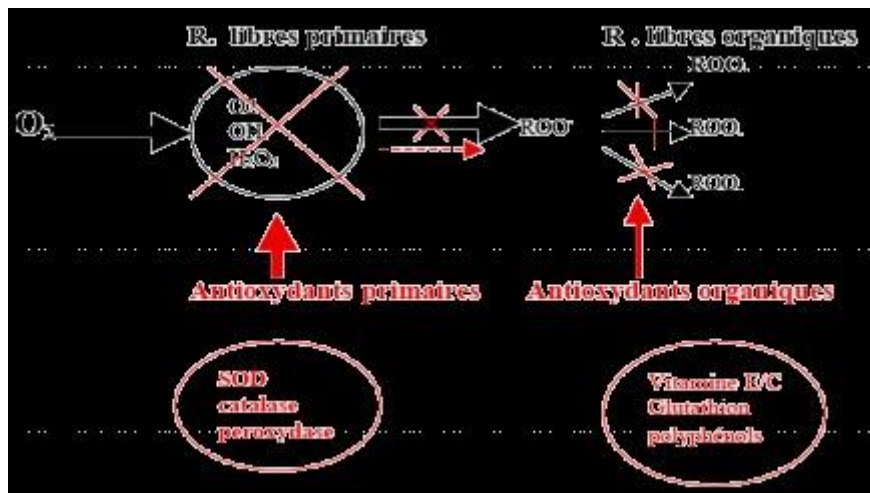


De ce fait elles préviennent la formation de radicaux libres organiques à partir des lipides membranaires notamment et contribuent donc à la protection des membranes de la peroxydation lipidique (*Dacosta, 2003*).

## B. Les antioxydants secondaires

Ce sont des molécules exogènes. Contrairement aux enzymes antioxydantes, une molécule d'antioxydant piège un seul radical libre. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, cette molécule d'antioxydant doit donc être régénérée par d'autres systèmes (Figure17) (Dacosta, 2003).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposés. Elles incluent : la vitamine E, l'acide ascorbique, le  $\beta$ -carotène, les flavonoïdes, les composés phénoliques, etc. (Kohen et al., 2002).



**Figure 17** : les systèmes de défense contre les radicaux libres (Kohen et al., 2002).

### 4.1. Classification des antioxydants

#### 4.1.1. Systèmes antioxydants enzymatiques endogènes

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont la superoxyde dismutase, la catalase et le glutathion peroxydase (Mates et al., 1999 ; Sharma et al., 2012).

#### 4.1.2. Systèmes antioxydants non-enzymatiques

- **Systèmes antioxydants endogènes** : Les systèmes antioxydants non-enzymatiques endogènes incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, largement présent sous forme réduite, qui est capable de réagir in vitro, avec les radicaux HO•, RO<sub>2</sub>•, RO•, IO<sub>2</sub>, ONOO (Rezaire, 2012). Les deux formes, oxydée et réduite, de l'acide lipoiqne, autre composé appartenant aux thiols, présentent des propriétés antioxydantes in vitro en piégeant les HO•, RO<sub>2</sub>•, l'HOCl et l'IO<sub>2</sub> (Rezaire, 2012).
- **Systèmes antioxydants exogènes** : Les antioxydants chimiques exogènes, comprennent majoritairement les vitamines C et E, les caroténoïdes et des composés phénoliques (McCall et al., 1999).

### a. Balance Oxydants /Antioxydants et stress oxydant

Les ROS ont des rôles physiologiques très importants en agissant, à faibles concentrations, sur la régulation des réponses biologiques, la transduction du signal et autres voies de signalisation (Favier, 2003).

Dans l'ensemble de nos tissus sains, les défenses antioxydantes sont capables de faire face et détruire les radicaux produits en excès. On dit que la balance Oxydants /Antioxydants est en équilibre. Mais dans certaines situations, en raison d'une surproduction radicalaire (tabac, alcool, pollution, ...) ou d'une diminution des capacités antioxydantes (insuffisance d'apports des micronutriments antioxydants, inactivation enzymatiques) un déséquilibre entre la production des radicaux libres et le système de défense est à l'origine d'un état redox altéré de la cellule appelé stress oxydatif (Sohal et al., 2002).

Pour enrayer le stress oxydant, il faut donc aider la cellule et l'organisme par l'apport d'antioxydants secondaires (vitamine C, E, caroténoïdes, polyphénols) (Kohen et al., 2002).

### 4.2. Mécanismes d'action des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulier, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (Favier, 2006).

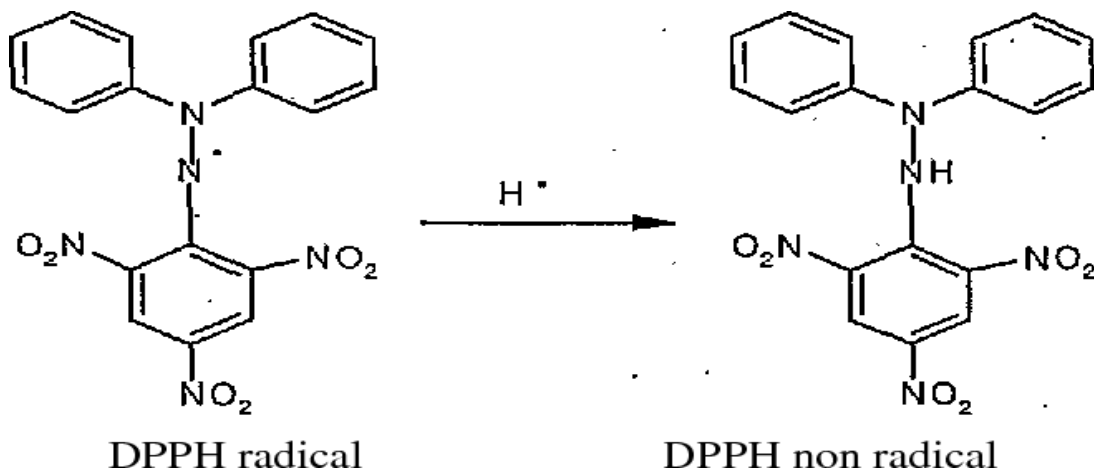
D'après (Halliwell, 1996), les modes d'action d'un antioxydant peuvent comprendre le piégeage direct des ERO, l'inhibition des enzymes et la chélation des traces métalliques responsables de la production d'ERO. Dans l'organisme, il existe plusieurs types de molécules à activité antioxydante dont les mécanismes d'action sont différents :

- Défenses non enzymatiques comme les vitamines E ( $\alpha$ -tocophérol) et vitamines C (Acide ascorbique) et les polyphénols issus des végétaux (flavonoïdes, xanthones, coumarines, caroténoïdes, dérivés d'acide phénolique, tanins, anthocyanines,). La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation.
- Défenses enzymatiques sont des systèmes de défense très efficaces parce que les enzymes ont la propriété de pouvoir réaliser un travail de façon permanente. Selon (Lehucher, 2001) cette ligne de défense est constituée de Superoxyde dismutase (Catalyse la dismutation de l'anion superoxyde), Catalase (Métabolise H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Glutathion peroxydase (Action réductrice sur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type ROOH en ROH. Selon leur mode d'action, les antioxydants sont classés en deux catégories :
- Système de défense primaire

Ex : la catalase, le glutathion, ces antioxydants préviennent la production d'ERO en limitant la phase d'initiation des réactions d'oxydation, ils agissent donc en prévention.

- Système de défense secondaire

Ex : les tocophérols, ces molécules sont dites « Chain Breaking », elles réagissent avec les  $ROO^\circ$  et / ou les  $R^\circ$ , bloquant ainsi les réactions de propagation. Ce type d'antioxydant permet d'éviter le passage de formes peu réactives ( $O_2^-$ ) à très réactives ( $OH^\circ$ ).

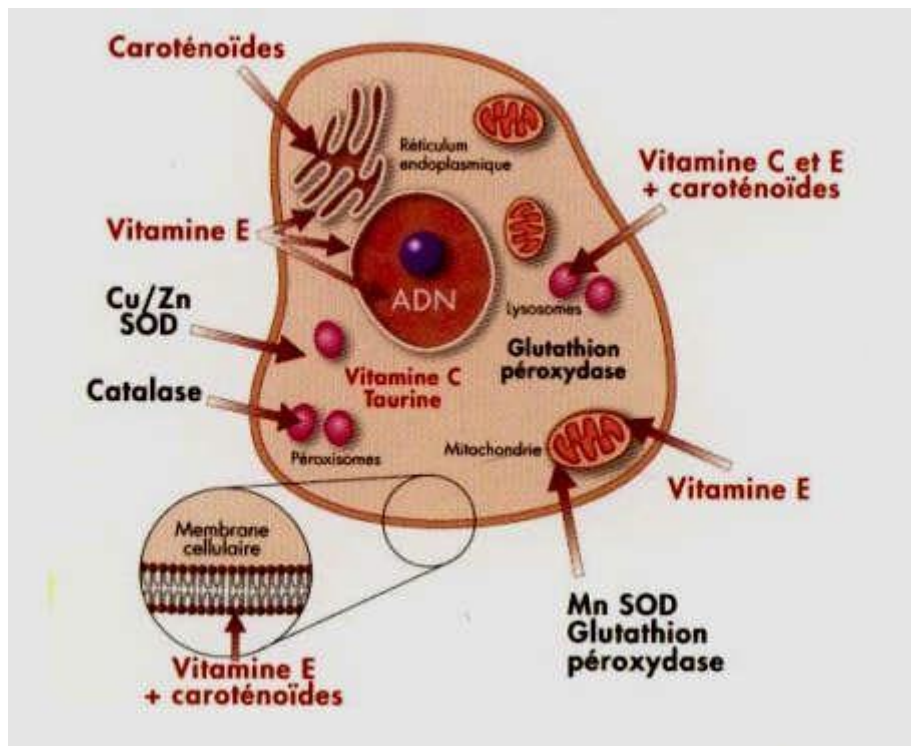


**Figure 18 :** réaction du DPPH avec un antioxydant.

#### 4.3. Différentes localisations cellulaires des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en molécules liposolubles ou hydrosolubles. Selon leurs caractéristiques physico-chimiques, ils auront une localisation cellulaire préférentielle, les membranes cellulaires pour les substances liposolubles et le cytosol et/ou le milieu extracellulaire pour les substances hydrosolubles.

Ils seront particulièrement efficaces sur les radicaux libres présents dans chaque type de Milieu, respectivement



**Figure 19 :** Sites d'action des nutriments antioxydants (En rouge) et des enzymes antioxydantes (En noir) (Opara, 2002).

#### 4.4. Origines des antioxydants

Les antioxydants peuvent être classés en deux catégories :

- Enzymes antioxydantes directement synthétisées par l'organisme : Superoxyde dismutase (SOD), Glutathion peroxydase, Catalases, Lipases, protéases, endonucléases (Éliminent les molécules oxydées), albumine, ferritine (Complexent les ions divalents).
- Nutriments antioxydants dont les apports sont nécessaires par l'alimentation : Vitamine E, Taurine -vitamine C, Caroténoïdes (lycopène, lutéine...), Polyphénols, Minéraux et oligo-éléments.

Les antioxydants synthétiques sont largement utilisés parce qu'ils sont efficaces et moins chers, tel que le butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluène (BHT) gallate propylée et le tétrabutylhydroquinone (TBHQ), cependant, leur sécurité est très discutée car ils génèrent un besoin de recherche comme matière de substitution d'après des sources naturelles comme antioxydants de la nourriture (Wang *et al.*, 2003).

Les polyphénols ce sont des composés qui attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes.

En effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d’inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyle, superoxyde et pyroxyde. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices.

**4.5. Méthode d’évaluation de l’activité antioxydante**

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée soit de façon in vivo, sur des Organismes vivants, soit de manière in vitro comme le cas du notre travail (Tableau 0).

**Tableau 04 :** Quelques méthodes d’évaluation de l’activité antioxydante in vitro.

|                               | Méthodes  |  |   |
|-------------------------------|---|--|---|
|                               | Transfert d’atome d’hydrogène   | Transfert d’électron   | Transfert d’atome d’hydrogène et d’électron   |
| <b>Exemples</b>               | - <b>ORAC</b> (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Capacité d’absorption des radicaux libres).   | -Test <b>Folin-Ciocalteu</b> (Analyse des phénols totaux).<br>- <b>FRAP</b> (Ferric Reducing Antioxydant Power) (Pouvoir réducteur de l’ion ferrique).   | - <b>DPPH</b> (2,2-DiPhenyle-1-PicrylHydrazyle) (Piégeage du radical DPPH <sup>•</sup> ).<br>- <b>ABTS</b> : Acide 2,2’-azino-(3-éthyl BenzoThiazoline)-6-Sulfonique (Réduction du radical-cation ABTS <sup>•+</sup> ). |
| <b>Mécanisme réactionnels</b> | $AH + X^{\bullet} \rightarrow XH + A^{\bullet}$<br>AH : antioxydant (donneur d’atome d’hydrogène)<br>X <sup>•</sup> : radical libre (accepteur d’atome d’hydrogène)<br>XH:radical libre inhibé,<br>A <sup>•</sup> :antioxydant stable | $M(III) + AH \rightarrow AH^{\bullet} + M(II)$<br>M(III) : antioxydant (Donneur d’un électron)<br>AH : radical libre (Accepteur d’un électron)<br>AH <sup>•</sup> : radical libre inhibé<br>M(II):antioxydant stable | Les réactions semblent plus complexes et suivent un des deux mécanismes selon la structure des antioxydants ou la nature du milieu réactionnel.   |



|                                     |   |  |   |
|-------------------------------------|---|--|---|
| <b>Nature de la molécule testée</b> | Hydrophile et lipophiles.   | Hydrophile et lipophiles.  | * Hydrophile et lipophiles (DPPH).<br>* Hydrophile (ABTS).  |
| <b>Avantages</b>                    | *Facile à mettre en œuvre   | *Facile à mettre en œuvre.   | *Facile à mettre en œuvre.<br>* Peu couteux.  |
| <b>Inconvénients</b>                | - Couteux (générateur des radicaux ROO•<br>*Mécanisme de génération des ROO•<br>Non physiologique<br>*Interférence possible de protéines. | -pH utilisé non physiologique<br>-Interférence possible à 595nm (FRAP) | - Encombrement stérique de molécules à haute poids moléculaires (DPPH).<br>- Interférence possible à 515nm (DPPH).<br>- Forte dépendance au pH et au solvant (DPPH).<br>*Produit de dégradation antioxydants (ABTS).<br>*Radical inexistant in vivo (DPPH, ABTS). |
| <b>Références</b>                   | - (Prior et al., 2003).<br>- (Alberto et al., 2004).  | - (Benzie et Strain, 1996).<br>- (Singleton et al., 1999).             | - (Brand et al., 1995).<br>- (Re et al., 1999).<br>- (Arts et al., 2004).   |

Contenu de la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de cinq tests chimiques, à savoir :

Folin-Ciocalteu, FRAP, DPPH•, ABTS•+ et ORAC.

Certains constituants qui ont un effet antioxydant peuvent être fortement liés à d'autres composants dans la matrice végétale et ne sont pas extraits par des solvants. Par conséquent, l'impact des fractions insolubles sur la capacité antioxydante totale peut être fortement sous-estimé.

Pour éviter ces inconvénients, une nouvelle procédure pour mesurer la capacité antioxydante des composants insolubles a été proposée par (Serpen et al., 2007).

Cette approche dite QUENCHER ne nécessite pas d'étapes d'extraction avant les mesures, car la partie insoluble de l'échantillon exerce l'activité antioxydante due aux

réactions superficielles avec, par exemple, une solution radicalaire à l'interface solide-liquide, tandis que la fraction soluble participe à la réaction des interactions liquide-liquide typiques (Gökmen *et al.*, 2009).

De plus, il ne dépend pas du mécanisme qui sous-tend le dosage et peut être combiné avec toutes les méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante recommandées pour l'évaluation représentative des propriétés antioxydantes (Huang *et al.*, 2005)

## 5. L'activité antimicrobienne

A travers les différentes civilisations et durant des siècles, *L. inermis* a été préconisée pour des affections aussi variées qu'astringentes, antihémorragiques, antifongiques, antibactériennes, sédatives, hypotensives, anti-amibiases et comme traitement de l'ictère et de la lèpre (Shivananda *et al.*, 2007).

Les qualités antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20ème siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. (Haddouche, 2008).

Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les microorganismes résistant aux antibiotiques.

Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des micro-organismes ou les plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles. (Sagdic *et al.*, 2002).

