

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent



Institut des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en science biologique

Option : Biochimie

Présenté par : - Mlle Soussi Chahinez

- Mme Bensafi Besma

Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits des feuilles de Henné « *Lawsonia inermis* »

Soutenu le : 25/06/2019

Devant le jury composé de :

Présidente :	Mme BRIXI GORMAT N	MCB au CUBBAT
Examineur :	M SEGHIR A	MCA au CUBBAT
Encadreur :	Mme BENTABET N	MCB au CUBBAT

Année universitaire : 2018-2019

Remerciements

En premier lieu, nous remercions notre bon Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience pour la réalisation de ce travail.

Nous exprimons tout d'abord nos profonds remerciements à **Mme Bentabet-Lasgaa Nesrine**, maitre de conférence classe B, au centre universitaire d'Ain Témouchent pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. Sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle nous a accordé, nous ont permis de réaliser ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre présidente de jury **Mme Brixi Gormat N**, maitre de conférence classe B, au centre universitaire Belhadj Bouchaib, d'avoir accepté de juger notre travail. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde sympathie.

Nos remerciements vont également à **M Seghir A**, maitre de conférence classe A au centre universitaire Belhadj Bouchaib, pour l'intérêt qu'il a porté à notre travail en acceptant de l'examiner pour l'enrichir par ses propositions.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements et toute notre gratitude, à tous nos enseignants qui ont contribué à notre formation.

Aux personnels du laboratoire de biochimie du Centre universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain Témouchent pour leur aide, en particulier Mr **Mhamed Walid**, **Mme Meftahi Chokria**, **Mme Amraoui Bahria** et **Mr Rahmani Khaled**.

A tous nos ami(e)s.

A tous les étudiants de Master Biochimie de la promotion 2018/2019.

Enfin à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce modeste travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents pour les encouragements, la tendresse, l'affection et le soutien durant mes études : vous étiez toujours là pour m'écouter, me sourire, me réconforter et m'encourager dans les moments de doute... Je souhaite que vous trouviez ici le fruit de vos sacrifices. Que dieu vous bénisse et vous accorde une longue vie pleine de sante et de bonheur.

A mon frère Walid

A toute ma famille

A ma très chère binôme Bisma et sa famille

A tous mes professeurs

A mes amis : Bisma, Majda, Yousra, Kawther, Nacera, Moussa, Soumia, Kamilia, Amina, Sihem, Nacera et Wafaa.

A toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Chahinez.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chère parents, symboles de courage et de volonté, qui ont consacré et sacrifié leurs vie pour mon bien être ;

A mes très chers frères: Nassim et Ahmed ;

A mon mari : Réda ;

A toute ma famille : Bensafi et Sabri ;

A tous mes professeurs ;

A ma très chère binôme Chahinez et sa famille ;

A toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

Besma

Résumé :

Le **henné** « *Lawsonia inermis* » est un arbuste épineux de la famille des *Lythracées* pouvant atteindre 6 m de haut. Les différentes parties de cette plante sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter diverses affections telles que la polyarthrite rhumatoïde, les maux de tête, les ulcères, la diarrhée, la fièvre, le diabète et les maladies cardiaques.

La présente investigation est consacrée à l'étude phytochimique et l'évaluation du pouvoir antioxydant des différents extraits brut et spécifiques des tanins des feuilles de Henné. Trois techniques d'évaluation du pouvoir antioxydant ont été appliquées : Piégeage du radical DPPH, pouvoir réducteur du fer (FRAP) et le blanchissement du β -carotène.

Les extraits et les fractions de cette plante ont été soumis au criblage phytochimique par des méthodes standards qui ont révélé leur richesse en tannins, en flavonoïdes, en terpénoïdes, en alcaloïdes et en quinones libres.

La fraction d'acétate d'éthyle a montré une activité très élevée dans la technique de piégeage du radical DPPH avec une IC_{50} équivalent à $8,60 \cdot 10^{-6}$ mg/mL par rapport aux autres extraits testés. La même constatation pour la technique de réduction du fer a été notée. Pour la technique de blanchissement du β -carotène la fraction 1-butanol présente une meilleure activité avec un EC_{50} égale à 0.995 mg/mL.

En conclusion, nous dirons que les résultats obtenus ont révélé que les extraits de tanins des feuilles de *Lawsonia inermis* ont une importante activité antioxydante qui varie en fonction du solvant d'extraction et de la concentration. Ces extraits ont exercé une bonne activité réductrice du fer, une activité anti radicalaire vis-à-vis du radical DPPH et une activité inhibitrice du blanchissement de β -carotène supérieure à celle de l'acide ascorbique et du BHT.