En particulier, l'activité antimicrobienne d'huiles et des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, médecine, thérapie naturelle et la conservation des aliments (Sagdic *et al.*, 2002).

### 5.1 Définition de l'activité antimicrobienne

L'activité antibiotique correspondant à une activité d'une molécule ou composé présent au sein d'un végétal qui à très faible concentration, inhibe le développement d'une bactérie ou la tue. La sensibilité d'une bactérie peut être différente selon la souche d'appartenance (Nicole *et al.*, 1998).

### 5.2 Métabolites secondaires responsables de l'activité antimicrobienne

Le métabolisme secondaire forme une très grande famille de composés naturels ; sont presque des polyphénols.

Il existe plusieurs catégories notamment les acides phénoliques, les coumarines, les lignanes, les flavonoïdes, les tanins et d'autres classes (Dacosta, 2003).

### 5.3 Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens

#### 5.3.1. *Escherichia coli*

C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'homme et de l'animal, (Kaper et al., 2004), de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6  $\mu\text{m}$ , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$ , *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (Percival, 2004).

#### 5.3.2. *Staphylococcus aureus*

Ce sont des Cocci Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$ , de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulées, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aigüe, intoxication alimentaire (Dworkin et al., 2006).

#### 5.3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine : jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (Percival, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8% des infections suites aux blessures chirurgicales (Van et Iglewski, 1998).



# Chapitre 2

Matériels et méthodes

Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés à évaluer les activités biologiques rattachées au genre *Lawsonia Inermis* obtenus par extraction des feuilles de Henné. L'extraction de la plante et l'évaluation de l'activité antimicrobienne sont réalisés au niveau du Laboratoire de la Faculté des Sciences de la Vie et de la Nature Université Frères Mentouri Constantine. Alors que le dosage des activités antioxydantes, enzymatique et dosage en polyphénols et en flavonoïdes est réalisé au niveau du Laboratoire de Biochimie du Centre National de Recherche en Biotechnologie (CRBT) de Constantine

### **1. Matériel végétal**

Le matériel utilisé dans notre étude est constitué de feuilles de *Lawsonia Inermis*.

La plante a été récolter au niveau de la région de BECHAR le mois de décembre 2021.

Nous avons étudié trois échantillons : La plante à l'état frais (F) ; plante séchée au séchoir (S) et plante séchée a l'air libre (L).

#### **1.1. Broyage, tamisage et technique de séchage**

Après la récolte, le matériel végétal est débarrassé des débris. Pour s'assurer de la bonne conservation des échantillons, un séchage à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours a été réalisé plus un séchage au séchoir.

Après séchage, les feuilles sont broyées à l'aide d'un mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine, la poudre ainsi obtenue, est utilisée pour la préparation des extrais éthanoliques.

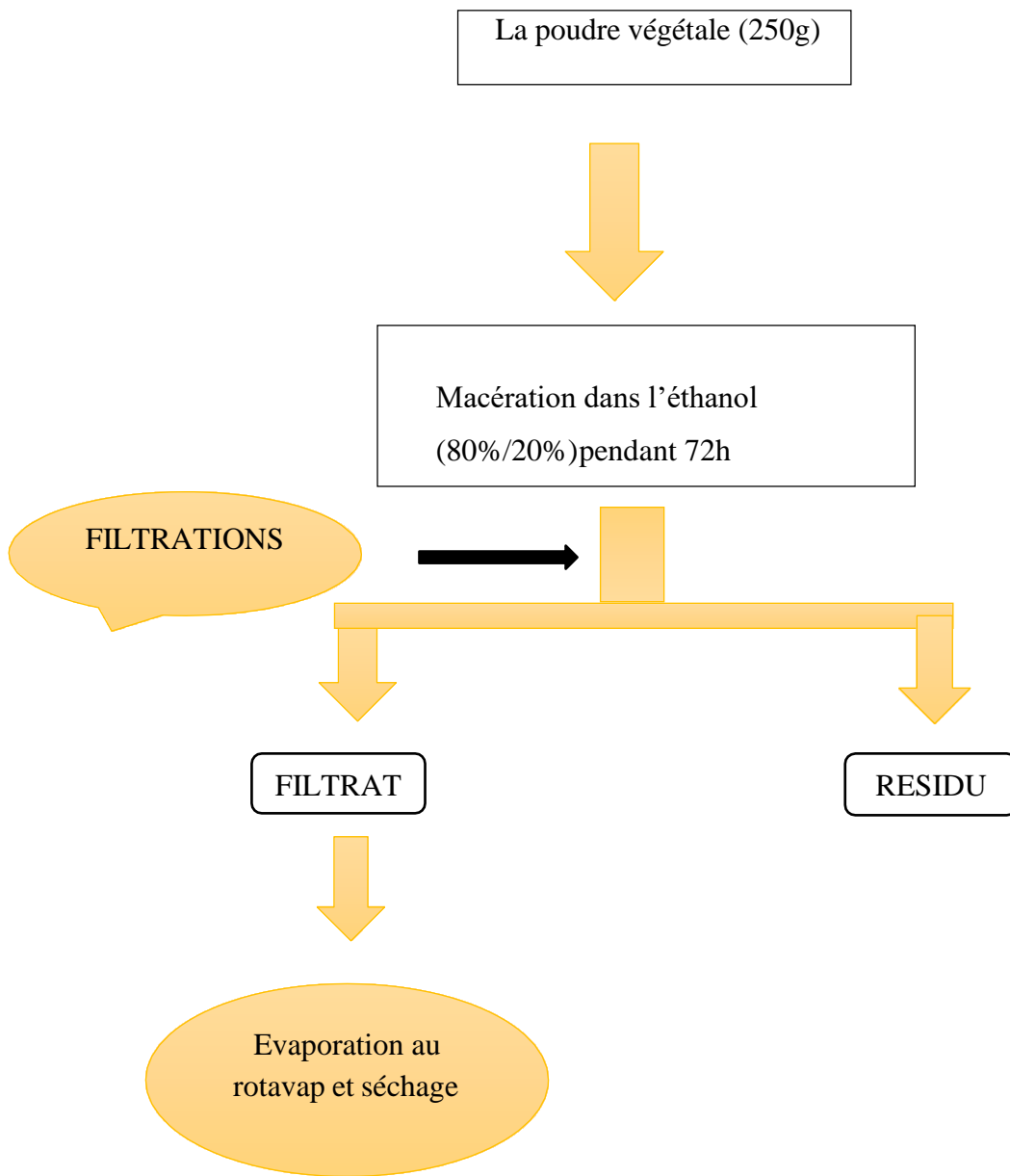
Au cours de notre travail, nous nous sommes intéressés à évaluer les paramètres suivants :

- Extraits bruts obtenus par macération par une solution d'éthanol des feuilles de *Lawsonia Inermis*.
- Evaluation de l'activité antioxydante, antibactérienne et enzymatiques, dosage phénolique et flavonoïde des feuilles de *Lawsonia Inermis*.

### **2. Méthode d'extraction**

#### **2.1. Extraction par l'éthanol**

Une masse de 250g de poudre végétale fine de chaque extrait a été ajoutée à 1L de liquide éthanolique (80%) pendant 3 jours à l'obscurité à température ambiante. Les extraits éthanoliques sont récupérés dans un premier temps après filtration du mélange à travers le coton hydrophile. Les résidus obtenus sont repris pour une deuxième fois d'extraction avec des différents volumes d'un même mélange pour augmenter le rendement des extraits. Les trois filtrats sont récupérés par évaporation du solvant à l'aide d'un rotavapeur rotatif à 40°C. Les extraits secs obtenus ont été ensuite conservés à la hôte jusqu'à leurs séchages définitifs et leurs utilisations.





**Figure 20** : protocole de l'extraction des molécules bioactifs selon (Falleh et al., 2008).



**Figure 21**: filtration de l'extrait éthanolique.



**Figure 22 :** Séchage des extraits éthanoliques.

### 3. Détermination des rendements d'extraction

Le rendement d'extraction a été estimé par rapport au poids de l'extrait brut et de la masse de la matière végétale sèche. Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$RE (\%) = \frac{PBE - PBV}{PP} \times 100$$

**RE :** rendement d'extraction en pourcentage.

**PBE :** poids des boîtes pleines après séchage (contient l'extrait brut) en gramme.

**PBV :** poids des boîtes vides en gramme.

**PP :** poids des plantes sèches en gramme.

### 4. Activités biologiques de *Lawsonia Inermis*

#### 4.1. Dosages des composés phénoliques et des flavonoïdes totaux

##### 4.1.1. Contenu total flavonoïque (TFC)

###### a- Principe

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre AL et les flavonoïdes. La méthode de (Topçu *et al.*, 2007) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

###### b- Instruments utilisés

Un lecteur microplaque (*Perkin Elmer, Enspire*) est utilisé pour la mesure de l'absorbance



**c- Réactifs utilisés**

- 1- Méthanol
- 2- Eau distillée
- 3- 10% nitrate d'aluminium ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$ )
- 4- 1 M Potassium acétate ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ )
- 5- Quercétine (Flavonoïde)
- 6- Extrait de plante

**d- Préparation des solutions**

Pour 1 M Potassium acétate ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) on dissout 9.80 grammes de ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) dans 100 ml d'eau distillée pour obtenir la solution  $S_1$ . Pour 10% nitrate d'aluminium ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3, 9\text{H}_2\text{O}$ ) on pèse 10g de ce produit dans 100ml d'eau distillée.

**e- Préparation de l'extrait de plante**

Une masse de 1 milligramme d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de méthanol pour obtenir la solution ( $S_2$ ).

**f- Procédure**

- **Pour l'extrait**

50  $\mu\text{l}$  ( $S_2$ ) (extrait de plante) + 130  $\mu\text{l}$  (MeOH) + 10  $\mu\text{l}$  ( $S_1$ ) ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) + 10  $\mu\text{l}$  ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_2, 9\text{H}_2\text{O}$ ) + attendre 40 mn + lecture à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 $\mu\text{l}$  extrait + 150 $\mu\text{l}$  méthanol).

- **Pour l'étalon**

**g- Préparation de la gamme d'étalon de la Quercétine**

On prend 1 mg de la Quercétine et on le dissout dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution 0,2mg/ml  $S_m$ . Les dilutions sont préparées dans des Eppendorfs comme la suite :

Quercetin (25)  $\longrightarrow$  25  $\mu\text{l}$   $S_m$  + 175  $\mu\text{l}$  MeOH

Quercetin (50)  $\longrightarrow$  50  $\mu\text{l}$   $S_m$  + 150 $\mu\text{l}$  MeOH

Quercetin (75)  $\longrightarrow$  75  $\mu\text{l}$   $S_m$  + 125 $\mu$  MeOH

Quercetin (100)  $\longrightarrow$  100  $\mu\text{l}$   $S_m$  + 100 $\mu\text{l}$  MeOH

Quercetin (125)  $\longrightarrow$  125  $\mu\text{l}$   $S_m$  + 75 $\mu\text{l}$  MeOH

Quercetin (150)  $\longrightarrow$  150  $\mu\text{l}$   $S_m$  + 50 $\mu\text{l}$  MeOH

Quercétine (175)  $\longrightarrow$  175 $\mu\text{l}$   $S_m$  + 25 $\mu\text{l}$  MeOH

Quercetin (200)  $\longrightarrow$  200 $\mu\text{l}$   $S_m$  + 0 MeOH

50  $\mu\text{l}$  de chaque dilution sont transférés dans une microplaque 96 puits + 130  $\mu\text{l}$  (MeOH) + 10  $\mu\text{l}$  ( $S_1$ ) ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ ) + 10  $\mu\text{l}$  ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_2, 9\text{H}_2\text{O}$ ) + attendre 40 mn + lecture à 415 nm.

#### 4.1.2. Contenu total phénolique (TPC)

##### A- Principe de la réaction

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965) selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par (Muller et al., 2010).

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>) et d'acide phosphomolybdique (H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>), est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>) et de molybdène (Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm.

##### B- Instruments utilisés

Un lecteur microplaque.

##### C- Réactifs utilisés

7- Eau distillée, Méthanol

8- FCR (Folin-Ciocalteu réactif)

9- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> de 7,5% (Carbonate de sodium)

10- Acide Gallique

11-Extrait de plante

##### D- Mode opératoire

###### 1- Préparation de Carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) à 7,5%

7,5 grammes de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et sont dissouts dans 100 ml d'eau distillé.

###### 2- Préparation de l'extrait de plante

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de l'eau distillée (ou Méthanol)

###### 3- Préparation de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois

1ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10ml avec l'eau distillée (9ml).

##### E- Procédure

20 µl d'extrait de plante + 100µl de FCR dilué (1 :10) + 75 µl de carbonate de sodium (7,5%) + mettre le mélange à l'obscurité pendant 2h + lecture à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

###### 1. Gamme d'étalonnage

Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique :

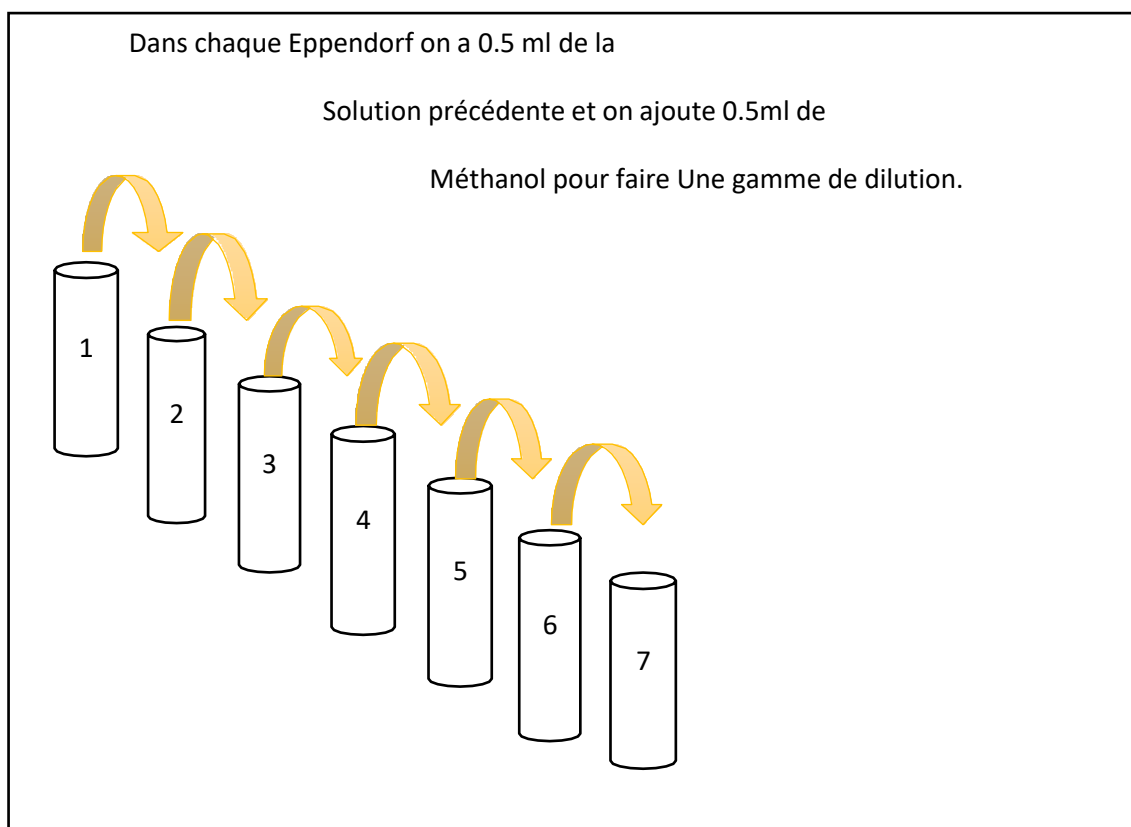
On prend 0,5 mg de l'acide gallique et on le dissolvé dans 5 ml de Méthanol pour obtenir la solution S<sub>1</sub> (0,2mg/ml). Les dilutions sont préparées dans des Eppendorf comme la suite :

25µg/ml → 25µl de S1+ 175µl de MeOH  
 50 µg /ml → 50µl de S1+ 150µl de MeOH  
 75µg/ml → 75µl de S1+ 125µl de MeOH  
 100µg/ml → 100µl de S1+ 100µ de MeOH  
 125µg /ml → 125µl de S1+ 75µl de MeOH  
 150µg /ml → 150µl de S1+ 50µl de MeOH  
 175 µg /ml → 175µl de S1+ 25µl de MeOH  
 200µg /ml → 200µl de S1

20µl de chaque dilution sont transférés dans une microplaque + 100µl FCR (1 :10) + 75µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7,5%) + incubation 2h + lecture à 765nm.

## 2. Préparation d'une gamme de dilutio

On a pesé 0.4mg d'extrait et on le dissout dans 1ml de méthanol (solution mère) (Tube 01).



**Figure 23 :** préparation d'une gamme de dilution d'extrait brute.

**Remarque :** Les différents extraits sont dosés par la même méthode

### 4.2. Les activités antioxydantes

L'activité antioxydante est réalisé par deux méthodes :

- Piégeage du radical libre DPPH.
- Piégeage du cation radical ABTS.

#### 4.2.1 Activité DPPH

##### A- Principe de la réaction

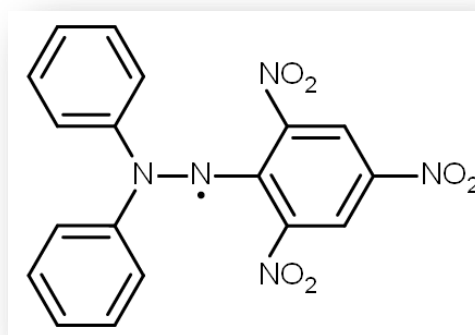
L'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH (Blois, 1958). Le  $\alpha$ -tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

##### B- Instruments utilisés

Un lecteur de microplaque à 96 puits de volume 200  $\mu$ l pour chaque puits

##### C- Réactifs utilisés

- 1- Ethanol
- 2- DPPH
- 3- A-tocophérol
- 4- BHA
- 5- BHT
- 6- Quercétine ou Catéchine
- 7- Extrait de plante



##### D- Mode opératoire

##### 1. Préparation de la DPPH

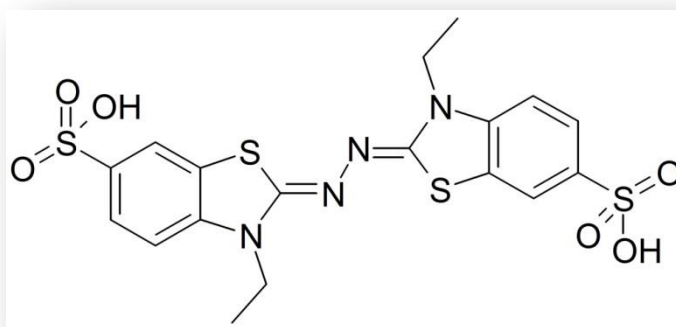
Dissoudre 6 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à  $-20^{\circ}\text{C}$  à l'abri de la lumière. L'absorbance est 0.5 nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

##### 2. Procédure

160 (DPPH) + 40  $\mu$ l (extrait) + lecture 517

##### 4.2.2. Activité ABTS

L'activité d'élimination des radicaux libres de l'extrait de Lawsonia inermis est déterminée selon la méthode de (Reetal, 1999).



### A- Procédure

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium  $K_2S_2O_8$ : les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16H ; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou  $H_2O$ ) à  $0.700 \pm 0.020$  à 734 nm avant l'usage.

( $ABTS^+$ )  $\rightarrow$  19,2 mg (7 mM) ABTS + 5 ml  $H_2O$  + 3,3 mg (2.45 mM) ( $K_2S_2O_8$ ) +5 ml  $H_2O$ + attendre 16 heures l'abri de la lumière

### Procédure

160  $\mu$ l ( $ABTS^+$ ) + 40  $\mu$ l (extrait) + attendre 10 mn + lecture à 734 nm.

### 4.3.Activité enzymatique

#### A- Principe de la réaction

L'activité inhibitrice butyrylcholinestérase activités est déterminée par la méthode de (*Ellman et al., 1961*).

#### B- Procédure

150  $\mu$ L of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0)+ 10  $\mu$ L d'extrait solution dissous dans l'éthanol a différentes concentrations + 20  $\mu$ L AChE ( $5.32 \times 10^{-3}$  U) ou BChE ( $6.85 \times 10^{-3}$  U) solution+ incubé a  $25^\circ C$  pendant 15 mn + 10  $\mu$ L of DTNB (0.5 mM) + 10  $\mu$ L of acetylthiocholine iodide (0.71 mM) ou 10  $\mu$ L of butyrylthiocholine chloride (0.2 mM)+ lecture à 412 nm, pour 0 mn une fois lecture, 5 mn deux lecture, 10 mn trois lecture, 15 mn quatre lecture.

Le pourcentage d'inhibition de AChE ou BChE enzymes est déterminé par rapport au blanc (éthanol avec le phosphate buffer pH 8) par la formule  $(E - S)/E * 100$ .

E : l'activité de l'enzyme sans extrait / S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

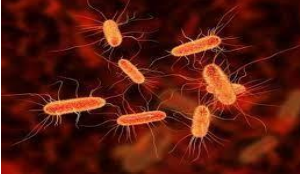

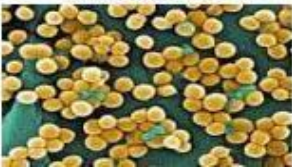
Le Galantamine est utilisé comme référence.

#### 4.4.L'activité antimicrobienne

Les tests de l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits bruts aqueux de *Lawsonia inermis* ont été réalisés dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Constantine. Les trois souches bactériennes testées sont fournies par Mme ABDELAZIZ WIDED du laboratoire de l'Université de Constantine. Les bactéries utilisées sont les suivantes :

- **Bactéries à Gram négatif** : Escherichia coli. (ATCC 8739)
- **Bactéries à Gram négatif** : Pseudomonas aeruginosa. (ATCC 9027)
- **Bactéries à Gram positif** : Staphylococcus aureus. (ATCC 5538)

**Tableau 05 :** Principales caractéristiques des souches microbiennes testées.

| L'espèce                | Origine   | Gram | Forme et mobilité   | Caractère biochimique  | Habitat  | Pouvoir pathogène  |
|-------------------------|-----------|------|---|--|--|--|
| Escherichia coli        | ATTC 8739 | -    |    | Aérobie<br>Facultatif<br>Oxydase -<br>catalase +<br>Glucose +<br>nitratase + | La flore digestive de l'homme et des animaux             | -infection intestinale<br>-infection urinaire<br>-insuffisance rénale                  |
| Pseudomonas aeruginosa. | ATCC 9027 | -    |    | Aérobie<br>Facultatif<br>Oxydase<br>Glucose-<br>Uréase+                      | Les sols et milieu humide fréquent en milieu hospitalier | -infections oculaires et des poumons<br>septicémie                                     |
| Staphylococcus aureus   | ATCC 5538 | +    |  | Aérobie<br>Facultatif<br>Catalase +<br>Oxydase -<br>Coagulase+               | Peau et muqueuse   | -Infections pyogènes grave<br>-Les infections nosocomiales<br>-les infections Cutanées |

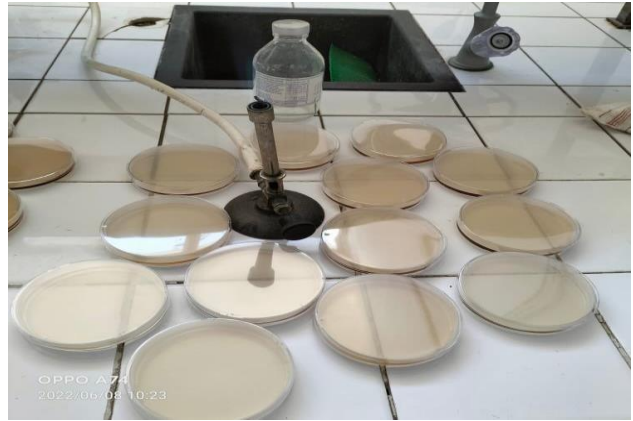
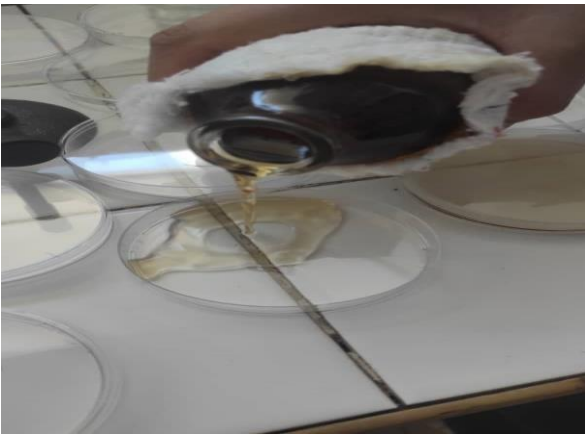
Dans cette activité, on a utilisé la technique de l'aromatogramme mise au point par Schroeder et Messing en 1949 et cité par (*Rhayour, 2002*).

Dans cette méthode, on a utilisé des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre, imprégnés par un volume connu de l'extrait brut à évaluer et déposés à la surface d'un milieu gélosé (Agar de Muller Hinton « AMH ») coulé dans de boîtes de pétri standard sur 4 mm d'épaisseur puisensemencé par écouvillonnage et incubé pendant 24 h à 36° C, la lecture des résultats a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm (*Ponce et al., 2003*). Cette activité est réalisée à l'aide de plusieurs étapes :

#### 4.4.1. Préparation des milieux de culture et ensemencement des souches bactériennes

Après stérilisation du milieu Mueller Hinton, 20 ml du milieu sont coulés dans des boîtes de pétri de 90 mm de diamètre et l'épaisseur doit être impérativement de 6 MM.

Le milieu est laissé se solidifier sur une surface froide dans des conditions aseptiques. Afin d'éviter la formation des gouttelettes d'eau sur la surface de la gélose, phénomène pouvant altérer les qualités de diffusion sur le milieu.



**Figure 24 :** Ecoulement et séchage de la gélose.



**Figure 25 :** Séchage des disques.

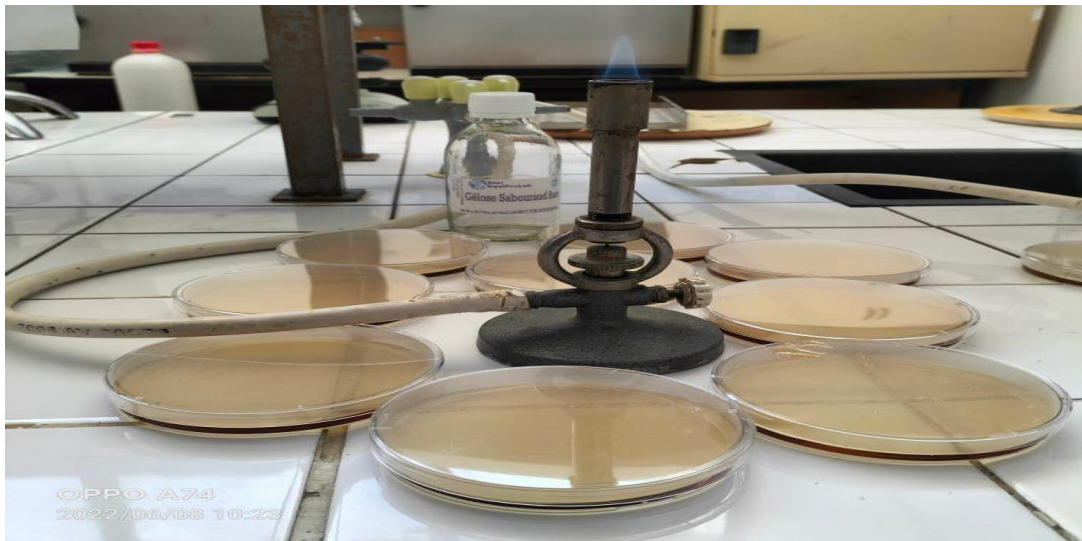
L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage en stries serrées sur toute la surface du milieu en 3 reprises en faisant tourner la boîte de pétri de 60° après chaque application. L'inoculum doit être bien réparti sur la surface de la gélose afin d'obtenir une bonne reproductibilité.



**Figure 26 :** Ensemencement des souches bactériennes choisies.

#### 4.4.2. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 36°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger la pipette pasteur dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée.



**Figure 27 :** Préparation de l'inoculum.





**Figure 28 :** Incubation des souches microbiennes testées



# **CHAPITRE 3**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

Dans cette partie, nous allons présenter et traiter les résultats obtenus des activités biologiques (antimicrobienne / antioxydante / Enzymatique / dosage des polyphénol / dosage des flavonoïde) sur les trois échantillons de feuilles de *Lawsonia Inermis*.

### 1. Le rendement de l'extraction

Le but de cette étape c'est de savoir la quantité et le pourcentage d'extrait obtenus par une extraction.

Le rendement d'extraction a été estimé par rapport au poids de l'extrait brut et de la masse de matière végétale sèche. Il est exprimé en pourcentage et calculé selon la formule suivante :

$$RE (\%) = \frac{PBE - PBV}{PP} \times 100$$

**RE** : rendement d'extraction en pourcentage.

**PBE** : poids des boites pleines après séchage (contient l'extrait brut) en gramme.

**PBV** : poids des boites vides en gramme.

**PP** : poids des plantes sèches en gramme.

**PBE – PBV** : poids de l'extrait sec.

**Tableau 6** : Rendement des extraits éthanoliques des trois échantillons testés de *Lawsonia Inermis*

|                               | <i>Lawsonia inermis</i> |       |       |
|-------------------------------|-------------------------|-------|-------|
|                               | F                       | L     | S     |
| Poids des plantes sèches (g)  | 250                     | 250   | 250   |
| Poids des boites vides en (g) | 57,20                   | 57,30 | 57,20 |
| Poids de l'extrait sec (g)    | 29,0987                 | 34,8  |       |
| Rendement (%)                 | 11,64                   | 13,92 | 44    |

Légende :

F—> Extrait à l'état frais.

L—> Extrait sécher à l'air libre.

S—> Extrait sécher au séchoir.

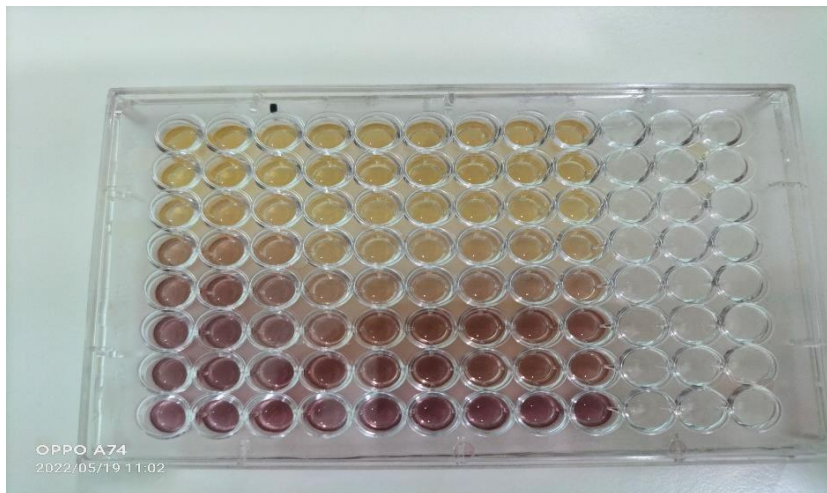
Le tableau ci-dessus représente les rendements massiques des trois extraits bruts éthanoliques de *Lawsonia inermis* (les feuilles à l'état frais, les feuilles sécher à l'air libre et les feuilles sécher au séchoir) qui sont de l'ordre de : 11,64%, 13,92% et 44% respectivement.

## 2. Les activités biologiques

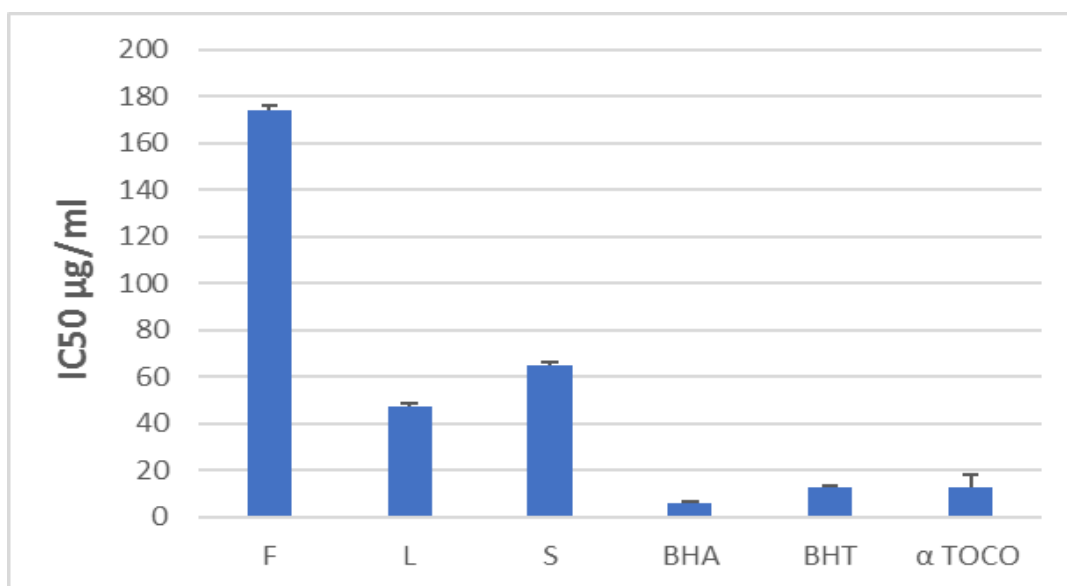
### 2.1. Activité anti-radicalaire au DPPH

Le dosage au 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle est l'un des plus largement utilisés. (Musa, 2016).