Mots clés : *Lawsonia inermis*, Métabolites secondaires, Activité antioxydante, DPPH, FRAP, Blanchiment de β -carotène.

Abstract:

Henna "*Lawsonia inermis*" is a thorny shrub of the *Lythraceae* family which can reach 6 m of top. The different parts of this plant are used in traditional medicine to treat various affections such as rheumatoid arthritis, headaches, ulcers, diarrhea, fever, diabetes and heart disease.

The present investigation is devoted to the phytochemical study and the evaluation of the antioxidant power of the various crude and specific extracts of tannins of the Henna leaves. Three techniques of evaluation of the antioxidant power are applied: Trapping of the DPPH radical, iron reducing power (FRAP) and bleaching of β -carotene.

The extracts and fractions of this plant were subjected to phytochemical screening by standard methods which revealed their richness in tannins, flavonoids, terpenoids, alkaloids and free quinones.

The ethyl acetate fraction showed a very high activity in the DPPH radical scavenging technique with an IC₅₀ equivalent to $8.60 \cdot 10^{-6}$ mg / mL compared to the other extracts tested.

The same finding for the iron reduction technique was noted. For the β -carotene bleaching technique the 1-butanol fraction shows a better activity with an EC₅₀ equal to 0.995 mg / mL.

In conclusion, we will say that the results obtained revealed that the tannin extracts of *Lawsonia inermis* leaves have an important antioxidant activity which varies according to the extraction solvent and the concentration tested. These extracts exerted a good iron reducing activity, an anti-free radical activity about the DPPH radical and an β -carotene bleaching inhibitory activity greater than that of ascorbic acid and BHT.

Key words: *Lawsonia inermis*, Secondary metabolites, Antioxidant activity, DPPH, FRAP, β -carotene bleaching.

ملخص:

الحناء (*Lawsonia inermis*) هي شجيرة من عائلة (*Lythraceae*) يصل طولها إلى 6 أمتار. تستخدم أوراق الحناء والزهور والبدور ولحاء الساق والجذور في الطب التقليدي لعلاج أمراض مختلفة مثل التهاب المفاصل الروماتويدي والصداع والقرحة والإسهال والحمى ، مرض السكري وأمراض القلب .

كان هذا النبات موضوع عملنا الذي يهدف إلى دراسة الكيمياء النباتية وتقييم قوة مضادات الأكسدة لمختلف المستخلصات المائية والميثانول المائي والكسور الثلاثة لمستخلص العفص من أوراقه وسيقانه. ثلاث تقنيات لتقييم قوة مضادات الأكسدة المطبقة : تثبيط الجذور الحرة (DPPH) ارجاع الحديد (FRAP) وتثبيط إزالة لون البيتا كاروتين .

تعرضت المستخلصات والكسور في هذا النبات للفحص الكيميائي النباتي بطرق قياسية وكشفت ثرائها في العفص والفلافونويدات والكينونات الحرة .

أظهر جزء أسيتات الإيثيل نشاطا عاليا للغاية في تقنية تثبيط الجذور DPPH مع IC50 بقيمة 8.60 * 10⁻⁶ مل/مل مقارنة مع غيرها من الكسور و المستخلصات الأخرى و كذلك حصلنا على نفس النتائج بالنسبة لتقنية ارجاع الحديد FRAP. بالنسبة لتقنية تثبيط إزالة لون البيتا كاروتين ، يُظهر جزء البوتانول نشاطاً أفضل فيما يتعلق بكسر أسيتات الإيثيل ومستخلصات الميثانول المائية والمائية. في الختام ، تظهر السيقان والأوراق الموجودة في *Lawsonia inermis* نشاطاً ملحوظاً في مجال مضادات الأكسدة خاصة بالنسبة لكسور مستخلص العفص الذي يعود إلى ثرائه في مادة البوليفينول .