L'activité antioxydante des trois extraits (A l'état frais F / sécher a l'air libre L / sécher au séchoir S) a été évaluée par cette méthode, dans le but de déterminer leurs capacités d'inhiber la moitié du radicale. Cette méthode s'accompagne par le virement de la couleur violette du radicale à la couleur jaune mesurable à 517 nm.



**Figure 29** : plaque de dosage de l'activité anti-radicalaire (DPPH) des extraits de *Lawsonia Inermis*.



**Figure 30 :** Représentation d'IC50 de l'activité anti-radicalaire (DPPH) des trois échantillons testés.

D'après la figure 30, les valeurs (IC50) exprimées par les extraits des feuilles de *Lawsonia Inermis* (F, L, S) sont de l'ordre de (173,90±2,07µg/ml), (46,93±1,83µg/ml) et (64,79±1,65µg/ml) respectivement.

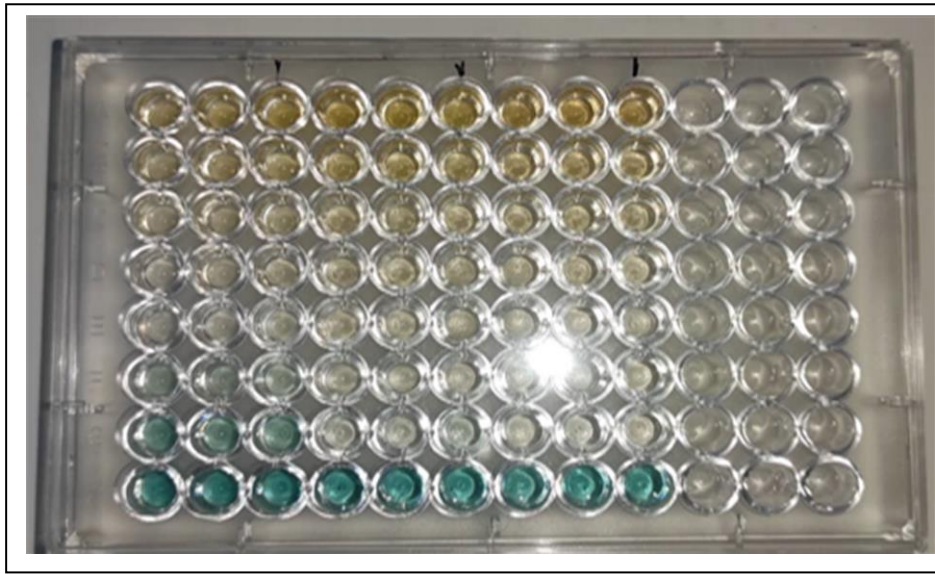
On observe que l'extrait sécher à l'air libre présente une meilleure activité anti-radicalaire avec une IC50 de (46,93µg/ml±1,83) qui est presque 8 fois moins de celle présenter par le BHA et presque 4 fois celle de BHT et du α tocophérol suivis par l'extrait séché au séchoir (64,79±1,65µg/ml) et l'extrait à l'état frais (173,90±2,07µg/ml).

Ces valeurs des IC50 du test DPPH sur les feuilles de *Lawsonia Inermis* indiquant une activité anti radicalaire importante.

La valeur d'IC50 est liée à la capacité antioxydante d'un composé, plus IC50 est faible plus l'activité antioxydante d'un composé est élevée (Villaño et al., 2007).

Par comparaison avec les travaux réalisés par (Balaei-Kahnamoei Et al., 2021) sur les grains de la même espèce et celle de (Al-Snafi et al., 2019) sur les feuilles d'origine d'Iraq, leurs résultat sont [3,08±0,10 µg/ml] et [3,79 ±0,37 µg/ml] et [6,9 ±0,1 µg/ml] supérieurs que les nôtres (173,90±2,07µg/ml)(F) (46,93±1,83µg/ml)(L) et (64,79±1,65µg/ml)(S).

## 2.2. Activité du piégeage du cation radical ABTS

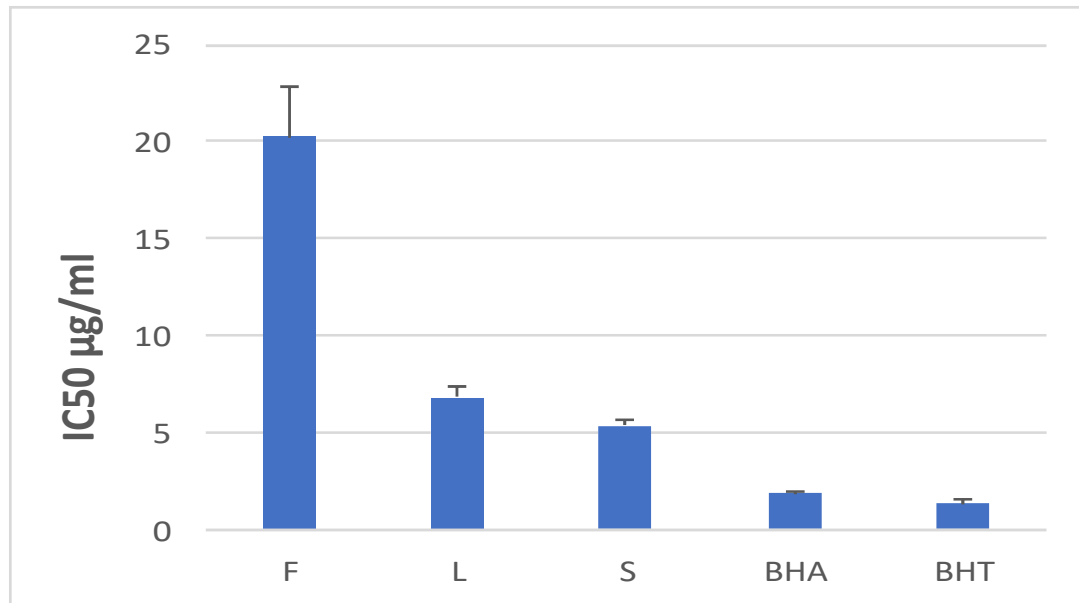


**Figure 31 :** plaque de dosage du radical ABTS des extraits *Lawsonia Inermis*.

Les résultats du test ABTS montre que les extraits testés expriment une activité antioxydante à l'égard du radicale ABTS.

Toute fois ces résultats restent inférieures à ceux des standards utilisés BHA et BHT.

La figure 31 montre que les deux extraits sécher au séchoir et a l'air libre sont les plus actifs avec des CI50 similaires de  $(5.34 \pm 0.28 \mu\text{g/ml})$  et  $(6.76 \pm 0.53 \mu\text{g/ml})$  respectivement, qui sont trois et cinq fois moins de celle exprimé par BHA  $(1.81 \pm 0.10 \mu\text{g/ml})$ , BHT  $(1,29 \pm 0,30 \mu\text{g/ml})$ , Alors que l'extrait à l'état frais présente la plus faible activité antioxydante avec une CI50 de  $(20.23 \pm 2,56 \mu\text{g/ml})$ .



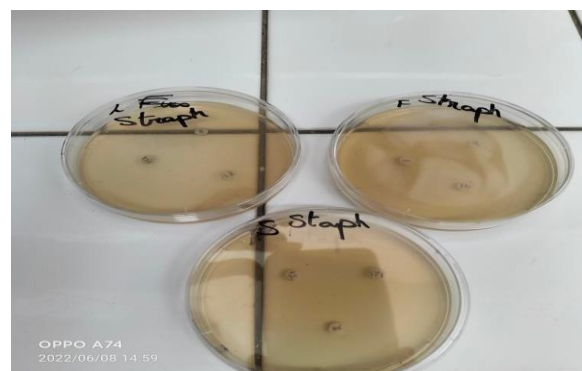
**Figure 32 :** Représentation d'IC50 de l'activité ABTS des trois échantillons testés.

Nos résultats obtenus avec les deux extraits ( $6.76 \pm 0.53 \mu\text{g/ml}$ ) (L) ( $5.34 \pm 0.28 \mu\text{g/ml}$ ) (S) se rapproche à celui de (*Al-Snafi et al., 2019*) qui a travaillé sur un extrait brut de la même espèce et qui a rapporté une valeur de CI50 de  $8,6 \mu\text{g/ml}$

### 2.3. Activité antimicrobienne

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antimicrobien des trois extraits à l'état frais, sécher à l'air libre et sécher au séchoir obtenu des feuilles de *Lawsonia Inermis* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide, (Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons).

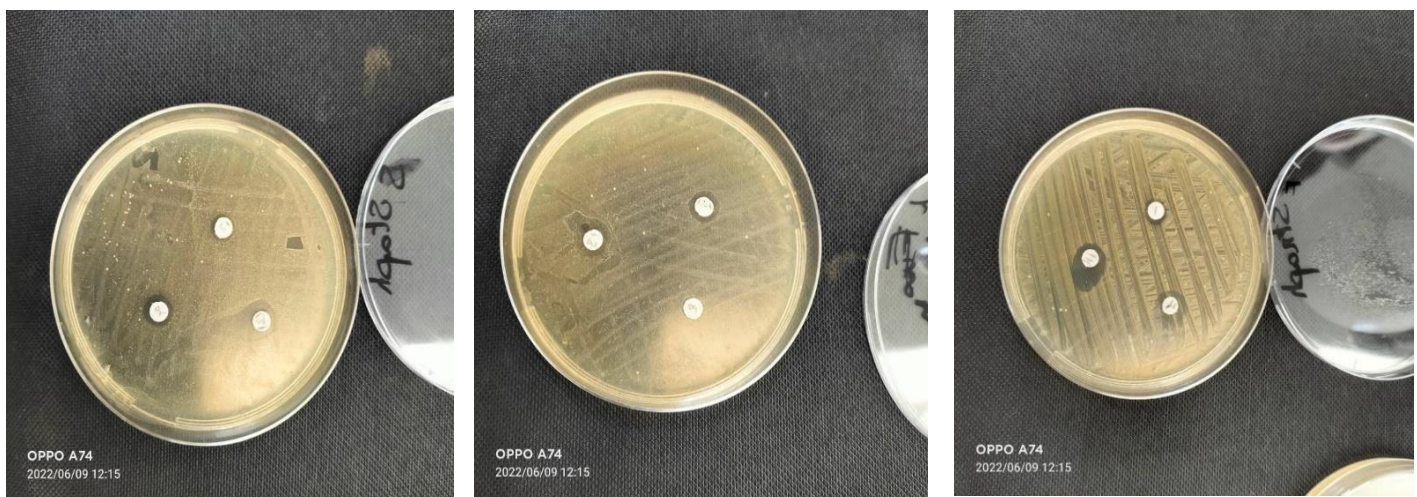
L'activité antimicrobienne des trois extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits à tester sur trois bactéries à (Gram-) (*Escherichia coli* / *Pseudomonas aeruginosa*) et (Gram+) (*Staphylococcus aureus*) et un champignon (*Fusarium oxysporium*) qui apparaît sur la figure (33).





**Figure 33 :** Observation de l'activité antimicrobienne.

Après une incubation de 24h pour les bactéries *Escherichia coli* / *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* et 62h pour le champignon *Fusarium oxysporium* à une température de 36°C. Les résultats obtenus sont représentés sur les figures nous 34/35/36/37 :