الكلمات المفتاحية : *Lawsonia inermis* ، نشاط مضاد للأكسدة ، DPPH، FRAP، تثبيط إزالة لون البيتا كاروتين

Sommaire :

Introduction générale	1
<u>Première partie : Synthèse bibliographique</u>	2
<u>Chapitre 1 : Les plantes médicinales</u>	3
1.1. Historique	3
1.2. Les plantes médicinales	3
1.3. Les métabolites secondaires	3
1.3.1. Les polyphenols	4
1.3.2. Les terpénoides	7
1.3.3. Les alcaloïdes	8
1.4. Intérêt des plantes médicinales	9
<u>Chapitre 2 : Présentation de <i>Lawsonia inermis</i></u>	10
2.1. Description botanique	10
2.2. Classification	11
2.3. Origine et répartition géographique	11
2.4. Composition de <i>Lawsonia inermis</i>	12
2.5. Les activités biologiques de <i>Lawsonia inermis</i>	13
2.6. Travaux antérieurs sur <i>Lawsonia inermis</i>	14
2.6.1. Effet cicatrisant	14
2.6.2. Effet anti-inflammatoire, antiarthritique, analgésique et antipyrétique	14
2.6.3. Effet métabolique	14
2.6.4. Effet antiprolifératif	15
2.6.5. Effet antifongique	15
2.6.6. Effet antioxydant	15
<u>Chapitre 3 : Stress oxydatif et radicaux libres</u>	16
3.1. Définition du stress oxydatif	16

3.2. Définition des radicaux libres	16
3.3. Origine des radicaux libres	16
3.4. Rôle physiologiques des radicaux libres	17
3.5. Les maladies liées au stress oxydant	17
3.6. Les antioxydants et le système de défense antioxydant	18
3.6.1. Antioxydant endogènes	18
3.6.2. Antioxydant exogènes	18
3.7. Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes in vitro	19
<u>Deuxième partie : Matériel et méthodes</u>	20
1. Matériel végétal	21
2. Méthodes	21
2.1. Préparations des différents extraits de <i>Lawsonia inermis</i>	21
2.1.1. Extrait brut aqueux	21
2.1.1. Extrait brut eau/méthanol	22
2.1.3. Extrait des tannins	23
2.1.4. Le rendement des extraits secs	24
2.2. Tests phytochimiques	24
2.3. Evaluation de l'activité antioxydante	25
2.3.1. Réduction du fer : FRAP	26
2.3.2. Test de piégeage du radical libre DPPH	27
2.3.3. Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique..	28
<u>Troisième partie : Résultats et discussion</u>	30
1. Etude phytochimique	31
1.1. Les tests phytochimiques	31
1.2. Les rendements en extraits secs	32
2. Activité antioxydante	33

2.1. Test de la réduction du fer : FRAP	33
2.2. Test de piégeage du radical libre DPPH	36
2.3. Test de blanchissement du β -carotène	41
<u>Quatrième partie : Conclusion générale et perspectives</u>	46
<u>Cinquième partie : Références bibliographiques</u>	49

Liste des tableaux

- Tableau N°1 :** Les principaux constituants chimiques de *Lawsonia inermis*.
- Tableau N°02 :** Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les différents extraits de *Lawsonia inermis*.
- Tableau N°03:** Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits de *Lawsonia inermis*, de l'acide ascorbique et de BHT.
- Tableau N°04 :** Valeur des IC50 des extraits de *Lawsonia inermis*, de BHT et de l'acide ascorbique.

Liste des figures

- Figure N°1 :** Structure de base des flavonoïdes.
- Figure N°2 :** Structures de base des principaux flavonoïdes.
- Figure N°3:** Structures de l'acide gallique et d'un tannin gallique.
- Figure N°4 :** Structure d'un tannin condensé.
- Figure N°5 :** Structure d'une molécule de coumarine.
- Figure N°6 :** Structure de base de l'isoprène.
- Figure N°7:** Quelques structures des alcaloïdes.
- Figure N°8:** Représentation photographique de *Lawsonia inermis* (Fagbohoun, 2014).
- Figure N°9 :** Feuilles de Henné (*Lawsonia inermis*) (Linné, 1753).
- Figure N°10 :** Structures des principaux constituants de *Lawsonia inermis*.
- Figure N°11 :** Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie.
- Figure N°12 :** Effets des espèces réactives sur l'organisme.
- Figure N°13 :** Photo des feuilles récoltées de *Lawsonia inermis*.
- Figure n°14:** Schéma de l'extraction aqueuse des feuilles de *Lawsonia inermis*.
- Figure N°15 :** Schéma de l'extraction eau/méthanol des feuilles de *Lawsonia inermis*.
- Figure N°16 :** Schéma de l'extraction des tanins des feuilles de *Lawsonia inermis*.
- Figure N°17 :** Forme libre et réduite de DPPH.
- Figure N°18:** Rendements des extraits des feuilles de la plante *Lawsonia inermis*.
- Figure N°19 :** Pouvoir réducteur des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* par la méthode de FRAP.