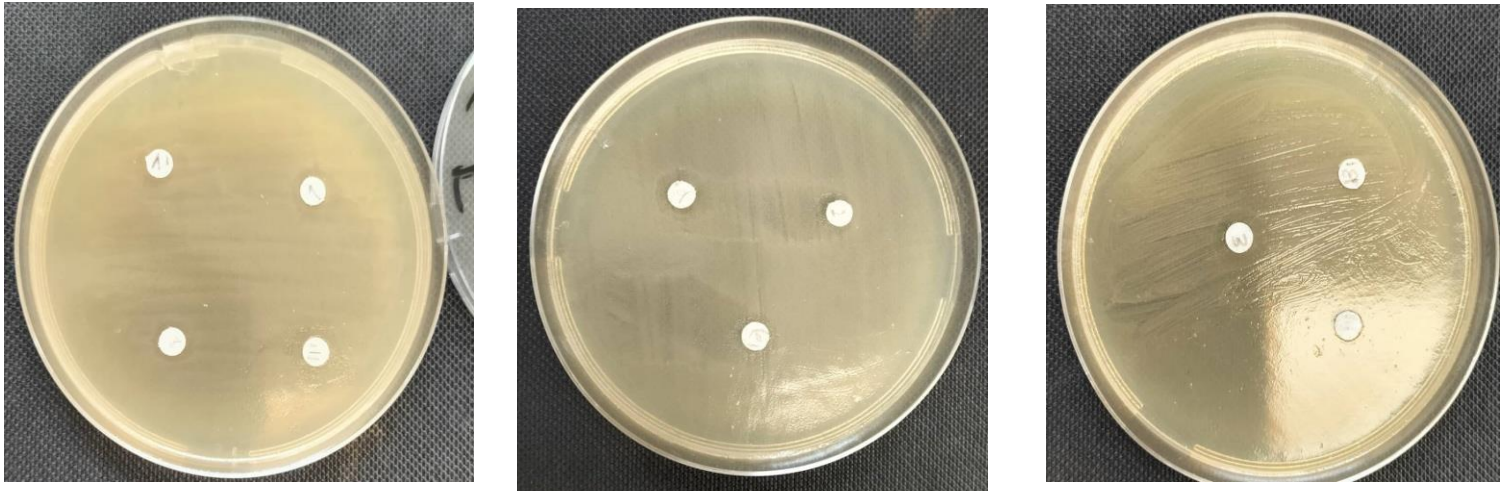


**Figure 34 :** Zone d'inhibition sur *Staphylococcus aureus*.

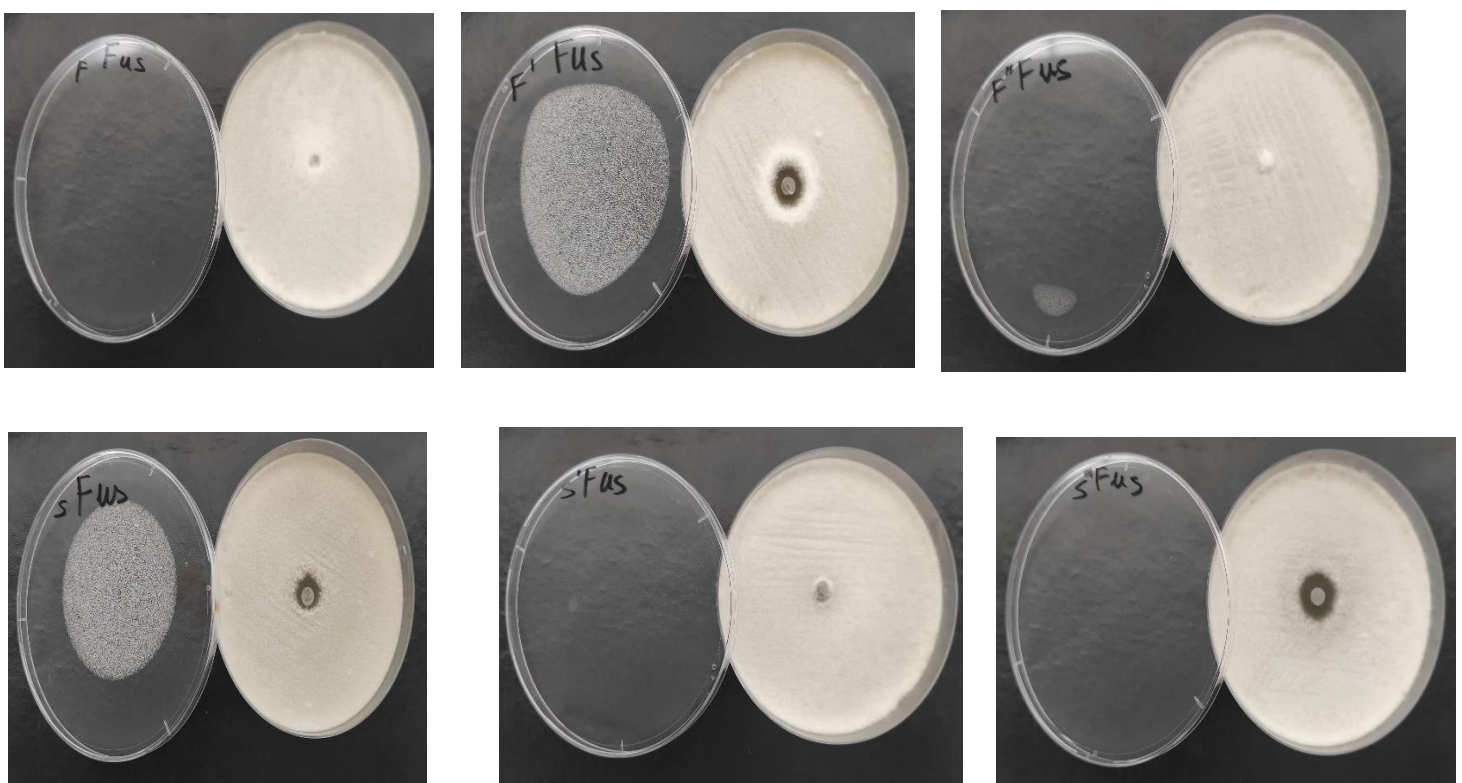


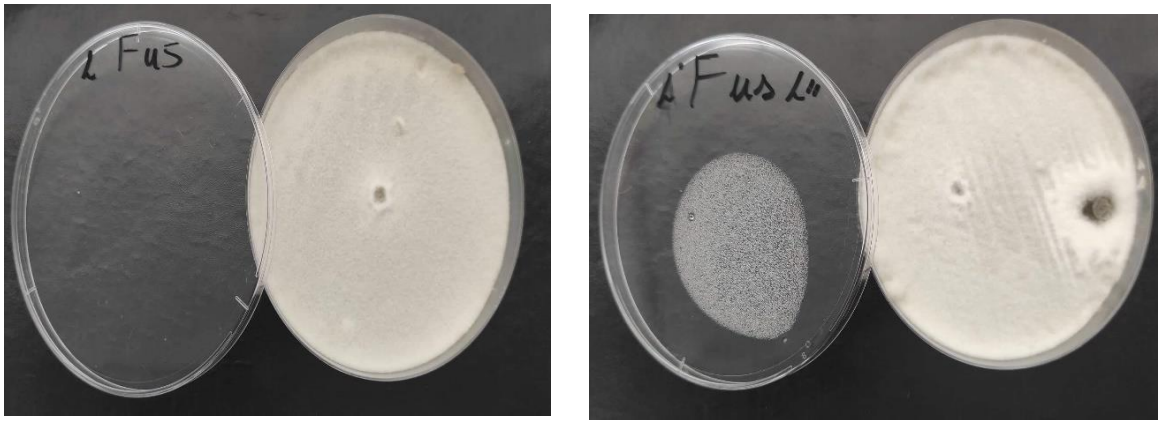


**Figure 35** : Zone d'inhibition sur *Pseudomonas Aeruginosa*.



**Figure 36** : Zone d'inhibition sur *Escherichia coli*.



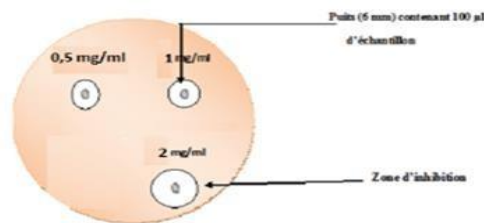


**Figure 37 :** Zones d’inhibition des *Fusarium oxysporium*.

**Lecture des résultats**

L’activité antibactérienne est considérée comme positive à partir d’un diamètre supérieur à 6 mm, Ce produit peut avoir :

- Très forte activité : diamètre = 30 mm ; forte activité diamètre 21-29 mm
- Moyenne activité : diamètre 16-20 mm ; faible activité diamètre 10-15mm
- Petite ou pas d’activité : diamètre =9 mm



**Figure 38 :** Principe d’évaluation de l’activité antimicrobienne (*Fattouch et al., 2007*).

On a utilisé plusieurs concentrations qui sont indiquées sur le tableau suivant :

**Tableau 7 :** Représente les différentes concentrations utilisées des extraits de *Lawsonia Inermis*.

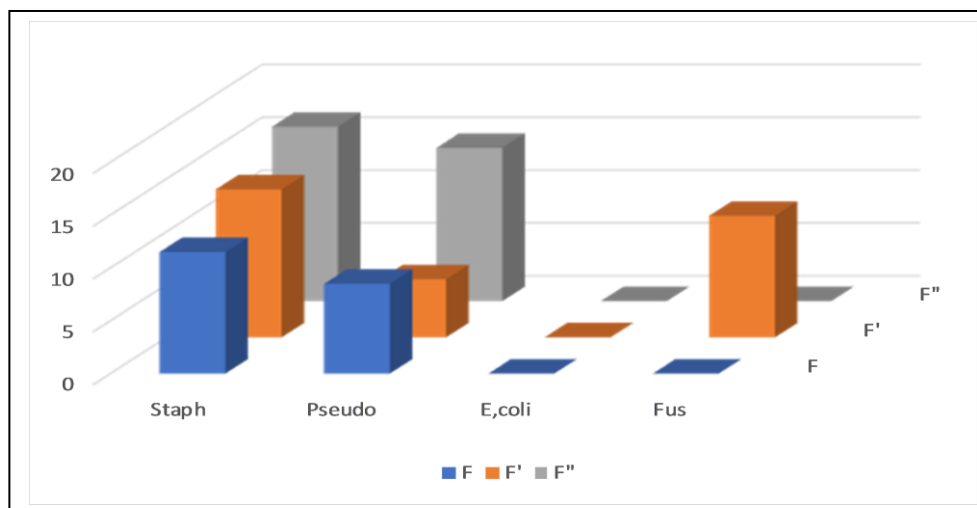
| [C1] =0,5mg/ml | [C2] =1mg/ml | [C3] =2mg/ml |
|----------------|--------------|--------------|
| F              | F'           | F''          |
| S              | S'           | S''          |
| L              | L'           | L''          |

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 7. On remarque que les extraits utilisés (F, L et S) expriment des activités différentes, certains extraits leurs activités sont moyennes et d'autres faibles par rapport aux différentes souches bactériennes a (Gram + et à Gram -) et champignon.

**Tableau 8 :** Représente les calculs des zones d'inhibitions exprimés en mm des bactéries et champignon et leurs activités sur les extraits de *lawsonia inermis*.

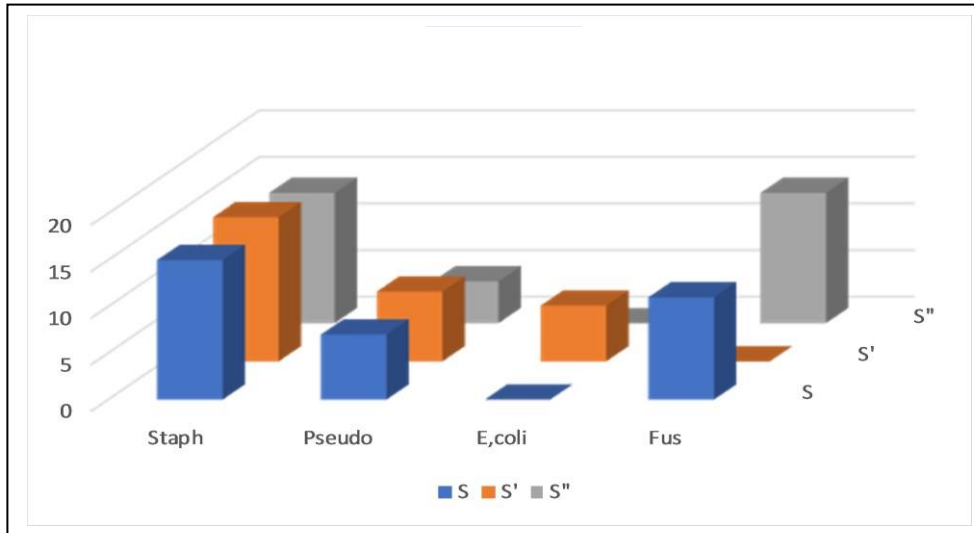
| Extraits               | F                |                  |                  | S                |                  |                  | L               |                 |                 |
|------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                        | F                | F'               | F''              | S                | S'               | S''              | L               | L'              | L''             |
| Staphylococcus aureus  | 11,5             | 14               | 16,5             | 15               | 15,5             | 14               | 6,5             | 8,5             | 8               |
|                        | Activité moyenne | Activité moyenne | Activité moyenne | Activité moyenne | Activité moyenne | Activité moyenne | Activité faible | Activité faible | Activité faible |
| Pseudomonas aeruginosa | 8,5              | 5,5              | 14,5             | 7                | 7,5              | 4,5              | 4               | 5               | 5,5             |
|                        | Activité faible  | Activité faible  | Activité moyenne | Activité faible  | Activité faible  | Activité faible  | Activité faible | Activité faible | Activité faible |
| Escherichia coli       | /                | /                | /                | /                | 6                | /                | /               | /               | /               |
|                        | Pas d'activité   | Pas d'activité   | Pas d'activité   | Pas d'activité   | Activité faible  | Pas d'activité   | Pas d'activité  | Pas d'activité  | Pas d'activité  |
| Fusarium oxysporium    | /                | 11,5             | /                | 11               | /                | 14               | /               | /               | 7,5             |
|                        | Pas d'activité   | Activité moyenne | Pas d'activité   | Activité moyenne | Pas d'activité   | Activité moyenne | Pas d'activité  | Pas d'activité  | Activité faible |

L'extrait à l'état frais a une activité moyenne sur la bactérie staphylococcus aureus, tandis que la pseudomonas aeruginosa son activité est faible. Escherichia coli n'a pas d'activité par contre fusarium présente une faible a moyenne activité antibactérienne.



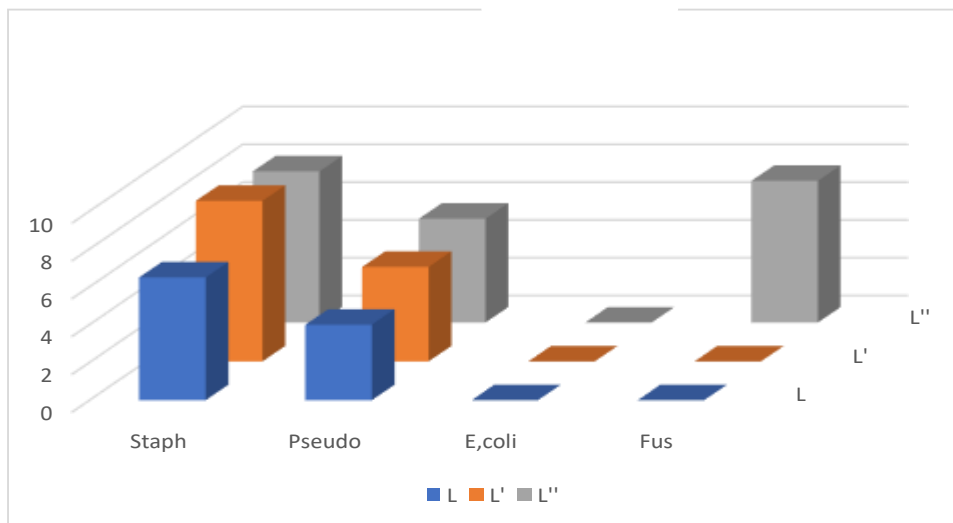
**Figure 39 :** Effet de l'extrait à l'état frais sur les souches cliniques à (Gram-) et (Gram+) et champignon.

En ce qui concerne l'extrait sécher au séchoir l'activité varie entre nulle, faible a moyenne activité.



**Figure 40 :** Effet de l'extrait sécher au séchoir sur les souches cliniques à (Gram-) et (Gram+) et champignon.

Alors que l'extrait sécher à l'air libre n'a donner que des nulles à faibles activités.



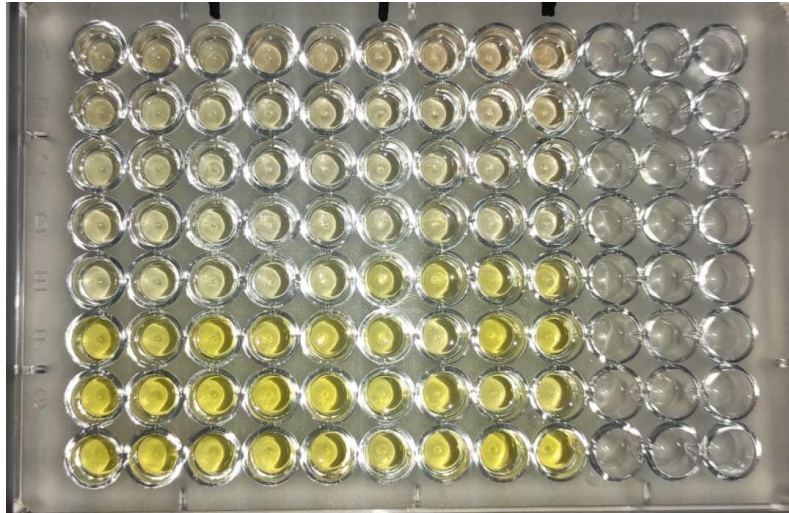
**Figure 41 :** Effet de l'extrait sécher à l'air libre sur les souches cliniques à (Gram-) et (Gram+) et champignon.

Les résultats obtenus par *Gosset-Erard et al., 2021* indiquent une activité antimicrobienne significative avec des diamètres de zones d'inhibitions allant jusqu'à 20mm supérieure que celles obtenus dans cette étude. Cependant les résultats obtenus par *Ibrahim et al., 2021* sont presque similaires avec nos résultats.

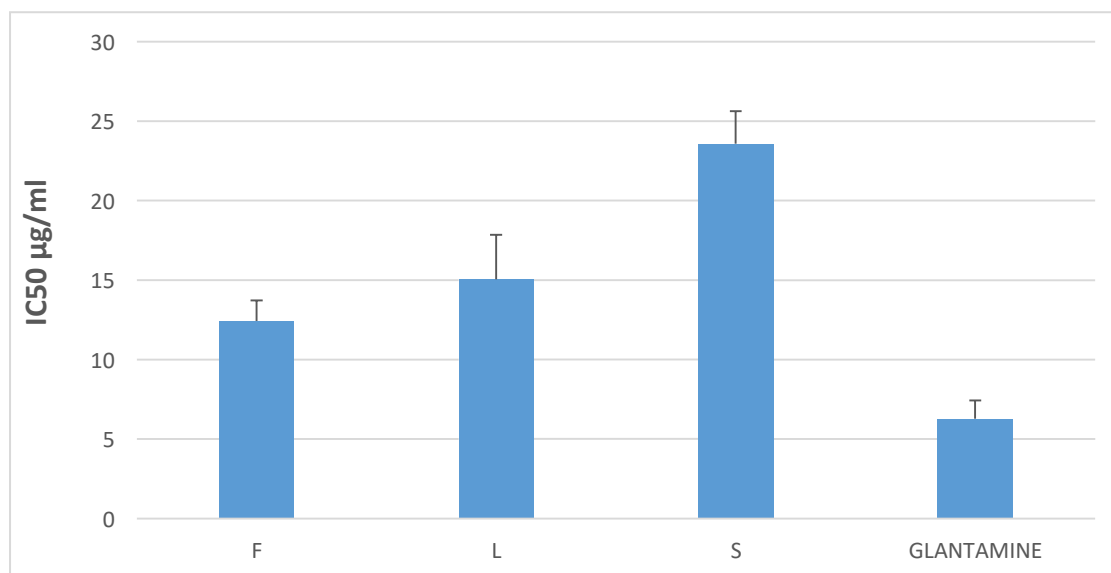
A savoir que les expériences sont réalisées dans des conditions différentes.

## 2.4 Activité enzymatique de la butyrylcholinestérase

La butyrylcholinestérase BchE est la principale enzyme responsable de l'hydrolyse de l'acétylcholine (Ach), réduisant ainsi les niveaux d'acétylcholine nécessaire à la neurotransmission et provoquant des troubles neurodégénératifs, notamment la maladie de l'alzheimer. Les résultats obtenus sont consignés dans la figure 42 :



**Figure 42 :** Plaque de dosage de l'activité enzymatique (butyrylcholinestérase) des extraits des feuilles de *Lawsonia Inermis* (F,L,S).