- Figure N°20 :** Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH en fonction des différentes concentrations des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis*.
- Figure N°21:** Histogramme des valeurs des IC50 des différents extraits de *Lawsonia inermis*, de l'acide ascorbique et du BHT.
- Figure N°22 :** Cinétique de blanchissement du bêta carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de feuilles de *Lawsonia inermis*, du BHT et de l'acide ascorbique en fonction du temps.
- Figure N°23 :** Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β carotène en fonction des concentrations des extraits de *Lawsonia inermis* et des témoins positifs.
- Figure N°24 :** Histogramme qui représente les IC50 des différents extraits de *Lawsonia inermis*, de l'acide ascorbique et de BHT.

Liste des abréviations

%IPL :	Pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique
ABTS :	2,2-azinobis-3-éthyl-benzothiazoline-6-sulfonate
ADN :	Acide ribonucléique
AO :	Agent oxydant
BHA :	Butylated hydroxy anisol
BHT :	Hydroxyltoluènebutylé
CAT :	Catalase
DMBA :	7,12-diméthyl benz(a) anthracène
DO :	Densité optique
DPPH :	2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl
ERO :	Espèce réactive de l'oxygène
Fe²⁺ :	Fer ferreux
Fe³⁺ :	Fer ferrique
FeCl₃ :	Trichlorure de fer
FRAP :	Capacité réductrice ferrique d'antioxydants
H₂O :	Monoxyde dihydrogène
H₂O₂ :	Peroxyde d'hydrogène
H₂SO₄ :	Acide sulfurique
HCl :	Chlorure d'hydrogène
HDL :	Lipoprotéine de haute densité
HgCl₂ :	Chlorure de mercure(II)
HOCL :	Acide hypochloreux
IC₅₀ :	Concentration inhibitrice 50
K₃Fe(CN)₆ :	Ferricyanure de potassium
KI :	Iodure de potassium
LOH :	Radical peroxy
IC₅₀ :	Concentration inhibitrice 50
K₃Fe(CN)₆ :	Ferricyanure de potassium
KI :	Iodure de potassium
LOH :	Radical peroxy
Mg :	Magnésium
NaOH :	Hydroxyde de sodium

NH₄OH :	Ammoniaque
NO· :	Monoxyde d'azote
O₂ :	Oxygène
O₂' :	Anion superoxyde
OH· :	Radical hydroxyle
ONOOH :	Nitroperoxyde
ORAC :	Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène
Rdt :	Rendement
ROO· :	Peroxyde
SOD :	Superoxydedismutase
TCA :	Acide trichloroacétique
TEAC :	Capacité antioxydante équivalente de Trolox
UV :	Ultraviolet

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis quelques années le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par le nouveau concept, celui du stress oxydant, qui se définit par un déséquilibre entre la production des radicaux libres et les systèmes de défenses antioxydantes ou par une mauvaise alimentation pauvre en antioxydants (**Pincemail et al., 2002**). A long terme, ceci peut contribuer à l'apparition de diverses pathologies liées au vieillissement comme les cancers ou les maladies cardio-vasculaires (**Haleng et al., 2007**).

Dans un état de stress l'apport d'un système de défense en antioxydant est nécessaire. Ainsi les antioxydants de synthèses ou naturels assurent la protection et la prévention contre ces radicaux libres. Mais, les risques et les effets néfastes des antioxydants synthétiques utilisés comme additifs alimentaires ont été questionnés au cours des dernière années et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, est apparente. Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées (**Favier, 2003**).

Lawsonia inermis est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les extraits de cette plante sont largement employés, dans la médecine traditionnelle, depuis des siècles contre une multitude de maux, et notamment comme diurétique et astringente dans les ulcères gastro-intestinaux. Les études récentes soulignent des propriétés curatives extraordinaires et prometteuses de cette plante (anti-tumorales, anti-inflammatoires et antioxydantes) (**Botineau, 2010**).

Les substances naturelles douées d'activité antioxydante présentent un intérêt socioéconomique sans équivoque dans le domaine de la recherche bio-pharmacologique. C'est dans ce contexte que s'inscrit la présente étude qui est basée sur :

-  La préparation des différents extraits bruts et spécifiques des tanins des feuilles de *Lawsonia inermis* ;
-  L'analyse qualitative du contenu en métabolites secondaire des différents extraits bruts des feuilles de Henné ;
-  L'évaluation du pouvoir piégeur (scavenger) des différents extraits des feuilles de Henné vis-à-vis d'un radical libre relativement stable (DPPH·) ;
-  L'étude de l'activité chélatrice des métaux de transition par les différents extraits de *Lawsonia inermis* ;
-  L'évaluation de l'effet anti-lipoperoxydant des extraits en utilisant le système acide linoléique/ β -carotène.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1-1-Historique :

Les plantes médicinales sont employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines, selon leurs compositions en valeurs thérapeutiques. Malgré les meilleurs résultats obtenus par la médecine moderne pour le traitement des maladies, la phytothérapie est devenue l'une des issues les plus empruntées pour se soigner et lutter contre les maladies (El Youbi et *al.*, 2012).