**Figure 43 :** Représentation d'IC50 de l'activité enzymatique.

D'après le graphe si dessus on observe les valeurs d'inhibition de l'BchE (IC50) des extraits des feuilles de *Lawsonia Inermis* sont de l'ordre de (12,44±1,28 µg/ml)(F), (15,06±2,80µg/ml)(L) et (23,57±2,05µg/ml)(S) respectivement.

Les extraits de la plante *lawsonia inermis* sécher au séchoir ont montré une bonne inhibition sur la BchE avec une IC50 de  $(23,57 \pm 2,05 \mu\text{g/ml})$  qui est trois fois supérieure par rapport au standard Glantamine  $(6,27 \pm 1,15 \mu\text{g/ml})$ , suivi par l'extrait sécher au séchoir  $(15,06 \mu\text{g/ml} \pm 2,80)$  et l'extrait sécher à l'air libre  $(12,44 \pm 1,28 \mu\text{g/ml})$ .

En effet les travaux de *Balaei-Kahnamoei et al., 2021* menés sur la même plante montre une absence de l'activité enzymatique BchE. Bien les travaux menés sur les activités anticholinestérase de cette plante soient variées, on peut conclure qu'elle a un stress oxydatif et qu'elle a un effet sur certaines maladies liées au système nerveux.

### 1.5 Détermination du contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes

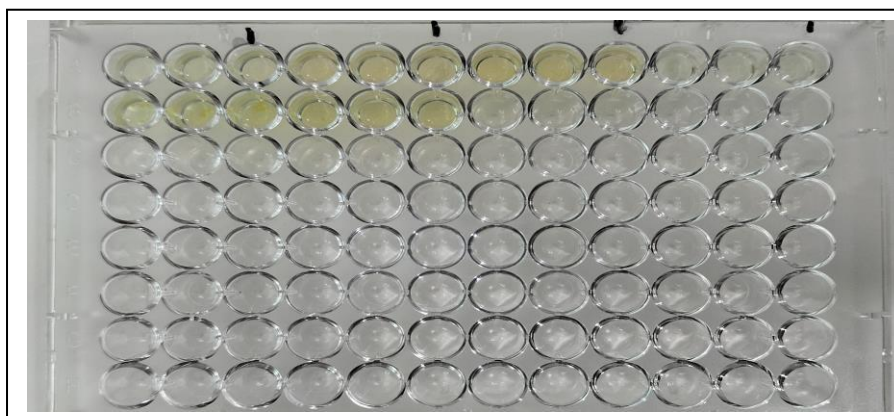
Le tableau 9 si dessous montre les résultats obtenus des teneurs totales des polyphénols et flavonoïdes des trois extraits de *Lawsonia Inermis*. L'extrait sécher au séchoir a une bonne quantité de polyphénol et flavonoïde qui est deux fois supérieure à celle présenter par l'extrait à l'état frais et l'extrait sécher à l'état libre.

**Tableau 9 :** Le contenu total en polyphénols et la teneur des flavonoïdes des extraits.

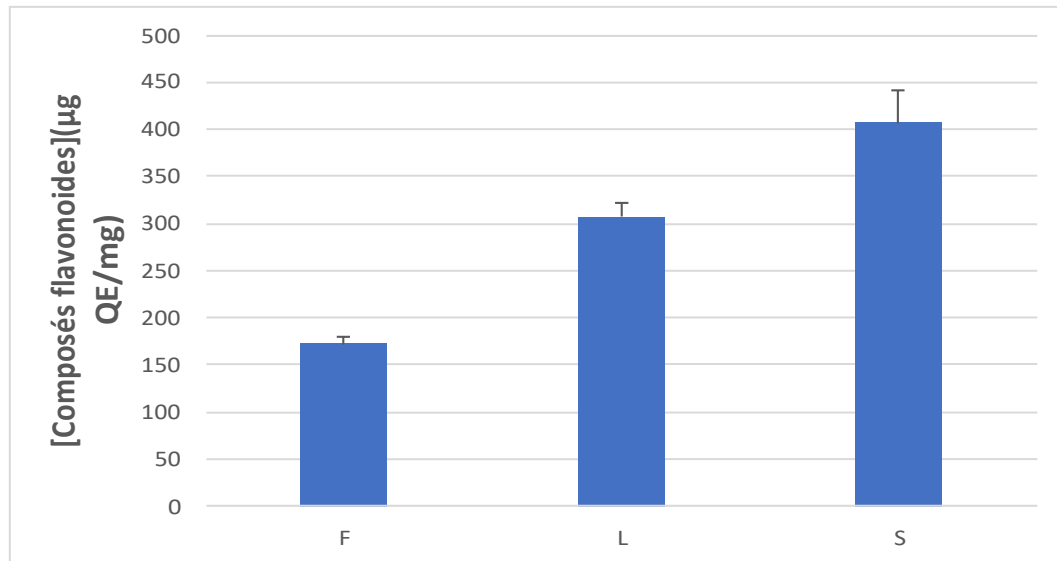
| Extraits de <i>Lawsonia Inermis</i> | Teneur totale en composés phénoliques ( $\mu\text{g GAE/mg}$ ) | Totale des flavonoïdes ( $\mu\text{g QE/mg}$ ) |
|-------------------------------------|--|--|
| F                                   | $429,77 \pm 22,76$   | $171,56 \pm 8,88$                              |
| L                                   | $617,72 \pm 5,56$  | $307,46 \pm 15,39$                             |
| S                                   | $867,82 \pm 6,39$  | $407,46 \pm 33,53$                             |

#### Les résultats des flavonoïdes

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent de la quercétine par mg de poids sec de l'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg}$ ).



**Figure 44 :** Plaque de dosage des flavonoïdes des extraits *Lawsonia inermis*.



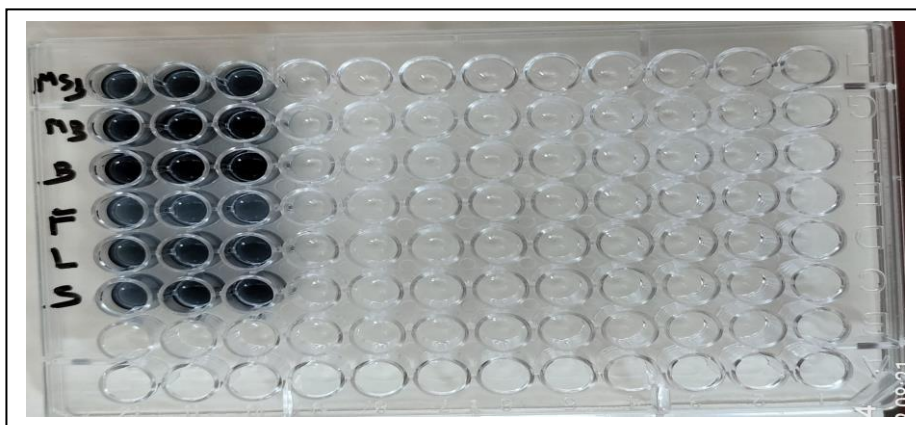
**Figure 45 :** Représentation de dosage des flavonoïdes.

L'étude réalisé par (Mahboubi et al., 2015) montre que l'estimation quantitative des composées flavonoïdes est de (1100μg de QE/mg jusqu'à 3800μg de QE/mg), comparant avec nos propres résultats qui vont de (171μg de QE/mg jusqu'à 407,46 μg de QE/mg), leurs résultats sont supérieurs que les nôtres.

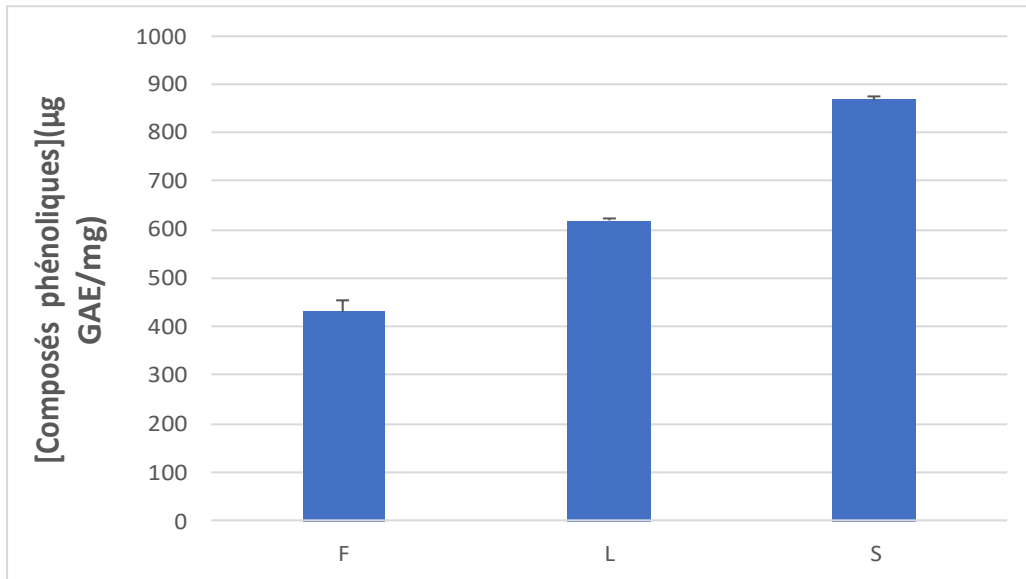
Par contre les résultats obtenus par (BEKIR et al., 2013) sont (0,295 μg de QE/mg) inférieure que les nôtres, ce qui montre que les extraits de *lawsonia inermis* sont riches en composés flavonoïdes.

### Résultats des polyphénols

Les polyphénols ont une capacité importante a piégé les radicaux libres par transfert multiple d'atome H, et de certains de ses produits d'oxydation comme la quercétine. (Moridani et al., 2003).



**Figure 46 :** Plaque de dosage des polyphénols des extraits (F,L,S) de *Lawsonia Inermis*.



**Figure 47 :** Représentation de dosage des polyphénols.

L'étude réalisé par (*Mahboubi et al., 2015*) montre que l'estimation quantitative des composées phénoliques est de (3800μg de QE/mg jusqu'à 18100μg de QE/mg), nos propres résultats obtenus vont de (429,77μg de GAE /mg jusqu'à 867,82μg de GAE/mg), ce qui montre que leurs résultats sont très élevés par rapport a les nôtres.

Par contre les résultats obtenus par (*BEKIR et al., 2013*) sont (1,3309μg de QE/mg) inférieure que les nôtres, ce qui montre que les extraits de *lawsonia inermis* sont riches en composés phénoliques.





# Conclusion

### Conclusion

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine pour l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique a connu un regain d'intérêt durant ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité, en propriétés biologiques, est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives, synthétisées par la plante.

Une étude des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, enzymatiques, dosage des polyphénols et des flavonoïdes a concerné une plante appartenant à la famille des lythracées, employée en Algérie dans la région de Béchar.

Le potentiel anti-radicalaire des extraits a été déterminé par la méthode de DPPH et ABTS dont les résultats ont montré que ces extraits possèdent une activité moyenne, donc cette plante contient des molécules qui sont considérées comme des agents antioxydants qui peuvent être employées pour des applications thérapeutiques, sachant que les antioxydants contribuent de manière très efficace à la prévention des maladies telles que le cancer, les maladies cardiovasculaire et neurologique.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antimicrobien vis-à-vis de trois bactéries et un champignon, l'évaluation antimicrobienne montre que les extraits de *L. Inermis* ont une action moyenne sur les bactéries testées et le champignon.

D'autres par l'extrait des feuilles sécher au séchoir révèle une activité la plus élevée contre l'enzyme butyrylcholinestérase de manière significative avec une valeur d'IC50 ( $23,57 \pm 2,05 \mu\text{g/ml}$ ). Concernant les teneur en composés phénoliques et en composés flavonoïdes les analyses quantitatives ont mentorés des teneurs plus élevées en composé phénoliques ( $429,77 \pm 22,76 \mu\text{g GAE/mg}$ )(F), ( $617,72 \pm 5,56 \mu\text{g GAE/mg}$ )(L), ( $867,82 \pm 6,39 \mu\text{g GAE/mg}$ )(S) et en composés flavonoïdes ( $171,56 \pm 8,88 \mu\text{g QE/mg}$ )(F), ( $307,46 \pm 15,39 \mu\text{g QE/mg}$ )(L), ( $407,46 \pm 33,53 \mu\text{g QE/mg}$ )(S).

En effet, les différences de nos résultats par rapport aux résultats trouvés dans la bibliographie sont dû probablement à l'origine de la plante, la méthode d'extraction, macération, la méthode de dosage, ou les interactions des molécules entres elles-mêmes.

Sachant que notre pays possède une biodiversité immense dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important de métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques particulières qui demandent d'être exploitées par les recherches, et comme perspectives on propose de :

- Faire une étude biochimique sur les fruits de *L.Inermis*.
- Déterminer de nouvelles substances bioactives naturelles pourra répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- Développer des médicaments antiradicalaires à base de plantes, doués d'une activité antioxydante.



# **Références Bibliographiques**

### A

- ABDERRAZAK. M, JOËL. R., 2007., La botanique de A à Z. Ed., Dunod. Paris., pp. 177.

### B

- Balaei-Kahnamoei M. Saeedi M. Rastergari A. ARDEKANI M. Akbarzadeh T. Khanavi M. EVIDENCE –BASED COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDECINE. Hindawi .2021.
- Balentine C.W., Crandall P.G., O’Bryan C.A., Duong D.Q. and Pohlman F.W. (2006). The preand post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73, 413-421.
- BEKIR JALILA.MOHAMED MARS. PATRICIA VICENDO. AMIRA FTERRICHJALLOL BOUAJILA. JORNAL DES ALI ; ENTS MEDICINAUX 16(6),544-550,2013
- BENAYACHE F., 2005- Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d’espèces du Genre *Genista* (Fabaceae) : *G. saharae*, *G. ferox*. Thèse de Doctorat en chimie organiques. Université Mentouri-Constantine. Algérie. 199 p.
- Bendif H. 2017. Caractérisation phytochimique et détermination des activités biologiques *in vitro* des extraits actifs de quelques lamiaceae: *ajuga iva* (l.) schreb., *teucrium polium* l., *thymus munbyanus* subsp. *Coloratus* (boiss. & reut.) Machado P. S. and Cheynier V.2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Paris.398 p.Thèse de doctorat, Ecole normale
- BENSLAMA A., 2016. Substances d’origine végétale. Université Mohamed Khider-Biskra, Alger.  
Supérieure de kouba-Alger, 154 p.
- BHATS S.V., NAGASAMPIGIB B.A., SIVAKUMAR S.M., 2005- chemistry of natural products. Ed. narosa, Springer, Verlag Berlin Heidelberg. USA. 840 p.
- Biaye M. (2002). Action pharmacologique des tanins.These de doctorat spécialité pharmacie,université de Dakar. 53p
- Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, 4617 (181): 1119-1200.

- Bruneton J. 1996. Plantes toxiques, Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, 3<sup>ème</sup> édition, Lavoisier, Paris. 632 p.
- BRUNETON J., 1999. Pharmacognosie phytochimie plante médicinales. Édition N 3 : Tec et Doc, Paris, 1120p.
- Bruneton. J. (1999). Eléments de phytochimie, Pharmacognosie et Plantes médicinales. Paris : ed. Tec & doc-Lavoisier ; 1999. P 1120.
- Bruneton J., (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, 4<sup>e</sup> éd., revue et augmentée, Éditions médicales internationales, Tec & Doc, Paris, France.
- Burkill, 1995: The useful plants of West Tropical Africa. 2nd Edition. Volume 3, P 3.

### C

- Catherine Cartwright-Jones Ph, 2015: Ancient Sunrise® Henna for Hair,” Chapter 13, Henna and Your Health, Copyright © 2015, D, TapDancing Lizard LLC.
- Collin S and Crouzet J. 2011. Polyphénols et procédés. Lavoisier, Paris. 336p
- COMHAIR S.A. et ERZURUM S.C., 2002. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. Am J Physiol lung cell mol physiol, 283(2): 246-255.
- CONNOLLY JD., HILL RA., 1992- dictionnaire of terpenoids. Ed. Chapman and Hall. CRC Press, New York. USA. 2156p.
- COWAN N. M., 1999- Plant products as anti-microbial agents. Clinical microbiology Reviews. Vol. 12(4): 564-582.

### D

- Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, 2003, p. 317
- Delaveau. P (1985). Hénné : Act Pharmaceutique ; 128p : 67-68 pp.
- DJAHRA A.B., 2015. Cours Phytochimie II 2<sup>ème</sup> Année Master II, Université Echahid Hamma Lakhdar, El Oued, Alger.
- Didry N, Pinkas M, Dubreil L. (1968). Activité antibactérienne de naphthoquinones d'origine végétale. Ann. Pharmaceut. Franc. 44 : 73-78.
- DONATIEN K., 2008. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes - extraction, Identification d'alcaloïdes - caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse de Doctorat mention chimie organiques. Université Paul Verlaine de METZ – UPV-M. France. 150p. Metabolism and Trafficking. Annu Rev Plant Biol. Vol (59): 735 – 769.

- Dworkin MM and Falkow S. Proteobacteria: Gamma subclass. Ed. Springer, New York, NY, 2006, p. 1248.

### **E**

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherston, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Ernst E., (2000). Adverse effects of herbal drugs in dermatology. *British Journal of Dermatology* ; 143 : 923-929

### **F**

- Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, Karray-Bouraoui N, Trabelsi N, Boulaaba M and Abdely C. 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies* 331 : 372-379.
- Fattouch S., Caboni P., Coreneov., Tuberness C., Angioni A., Dessi S., Marzouki N., et Cabras P., (2007). Antimicrobial activity of Tunisian quince (*Cydonia Oblongamiller*) pulp and peel phenolic extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 963-969.
- Favier A. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'Actualité chimique* 2003 ; 108-117.
- Favier A. Stress oxydant et pathologies humaines. *Ann. Pharm. Fr.* 2006 ; 64 : 390-396.
- Forestier J.P. 1981. Un séné, *cassia obovata*, utilisé comme cosmétique : le henné neutre *International Journal of cosmetic science*, 3 : 211-226.
- Forestier J.P.; 2007. Henna. Sorption of lawsone by hair. *International Journal of cosmetic science*, 4: 153 – 174.

### **G**

- Gbolade A.A., 2009. Inventory of antidiabetic plants in selected districts of Lagos State, Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology* ; 121 : 135-139.
  - Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie* 4 : 162-169.
  - Ghedira KAMEL et Paul Goetz (2017). *Phytothérapie anti-infectieuse*.
  - GHESTERM. A, SEGUIN. E, PARIS. M, ORECCHIONI. A., 2001., *Le préparateur en Pharmacie.*, 2ème ed., Ed. Tec et Doc, Paris., France. 275.
  - Ghouti Oliveres C. *Journal de pédiatre et de puériculture* 19(7), 268-271, 2006.

- Gökmen V., Serpen A. and Fogliano V. (2009). Direct measurement of the total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends food science technology*, 20, 278-288.
- GONZÁLEZ A.G., BARRERA J.B., GARCÍA T.Z., ROSAS F.E., 1984- Sesquiterpene lactones from *Centaurea* species. *Phytochemistry*. Vol. 23(9) 2071–2072.
- GORHAM J., 1977- Lunularic acid and related compounds in liverworts, algae and hydrangea. *Phytochemistry*. Vol. (16):249-253.
- Gosset-Erard Clarisse, Minjie Zhao, Sonia Lordel-Madeleine, Said Ennahar (2021) *Food Chemistry* 352, 129396.
- Gupta S, Ali M, Alam MS, Sakae T, Niwa M. (1992). A new aliphatic hydrocarbon from *Lawsonia inermis* bark. *Indian Journal of Chemistry Section B Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*. 31:705-707.

### H

- HALIWELL B., 1994. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet*, 344 (8924): 721-724.
- Halliwell B. (1996). Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radical Research* 25, 1-32.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*.
- HARRAR A.E.N., 2012- Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Thèse de Magister Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie. 73 p
- HASLAM E., 1994- Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.* Vol. (11) : 41-66.
- HASLAM E., 1996. Natural polyphenole (végétale tannins) as drugs possible modes of action. *Journal of nationale production*, 59: 205-215.
- HELLAL Z., 2011- Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister en biologie, université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. Algérie. 78p



- Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* : 3-6.
- HERNANDEZ-OCHOA L.R., 2005- Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné (solvant/actif) d'origine végétale. Thèse de Doctorat. Institut national polytechniques, Toulouse. France. 255p.
- Herraouya (1862). Recherche pour servir à l'histoire naturelle et chimique, industrielle du Héné. Ed. Paris
- HESS M., 2002- Alkaloids, Nature's Curse or Blessing 1ère édition. Ed. Wiley-VCH, New York. USA. 297 p.
- HOSTETTMANN K., 1992- Les plantes sources de médicaments phlébotropes, la lettre de la phlébologie. Ed. Zyma SA, Nyon. Switzerland. 25p.
- HOULT J. R. S., PAYA M., 1996- Pharmacological and Biochemical actions of simple coumarine: Natural Products with Therapeutic potential. *Gen Pharmacol.* Vol (27): 711-722
- Huang D., Ou B. and Prior R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity

### **I**

- ISERIN P., MASSON M., RESTELLINI J P., 2007- Larousse des plantes médicinales. Identification, préparation, Soins. Ed. Larousse, Paris. France. 335 P

### **J**

- JARRIGE R., RUCKEBUSCH Y., DEMARQUILLY C., FARCE M. H., JOURNET M., 1995. Nutrition des ruminants domestique : ingestion et digestion. Quae, 921p.
- JUDD. W.S, CAMPBELL. C.S, KELLOGG. E.A, and STEVENS. P., 2002., Botanique Systématique : une perspective phylogénétique., Ed 1 DEBOECK., p : 84-336

### **K**

- KAMRA D.N., AGARWAL N., CHAUDHARY L.C., 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series.* Vol. (1293) : 156–163. GAZENGEL JM., ORECCHIONI AM., 2013- Le préparateur en pharmacie – Guide théorique et pratique. 2ème ed. Ed. Tec et Doc, Paris. France. 1443 p.

- KAZANDJIEVA J. TSANKOV N. *clinics in dermatology* 35(4), 375-382, 2007
- KHANBABAE K., REE T.R., 2001- Tannins: Classification and Defenition. *Journal of Royal Society of Chemistry*. Vol. (18): 641-649.
- Khare C.P., (2007). *Indian Medicinal Plants*. Springer Science +BusinessMedia, LLC
- KHENAKA K., 2011- Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin. Thèse de Magister En Microbiologie Appliquée. Université Mentouri- Constantine. Algérie. 81p.
- King A., and Young G. (1999). Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Jof the American dietetic association*. 99:213-218. (cited in Djemai Zoueglache S, 2008.
- Kluger N., Raison-Peyron N. et Guillot B., 2008. Tatouages temporaires au henné : des effets indésirables parfois graves. *Presse Med*, 37 :1138-1142.
- Kohen R. and Nyska A. Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Path.* 2002; 30: 620-650.
- Kok A. N., Ertekin M. V., Ertekin V. et Avci B., (2004). Henna (*Lawsonia Inermis* Linn.

### **L**

- Lamchahab F.Z. ? Guerrouj B., Benomar S., Ait Ourhroui M., Senouci K., Hassam B. et Benzekri L., 2011. Du henné d'un tatouage symbolique a une vraie dermatose. *Archives de pediatrie-Elsevier Masson SAS*, 18 : 653-656.
- .Lebert.(2005 ) : Lekarité et le Henné deux matières premières africaines à fort pouvoir culturel locale utilisé dans le cosmétique.p 101
- Lehucher-Michel M.P., Lesgards J.F., Delubac O., et al. (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *Presse Médicale*, 30, 1076-1081.
- Lemordant Denis, Forestier J.P.(1983). Commerce et henné. Identification, contrôle, fraudes, additifs. In : *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*, 30<sup>e</sup>année, bulletin n°3-4, Juillet-décembre. pp. 283-310
- Lemordant S, 1983 : Usages médicinaux traditionnels et propriétés pharmacologiques de *Lawsonia Inermis* L., Lythracées. *Journal d'Agriculture Traditionnelle et de Botanique Appliquée*, Pp 30-89.

- LEURENT., 2012., Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêts économique Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis et évaluation de leur activité antibactérienne., Mémoire de Magister., Univ de Constantine 1, 2- 5-41
- Luis-rios. Les huiles essentielles dans la conservation, la saveur et la sécurité des aliments (3-10,2016)

### M

- MACHEIX J.J., ANNIE S., CHRISTAN J.A., 2005. Les composés phénoliques des Végétaux : un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaire romondes, Paris,192p.
- Mahboubi A. ASGARPANAH J. Sadaghiyani P N. Faizi M. BMC MEDICINE COMPLEMENTAIRE ET ALTERNATIVE 15. (1) ,1-,2015
- Makhija IK., Dhananjaya DR., Kumar VS Devkar R., Khamar D., Manglani N., Chandakar S., 2011. Lawsonia inermis -from traditional use to scientific assessment. African Journal of pharmaceutical Sciences and Pharmacy, 2: 148-165.
- MAKKAR H.P.S. 2003- Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. Small Ruminant Research. Vol. (49): 241-256.
- Malekzadeh f ;1968. antimicrobial activity of lawsonia inermis L. applied microbiology.
- Manchado P. S. and Cheynier V.2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier, Paris.398 p.
- MANGAN J. L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. Nutr. Res. Rev. Vol. (1) : 209-231
- Marfak A. (2003). Radiolyse Gamma des Flavonoïdes. Etude de Leur Réactivité avec Les Radicaux issus des Alcools : Formation de depsides. Thèse de doctorat.Université de LIMOGES.
- Marouf A and Reynaud J. 2007. La botanique d'A à Z : 1662 définitions. Dunod, Paris. 352p.
- MATES J.M., PEREZ-GOMEZ C., NUNEZ DE CASTRO I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. Clinical Biochemistry, (32):595-603.

- MCCALLEY D.V., 2002- Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques, Review. Journal of Chromatography A. Vol (967): 1–19
- McCall M. R. et Frei B. 1999. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?" Free Radical Biology and Medicine 26 (7-8) : 1034-1053.
- MCSWEENEY C.S., PALMER B., MCNEILL D.M. and KRAUSE D.O., 2001- Microbial interaction with tannins: nutritional consequences for ruminants. Animal Feed Science and Technology. Vol. (91): 83-93.
- Meddour A., Yahia M., Benkiki1 N., Ayachi A. 2011. Étude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits d'un ensemble des parties de la fleur du *capparis spinosa L. Lebanese Science Journal* 14(1) :49-60.
- MEDJROUBI K., BENAYACHE F., BENAYACHE S., AKKAL S., KHALFALLAH N., ACLINOU P., 1997- Guaianolides From *Centaurea-Musimomum*. Phytochemistry. Vol. (45), 1449-1451.
- MOHAMMEDI., 2013- Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud-Ouest de l'Algérie. Thèse de Doctorat en Biologie. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. Algérie. 169 p.
- Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., V. Böhm V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. LWT - Food Science and Technology, 43: 992–999.
- Musa, K. H., Abdullah, A., & Al-Haiqi, A. (2016). Determination of DPPH free radical scavenging activity: Application of artificial neural networks

### **N**

- NKHILI E., 2009. Polyphenoles de l'alimentation : extraction, interaction avec les ions de fer et du cuivre, oxydation et pouvoir antioxydant. Thèse doctorat universités CADI AYYAD Semlalia-Marrakech.
- Novelli G. P. Role of free radicals in septic shock. *J. Physiol. Pharmacol.* 1997; 48: 517-527.

### **O**

- OMS (2007) : Rapport de l'atelier interregional de l'OMS. Sur l'utilisation de la médecine traditionnelle. Dans les soins de santé primaires. Oulan-Bator, Mongolie 23-26 août 2007

- Opara E.S. (2002). Oxidative stress, micronutriments, diabetes mellitus and its complications. *Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*, 122, 28-34.
- Oueida F. Non Date : Médecine arabe et ethnopharmacologie : les plantes du Coran. Des sources du savoir aux médicaments du future. From the sources of knowledge to the medicines of the future. Faculté de Pharmacie, Université Libanaise, CNRSL Beyrouth (Liban)

### P

- PANDEY KB et RIZVI SI., 2009- Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Vol. 2(5): 270 – 278.
- PARIS M., HURABIELLE., 1981- Abrégé de matière médicale. Pharmacognosie. Tome 1. .Ed. Masson, Paris. France. 339 p.
- Percival SL. *Microbiology of waterborne diseases*. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 2004, p. 480.

### R

- Rahmoun Mohamed. Nadjib. (2009). Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des produits dérivés de la LAWSONE. Thèse de doctorat. P 104.PP14
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26, 1231–1237.
- Rezaire A. 2012. Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa). Thèse de doctorat. Université des Antilles et de la Guyane, France, 193p.
- Ribéreau-Gayon, P. (1968). *Les Composés phénoliques des végétaux* : par Pascal Ribéreau-Gayon. Dunod.
- RIOS J.L., RECIO M C., 2005- Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol. (100) : 80-84
- RIRA M., 2006- Effet des polyphénols et des tanins sur l'activité métabolique du microbiote ruminal d'ovins. Thèse de Magister en biochimie et microbiologie appliquées, Université Mentouri Constantine, Algérie. 94 p.
- ROUX D. et CATIER O., 2007. *Botanique, pharmacognosie, phytothérapie*. Groupe Liaisons, France, 141p.

- RUFINI L., SAMPAOLO G., 1977- Plants Off. Aromi. Saponi., Cosmétol. Aerosol. Vol. )59:(9-75.1977.

### S

- Sagdic O., Kuscü A., Özcan M. and Özcelik S. (2002). Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*, 19, 473-480.
- Sauriasari R., Wang D.H., Takemura Y., Tsutsui K., Masuoka N., Sano K., Horita M., Wang B.L. et Ogino K.2007. Cytotoxicity of lawsone and cytoprotective activity of antioxidants in catalase mutant *Escherichia coli*. *Toxicology*; 235 :103-111.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*.
- SEAMAN FC., 1982-Sesquiterpenes lactones as taxonomic characters in asteraceae. In the botanical review. Botanical garden. Vol. (48): 121-594.
- SEENIVASAN P., 2006- In vitro antibacterial activity of som plant essential oils. *Jornal of complementary and alternative medicine*. Vol. (9): 6-39.
- Serpen A., Capuano E., Fogliano V., Gökmen V. (2007). A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components. *Journal of Agricultural and*.
- SEYOUM. A, ASRES. K, ELFIKY F.K., 2006., Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids., *Phytochemistry.*, 67, 2058–2070.
- Shan B., Cai Y.Z., Brooks G.D. and Cokk H. (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary spiece and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Chemistry*, 117,112-119.
- Sharma V. K. (1990). Tuberculostatic activity of henna (*Lawsonia Inermis* Linn).71: 293295.henna remedy for candida yeast infections. Article in candida hub review. The Best Natural Henna Yeast Infection Cure
- Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessaraki M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* : 1-26.
- Singleton V.L and Rossi J.A.J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58.

- Sohal R. S., Mockett R. J. and Orr W. C. Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biol. Med.* 2002; 33: 575-586.
- Steer L. et Goudet M., 2004. Les plantes aromatiques, médicinales et tinctoriales, un atout pour le développement rural de la région de Tata-Etudes thématiques en vue du développement des oasis de la région de Tata (Maroc). CNEARC-Montpellier, 46 p.
- STÖCKIGT J., SHELUDKO Y., UNGER M., GERASIMENKO I., WARZECHA H., STÖCKIGT D., 2002- High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic–electrospray ionisation mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups Review. *Journal of Chromatography A*. Vol (967): 85–113.

### T

- Talaat S. M. et Hauke M. E., 1961. The Biochemistry and Physiology Of Henna (*Lawsonia Alba*): Its Use as A Remedy for Intestinal Amoebiasis. *Transactions of the royal society of Tropical medicine and hygiene*. 55: 56-62.
- Tauzin. A (1998) ; Le Héné, art des femmes de Mauritanie. Ed Unesco ibis presse ; 7-13 Talaat S

### V

- Van Delden C. and Iglewski B. H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4: 551-560.
- Villaño D., Fernández-Pachón M.S., Moyá M.L., Troncoso A.M. et García-Parrilla M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 71 : 230–235.

### W

- Wang L., Yen J-H., Liang H-L. and Wu M-J. (2003). Antioxidant Effect of Methanol from Lotus Plumule and Blossom (*Nelumbo nucifera* Gertn.). *Journal of Food and Drug Extracts Analysis*, 11(1), 60-66.
- Wichtl M., 1999. Plante thérapeutiques : Tradition, pratique officinale. Science et thérapeutique 3<sup>ème</sup> édition. Edition française par Robert Anton. Technique et documentation, 262-264

### Y

- Yogisha S., Samiulla S. D., Prashanth D., Padmaja R., Amit A., (2002). Trypsin inhibitory activity of *Lawsonia inermis*. *Filoterapia* ; 73 : 690-691.