Cependant, l'homme n'a découvert les vertus bénéfiques des plantes que par une approche progressive, facilitée par l'organisation des rapports sociaux, en particulier à partir du néolithique. L'observation liée à l'expérience et la transmission des informations glanées au cours du temps font que certains hommes deviennent capables de poser un diagnostic, de retrouver la plante qui soigne et finalement de guérir le malade.

Récemment, l'acceptation de la médecine traditionnelle comme forme alternative de santé et le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles ainsi qu'une croissance des effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes, a mené des auteurs à étudier les activités biologiques des plantes médicinales.

1-2- Les plantes médicinales :

Les plantes médicinales représentent toutes les plantes contenant une ou des substances thérapeutiques qui permettent la synthèse de drogues utiles (Sofowora, 2010). Ces plantes sont considérées comme peu toxiques et douces par rapport aux médicaments pharmaceutiques (Didier et *al.*, 2011).

Leur efficacité relève de leurs composés, très nombreux et très variés en fonction des espèces, qui ont beaucoup de principes actifs différents (Schaunberg et Paris, 2013).

1-3- Les métabolites secondaires :

Le monde végétal constitue la source majeure de médicaments, selon leur richesse en métabolites secondaires tel que: les tanins, les glucosides, les mucilages, les flavonoïdes, les saponines, les résines, les gommes etc., et qui procurent des propriétés curatives appréciables et bénéfiques pour la santé (Eddouks et *al.*, 2007).

Les métabolites secondaires sont des substances indirectement essentielles à la vie de la plante. Ils participent à l'adaptation de la plante avec son environnement, à la tolérance contre

les chocs tels que la lumière UV et les insectes nocifs, ainsi qu'à la défense contre les pathogènes tels que les moisissures et les bactéries phytopathogènes (**Sarni-manchado et Cheynier, 2006**).

On distingue trois principales classes des métabolites secondaires, à savoir les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpénoides et stéroïdes (**Ramawat et Merillon, 2008**).

1-3-1 -Les polyphenols :

Les polyphenols regroupent les substances chimiques ayant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupes hydroxyles et d'autres constituants. Ces espèces sont soit des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 3000 da, comme les tannins (**Chira et al., 2008**).

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénols, xanthones et autres phloroglucinols où les flavonoïdes représentent le groupe le plus commun et qui est largement distribué (**Bruneton, 1993**).

A partir des années quatre-vingt, c'est la découverte du rôle des radicaux libres dans les processus pathologiques qui a relancé l'intérêt des polyphenols en particulier les flavonoïdes dont les propriétés antioxydantes sont très marquées.

a- Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des produits quasi universels chez les végétaux. Ils sont souvent responsable de certaines coloration de nombreux végétaux .Tous les flavonoïdes possèdent la même structure de base (**Figure N°1**). Le noyau flavane est constitué de 15 atomes de carbone qui sont assemblés en 3 cycles : A, B et C (A et B sont des noyaux aromatiques, et C est un hétérocycle oxygéné central) (**Lobstein, 2010**).

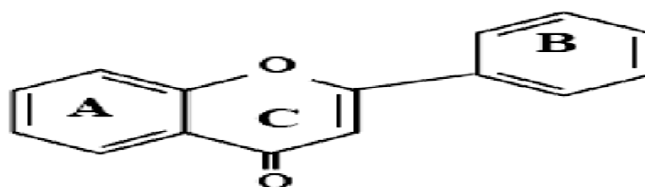


Figure N°1 :

Structure de base des flavonoides.

Il existe plusieurs groupes de flavonoïdes, dont les principaux sont les flavones, les flavonols, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanones et les anthocyanidines (**Figure N°2**). Ils remplissent des rôles variés, dans le processus de défense contre les UV, la pigmentation et la résistance aux maladies par exemple (**Chira et coll., 2008**).

Les flavonoïdes sont aussi essentiellement connus pour leur action antioxydante, qui participent à combattre les radicaux libres issue de l'oxygène et de l'azote. Le stress oxydatif occasionné par ces radicaux libres semble fragiliser la bonne santé de l'organisme (**Satheesh et coll., 2012**).