- YU F.N.A., UTSUMI R., 2009- Diversity, regulation, and genetic manipulation of plant mono-and sesquiterpenoid biosynthesis. *Cell. mol. Life sci.* Vol. (66): 3043-3052
- YOUNG A.J., Phillip D., Savill J., 1997- Carotenoids in higher plant photosynthesis. Ed. M. Pessaraki, *Handbook of Photosynthesis*, Marcel Dekker Inc, New York. USA. Pp 575–596.

### **Z**

- Zhang W.J. and Bjorn L.O. (2009). The effect of ultraviolet radiation on the accumulation of medicinal compounds in plants. *Fitoterapia*, 80, 207-218.
- ZIEGLER J., FACCHINI P.J., 2008- Alkaloid Biosynthesis:
- ZENK. M.H, JUENGER. M., 2007., Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds., *Phytochemistry Review* 68, 2757 – 2772.





# **Annexes**

**Tableau 10 :** Valeurs de CI50 test DPPH pour les extraits bruts de Lawsonia Inermis.

| Extrait                   | % Activité inhibitrice DPPH |            |            |            |            |            |             |                        |
|---------------------------|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------------------|
|                           | 12.5 µg                     | 25 µg      | 50 µg      | 100 µg     | 200 µg     | 400 µg     | 800 µg      | IC <sub>50</sub> µg/mL |
| F                         | -0,81±4,99                  | 6,71±7,81  | 3,1±20,14  | 0,37±38,97 | 0,15±57,61 | 2,05±72,28 | 53.03±11,63 | 173,90±2,07            |
| L                         | 1,41±19,90                  | 1,17±34,27 | 1,75±51,76 | 1,40±65,02 | 0,75±72,86 | 0,81±75,05 | 0,17±65,99  | 46,93±1,83             |
| S                         | 2,23±32,42                  | 1,49±29,20 | 1,02±45,48 | 0,89±59,12 | 0,22±73,49 | 0,47±74,52 | 3,32±94,67  | 64,79±1,65             |
| BHA <sup>b</sup>          | 76,55±0,48                  | 79,89±0,26 | 81,73±0,10 | 84,18±0,10 | 87,13±0,17 | 89,36±0,19 | 90,14±0,00  | 6.14±0.41              |
| BHT <sup>b</sup>          | 49,09±0,76                  | 72,63±2,06 | 88,73±0,89 | 94,00±0,31 | 94,97±0,08 | 95,38±0,41 | 95,02±0,23  | 12,99±0,41             |
| α-Tocopherol <sup>b</sup> | 37,21±1,82                  | 81,53±1,51 | 89,23±0,12 | 89,38±0,19 | 89,45±0,22 | 89,99±0,23 | 89,52±0,33  | 13,02±5,17             |

**Tableau 11 :** Valeurs de CI50 test ABTS pour les extraits bruts de Lawsonia Inermis.

| Extrait | % Activité inhibitrice ABTS |             |            |            |            |            |            |            |            |
|---------|-----------------------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|         | 1.5625                      | 3.125       | 6.25       | 12.5       | 25         | 50         | 100        | 200        | IC50       |
| F       | Saturation                  | Saturation  | Saturation | 36.36±391  | 62.12±1.99 | 83.44±3.80 | 92.01±0.19 | Saturation | 20.23±2.56 |
| L       | 17.86±1.91                  | 31.00±1.78  | 49.79±0.80 | 77.84±7.91 | 92.96±0.33 | Saturation | Saturation | Saturation | 6.76±0.53  |
| S       | 26.81±4.22                  | 43.10±10.81 | 56.90±3.28 | 87.34±0.86 | 92.29±0.29 | Saturation | Saturation | Saturation | 5.34±0.28  |
| BHA     | Saturation                  | Saturation  | Saturation | 92.83±1.42 | 94.68±2.42 | 94.95±0.90 | 95.32±0.25 | 95.59±0.47 | 1.81±0.10  |
| BHT     | Saturation                  | Saturation  | Saturation | 69.21±0.40 | 78.23±1.34 | 88.12±1.28 | 88.76±3.07 | 90.85±1.74 | 1.29±0.30  |

**Tableau 12:** Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase.

| Extraits      | % Activité inhibitrice butyrylcholinestérase |              |              |              |              |              |              |                        |
|---------------|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|
|               | 3.125 µg                                     | 6.25 µg      | 12.5 µg      | 25 µg        | 50 µg        | 100 µg       | 200 µg       | IC <sub>50</sub> µg/mL |
| F             | 34.34±12.4<br>3                              | 22.97±10.04  | 69.01±2.47   | 70.46±6.57   | 78.37±6.64   | Saturation   | Saturation   | 12.44±1.28             |
| L             | 9.92±18.27                                   | 1.78±7.03    | 51.06±29.99  | 83.39±3.76   | 89.41±2.60   | 89.52±3.68   | Saturation   | 15.06±2.80             |
| S             | 9.92±14.71                                   | 5.57±30.32   | 12.37±1.00   | 79.26±10.73  | 88.29±1.00   | 105.57±22.39 | Saturation   | 23.57±2.05             |
| Galantamin eb | 35,93±2,28                                   | 43,77 ± 0.00 | 68,50 ± 0,31 | 80,69 ± 0,41 | 85,78 ± 1,63 | 91,80 ± 0,20 | 94,77 ± 0,34 | 6.27±1.15              |



# Résumé

## ملخص

حظي استخدام النباتات الطبية في المجالات الصيدلانية والغذائية والتكنولوجيا الحيوية باهتمام كبير في البحث عن الجزيئات النشطة بيولوجيًا التي تعتبر المستقلبات الثانوية في أصل العديد من الأنشطة البيولوجية. يتكون هذا العمل الحالي من تقييم ، في المختبر ، الأنشطة المضادة للأكسدة والأنزيمية من لاوسونيا *Inermis* من منطقة بشار. تم اختبار ثلاث عينات: يترك طازجة ، يترك مجففة في الهواء ، ويترك مجفف في الفرن. يتم تحديد محتوى البوليفينول والفلافونويد بطرق قياس الطيف.

تمت دراسة النشاط المضاد للميكروبات في نبات اللوسونيا الداخلي ضد العزلات السريرية لثلاث بكتيريا *Fusarium oxysporium*، *Staphylococcus aureus* و *Esherichia coli* و *Pseudomonas aeruginosa* و *Ganoderma lucidum*.

أظهرت النتائج المتحصل عليها في هذه الدراسة أن المستخلصات الإيثانولية الثلاثة للأوراق في حالة نضرة ، والأوراق المجففة في الهواء الطلق والأوراق المجففة في المجفف لها عائد من: 11.64% - 13.92% - 44%. طورت المستخلصات الإيثانولية الثلاثة بعض الأنشطة ، ويعطي النشاط المضاد للأكسدة DPPH نتائج IC50 للأوراق الطازجة (F) والأوراق المجففة بالهواء (L) والمجففة بالفرن (S) بالترتيب التالي: (173.90 ± 2.07 ميكروغرام / مل) ، (46.93 ± 1.83 ميكروغرام / مل) و (64.79 ± 1.65 ميكروغرام / مل) ، وكذلك نشاط مضادات الأكسدة ABTS (20.23 ± 2.56 ميكروغرام / مل (F) ، (6.76 ± 0.53 ميكروغرام / مل (L) ، (5.34 ± 0.28 ميكروغرام / مل (S)). قيم تثبيط إنزيم بوتيل كولينستراز (IC50) لمستخلص أوراق نبات *Lawsonia Inermis* هي من (12.44 ± 1.28 ميكروغرام / مل (F) ، (2.80 ± 15.06 ميكروغرام / مل (L) و (23.57 ± 2.05 ميكروغرام / مل (S) على التوالي.

محتوى البوليفينول من الترتيب: (429.77 ± 22.76 ميكروغرام / مل GAE (F) ، (5.56 ± 617.72) ميكروغرام / مل GAE (L) ، (6 ± 867.82) ، (39 ميكروغرام / مل (S)). محتوى الفلافونويد: (8.88 ± 171.56 ميكروغرام / مل QE (F) ، (15.39 ± 307.46) ميكروغرام / مل QE (L) (33.5 ± 407.46) (S) ملغ / ميكروغرام QE ملغ (S) )

يلخص بحثنا حالة العمل على الجزيئات المستهدفة المضادة للأكسدة من أوراق نبات *Lawsonia Inermis*. يمكن أن تشكل الأخيرة قاعدة بيانات مفيدة في مجال البحث عن جزيئات نشطة بيولوجيًا جديدة.

نشاط مضاد : *Lawsonia Inermis* - DPPH - ABTS - Butyrylcholinesterase -الكلمات المفتاحية للميكروبات

**Résumé**

L'utilisation des plantes médicinales dans les domaines pharmaceutiques, agroalimentaires et biotechnologiques a reçu un grand intérêt dans la recherche des molécules bioactives qui sont les métabolites secondaires à l'origine de plusieurs activités biologiques.

Ce présent travail consiste à évaluer, in vitro les activités antioxydantes et enzymatiques de *Lawsonia Inermis* provenant de la région de Bechar. Trois échantillons sont testés :

Feuilles à l'état frais, feuilles sécher à l'air libre et feuilles sécher au séchoir.

La teneur en polyphénols et en flavonoïdes est dosée par des méthodes spectrométriques.

L'activité antimicrobienne de *Lawsonia Inermis* est étudiée contre des isolats cliniques de trois bactéries *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* et la moisissure *Fusarium oxysporium*.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que nos trois extraits éthanoliques des feuilles à l'état frais, feuilles sécher à l'air libre et feuilles sécher au séchoir ont un rendement de l'ordre de : 11,64% - 13,92% - 44%.

Les trois extraits éthanoliques ont développés quelques activités, l'activité antioxydantes DPPH donne des résultats d'IC50 des feuilles à l'état frais(F) et les feuilles sécher à l'air libre(L) et sécher au séchoir (S) par l'ordre suivant : (173,90±2,07µg/ml), (46,93±1,83µg/ml) et (64,79±1,65µg/ml), ainsi que l'activité antioxydante ABTS (20.23±2,56 µg/ml)(F), (6.76±0.53µg/ml)(L), (5.34±0.28µg/ml)(S).

Les valeurs d'inhibition de l'enzyme Butyrylcholinestérase (IC50) des extraits des feuilles de *Lawsonia Inermis* sont de l'ordre de (12,44±1,28µg/ml) (F), (15,06±2,80µg/ml) (L)et(23,57±2,05µg/ml) (S) respectivement.

La teneur en polyphénols est de l'ordre de : (429,77±22,76µg GAE/mg) (F), (617,72±5,56µg GAE/mg) (L), (867,82±6,39µg GAE/mg) (S).

La teneur en flavonoïdes : (171,56±8,88 µg QE/mg) (F), (307,46±15,39 µg QE/mg) (L) (407,46±33,5 µg QE/mg) (S).

Notre recherche résume l'état des travaux sur les molécules cibles antioxydantes issues des feuilles de *Lawsonia Inermis*. Cette dernière pourrait constituée une base de données utile dans le domaine de la recherche de nouvelles molécules bioactives.

**Mots clés: *Lawsonia Inermis* – DPPH – ABTS – butyrylcholinestérase – Activité antimicrobienne.**

**ABSTRACT**

The use of medicinal plants in the pharmaceutical, food and biotechnology fields has received great interest in the search for bioactive molecules which are the secondary metabolites at the origin of several biological activities.

This present work consists in evaluating, *in vitro*, the antioxidant and enzymatic activities of *Lawsonia Inermis* from the Bechar region. Three samples are tested:

Leaves fresh, leaves air-dried, and leaves kiln-dried.

The content of polyphenols and flavonoids is determined by spectrometric methods.

The antimicrobial activity of *Lawsonia Inermis* is studied against clinical isolates of three bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and the mold *Fusarium oxysporium*.

The results obtained in this study showed that our three ethanolic extracts of the leaves in the fresh state, leaves dried in the open air and leaves dried in the dryer have a yield of the order of: 11.64% - 13.92 % - 44%.

The three ethanolic extracts developed some activities, the DPPH antioxidant activity gives IC<sub>50</sub> results of the fresh leaves (F) and the leaves air-dried (L) and kiln-dried (S) by the following order : (173.90±2.07µg/ml), (46.93±1.83µg/ml) and (64.79±1.65µg/ml), as well as the antioxidant activity ABTS (20.23 ±2.56µg/ml)(F), (6.76±0.53µg/ml)(L), (5.34±0.28µg/ml)(S).

The inhibition values of the enzyme butyrylcholinesterase (IC<sub>50</sub>) of the extracts of the leaves of *Lawsonia Inermis* are of the order of (12.44±1.28µg/ml) (F), (15.06±2.80µg/ml) (L) and (23.57±2.05µg/ml) (S) respectively.

The polyphenol content is of the order of: (429.77±22.76µg GAE/mg) (F), (617.72±5.56µg GAE/mg) (L), (867.82±6, 39µg GAE/mg) (S).

Flavonoid content: (171.56±8.88 µg QE/mg) (F), (307.46±15.39 µg QE/mg) (L) (407.46±33.5 µg QE/mg) (S).

Our research summarizes the state of work on antioxidant target molecules from the leaves of *Lawsonia Inermis*. The latter could constitute a useful database in the field of the search for new bioactive molecules.

**Keywords: *Lawsonia Inermis* – DPPH – ABTS – Butyrylcholinesterase – Antimicrobial**

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : Boulbaroud khaoula feriel  
Baadeche Radhia

## Etude phytochimique des activités biologiques de *Lawsonia Inermis*.

### Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

#### Résumé

L'utilisation des plantes médicinales dans les domaines pharmaceutiques, agroalimentaires et biotechnologiques a reçu un grand intérêt dans la recherche des molécules bioactives qui sont les métabolites secondaires à l'origine de plusieurs activités biologiques.

Ce présent travail consiste à évaluer, in vitro les activités antioxydantes et enzymatiques de *Lawsonia Inermis* provenant de la région de Bechar. Trois échantillons sont testés : Feuilles à l'état frais, feuilles sécher à l'air libre et feuilles sécher au séchoir.

La teneur en polyphénols et en flavonoïdes est dosée par des méthodes spectrométriques.

L'activité antimicrobienne de *Lawsonia Inermis* est étudiée contre des isolats cliniques de trois bactéries *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et la moisissure *Fusarium oxysporium*.

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que nos trois extraits éthanoliques des feuilles à l'état frais, feuilles sécher à l'air libre et feuilles sécher au séchoir ont un rendement de l'ordre de : 11,64% - 13,92% - 44%.

Les trois extraits éthanoliques ont développés quelques activités, l'activité antioxydantes DPPH donne des résultats d'IC50 des feuilles à l'état frais(F) et les feuilles sécher à l'air libre(L) et sécher au séchoir (S) par l'ordre suivant : (173,90±2,07µg/ml), (46,93±1,83µg/ml) et (64,79±1,65µg/ml), ainsi que l'activité antioxydante ABTS (20.23±2,56 µg/ml)(F), (6.76±0.53µg/ml)(L), (5.34±0.28µg/ml)(S).

Les valeurs d'inhibition de l'enzyme butyrylcholinestérase (IC50) des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* sont de l'ordre de (12,44±1,28µg/ml) (F), (15,06±2,80µg/ml) (L)et(23,57±2,05µg/ml) (S) respectivement.

La teneur en polyphénols est de l'ordre de : (429,77±22,76µg GAE/mg) (F), (617,72±5,56µg GAE/mg) (L), (867,82±6,39µg GAE/mg) (S).

La teneur en flavonoïdes : (171,56±8,88 µg QE/mg) (F), (307,46±15,39 µg QE/mg) (L) (407,46±33,5 µg QE/mg) (S).

Notre recherche résume l'état des travaux sur les molécules cibles antioxydantes issues des feuilles de *Lawsonia inermis*.

Cette dernière pourrait constituée une base de données utile dans le domaine de la recherche de nouvelles molécules bioactives.

**Mots-clés :** *Lawsonia Inermis* – DPPH – ABTS – Butyrylcholinestérase – Activité antimicrobienne.

#### Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Biochimie (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Laboratoire du centre de recherche en biotechnologie (CRBT)

**Encadreur :** Mme. Bennamoun L. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 1 :** Mme. Dakhmouche S. (MCA – ENS Constantine Assia Djebar université 3).

**Examineur 2 :** Mme Klibet F. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).