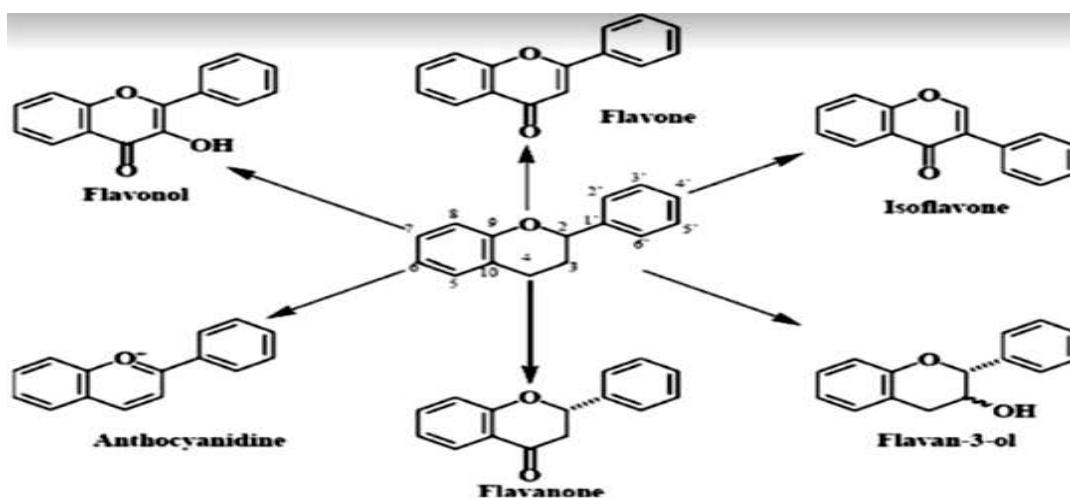


Figure N°2 :

Structures de base des principaux flavonoïdes.

b- Les tannins :

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ce sont des substances d'origine végétale non azotées, de structure polyphénolique, solubles dans l'eau, l'alcool, l'acétone et peu solubles dans l'éther. Ils ont une saveur astringente et possèdent la propriété commune de tanner la peau en la rendant imputrescible et imperméable et ceci en se fixant sur les protéines. Leur poids moléculaire varie de 500 à 3000 da. Les tannins sont utilisés principalement en usage externe particulièrement contre des blessures, des plaies ou des hémorroïdes, et en usage interne contre la diarrhée et la gastro-entérite (**Boudjouref, 2011**). Ils sont utilisés aussi comme des antioxydants, antibactériens, anti-infectieux, cardiovasculaires, anticancéreux et parfois comme calmants [(**Rahman et al., 2006**) ;

(Akroum, 2011)]. Les tanins sont traditionnellement divisés en deux groupes: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Frutos et coll., 2004).

➤ **Les tannins hydrolysables :**

Les tanins hydrolysables sont des esters du glucose et d'acides phénols tels que l'acide gallique (tanins galliques) et l'acide éllagique (tanins éllagiques) (Figure N° 3).

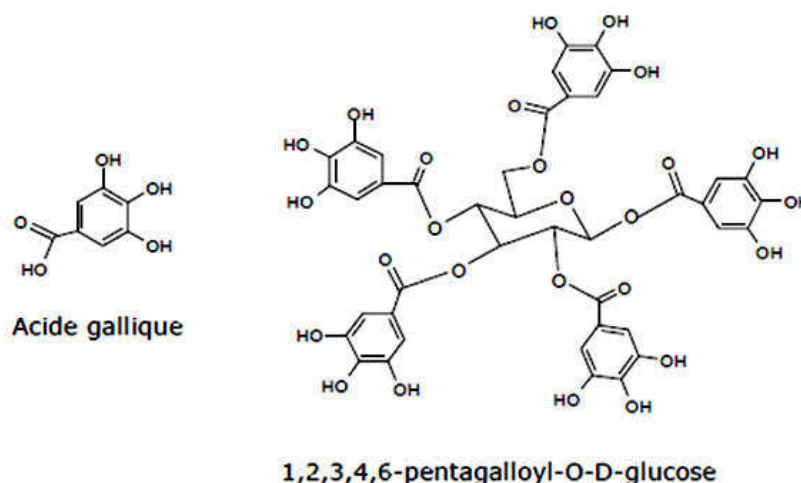


Figure N°3:

Structures de l'acide gallique et d'un tannin gallique (Brunet, 2008).

➤ **Les tannins condensés :**

Les tannins condensés appelé aussi *tannins catechiques* ou *proanthocyanidols*, se diffèrent fondamentalement des tannins hydrolysables car ils ne possèdent pas de sucre dans leur molécule et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes. Les tannins condensés sont des oligomères ou des polymères de favane-3-ols (éventuellement de favane-3,4-diols) dérivés de la catéchine ou de ses nombreux isomères (Figure N°4) (Macheix et al., 2005).

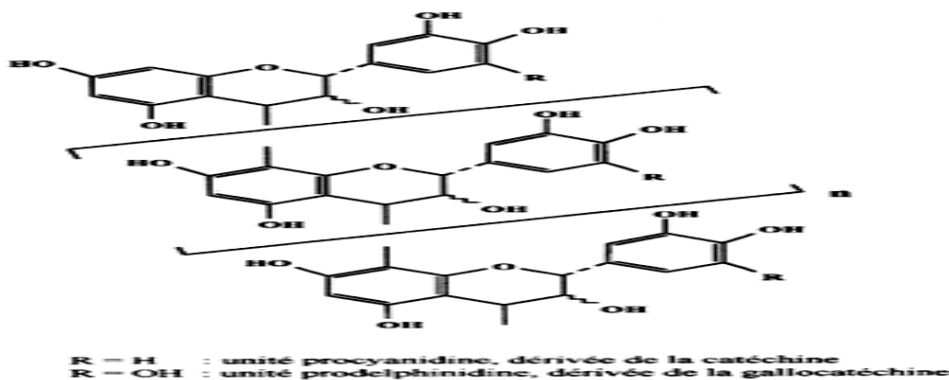


Figure N°4 :

Structure d'un tannin condensé.

c- Les coumarines :

Les coumarines tirent leur nom de « coumarou » qui est le nom vernaculaire des fèves tonka qui contiennent 1 à 3% de coumarines, d'où fut isolées en 1982 (**Bruneton, 1993**). Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (**Figure N°5**). Elles constituent une classe importante de produits naturels. Elles donnent une odeur caractéristique semblable à celle du foin fraîchement fauché. A l'exception des algues, ces composés sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien (**Ford et al., 2001**).

Les coumarines sont cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes, hypotensives. Elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées [**Cowan, 1999**].

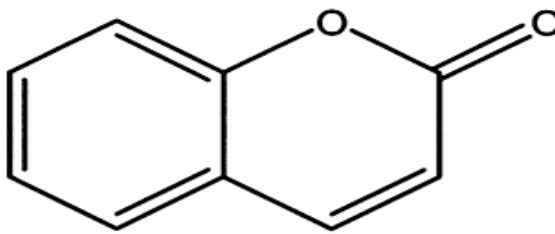


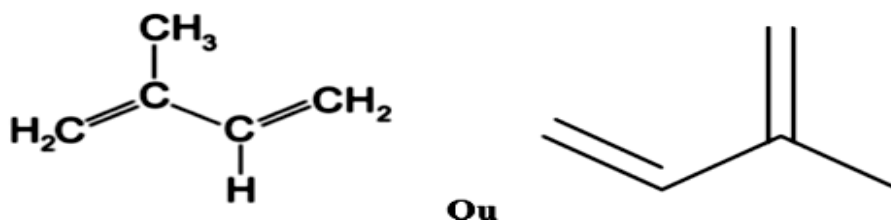
Figure N°5 :

Structure d'une molécule de coumarine (Ford et al., 2001).

1-3-2- Les terpénoides:

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène (**Figure N°6**). Ces composés sont majoritairement d'origine végétale (**Malecky, 2005**). Ils sont synthétisés par les plantes, les organismes marins, les champignons et même les animaux (**Benaïssa, 2011**).

Les activités biologiques des terpènes sont larges et comportent par exemple des activités: antimicrobiennes (acide fuside), antimycotiques (trianthenol), antivirales (les dérivés de l'acide betulinique), anti-inflammatoires (betuline, lupeol), des effets anti-tumorales (boswellique, pomole), anticariées (des acides oleanolique, glycyrrhétique), anti-ulcéreuses (acide glycyrrhétique) et anti-HIV (l'acide betulinique) [(**Fujioka et al., 1994**) ; (**Ramawat et Merillon, 2008**)].

**Figure N°6 :**

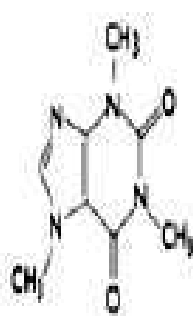
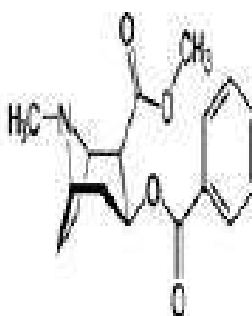
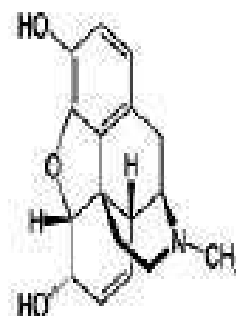
Structure de base de l'isoprène (Khenaka, 2011).

1-3-3- Les alcaloïdes:

Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale, à caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe (**Badiaga; 2011**).

Les alcaloïdes renferment toujours du carbone, de l'hydrogène et de l'azote, et le plus souvent, de l'oxygène (exceptionnellement quelques alcaloïdes contiennent du soufre) (**Figure N°7**) (**Vallet, 1996**). En raison de leur puissante activité biologique, la plupart des alcaloïdes connus, environ 12.000, ont été exploités en tant que médicaments, des stimulants, des narcotiques, et des poisons. Par exemple la nicotine empêche la croissance des larves du tabac. En outre, certains alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV. Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir de l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante (**Bhat, 2005**).

Contrairement à la plupart des autres types de métabolites secondaires, les nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques uniques (**Ziegler et Facchini, 2008**).

**Caféine****Morphine****Cocaïne****Figure N°7:**

Quelques structures des alcaloïdes (Badiaga, 2011).

1-4-Intérêt des plantes médicinales:

Depuis la préhistoire, plus d'une centaine ou milliers de plantes sont utilisées dans le monde entier sous forme de cataplasme ou d'infusion. En Algérie, de nombreux travaux ont été réalisés sur des plantes médicinales. On peut citer ceux de **Rahmoun et al (2013)**, **Benariba et al., (2009)** et **Bouhadjera et al (2005)**. Ces données sur les plantes médicinales ont permis d'une part d'expliquer leur action thérapeutique et d'autre part de confirmer leurs utilisations en médecine traditionnelle.

Les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, elles sont considérées comme source de matière première essentielle pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments (**Maurice, 1997**). Elles constituent un patrimoine précieux pour l'humanité et plus particulièrement pour la majorité des communautés démunies des pays en voie de développement qui en dépendent pour assurer leurs soins de santé primaires.

Parmi les médicaments obtenus à partir des plantes, on trouve le taxol, isolé de l'if (*Taxusbaccata*, Taxaceae) qui a sa place dans le traitement des cancers gynécologiques. L'artémisinine, substance isolée d'une armoise chinoise (*Artemisiaaannua*, Asteraceae), est utilisée dans le traitement des formes résistantes de la malaria. On peut encore citer la galanthamine, obtenue de la perce-neige (*Galanthusnivalis*, Amaryllidaceae), utilisée depuis peu dans le traitement de la maladie d'Alzheimer.

Les plantes médicinales sont prometteuses et constituent une grande source d'antioxydants et d'antibactériens naturels pour l'industrie agroalimentaire et pharmaceutique (**Gheffour et al., 2015**). Les extraits de ces plantes sont utilisés pour piéger les radicaux libres en luttant contre le stress oxydatif (**Favier, 2003**). Au cours de ce travail, on s'est intéressé à l'étude de la plante *Lawsonia inermis* ainsi qu'à la détermination de la teneur en métabolites secondaires et l'évaluation du pouvoir antioxydant de ces feuilles.

2-1-Description botanique :

Lawsonia inermis est un arbuste, glabre, très ramifié, d'une hauteur de 2 à 6 m, qui peut être épineux. Il possède une écorce brun-grisâtre, non renforcée quand elle est jeune. Les jeunes branches sont quadrangulaires, vertes mais deviennent rouges avec l'âge (Orwa et al., 2009) (Figure N°8).

Les feuilles sont opposées, subsessiles, elliptiques, entières, aiguës ou obtuses, de 2 à 3 cm de long et de 1 à 2 cm de large (Zouhri et al., 2017).

Les fleurs sont petites, blanches, nombreuses, odorantes, de 1 cm de diamètre et à 4 pétales froissés dans l'œuf. Les fruits sont de petites capsules brunes, globuleuses, de 4 à 8 mm de diamètre, contenant de nombreuses graines et s'ouvrant irrégulièrement. Les graines sont anguleuses, à tégument épais et mesurent 3 mm de diamètre (Orwa et al., 2009).

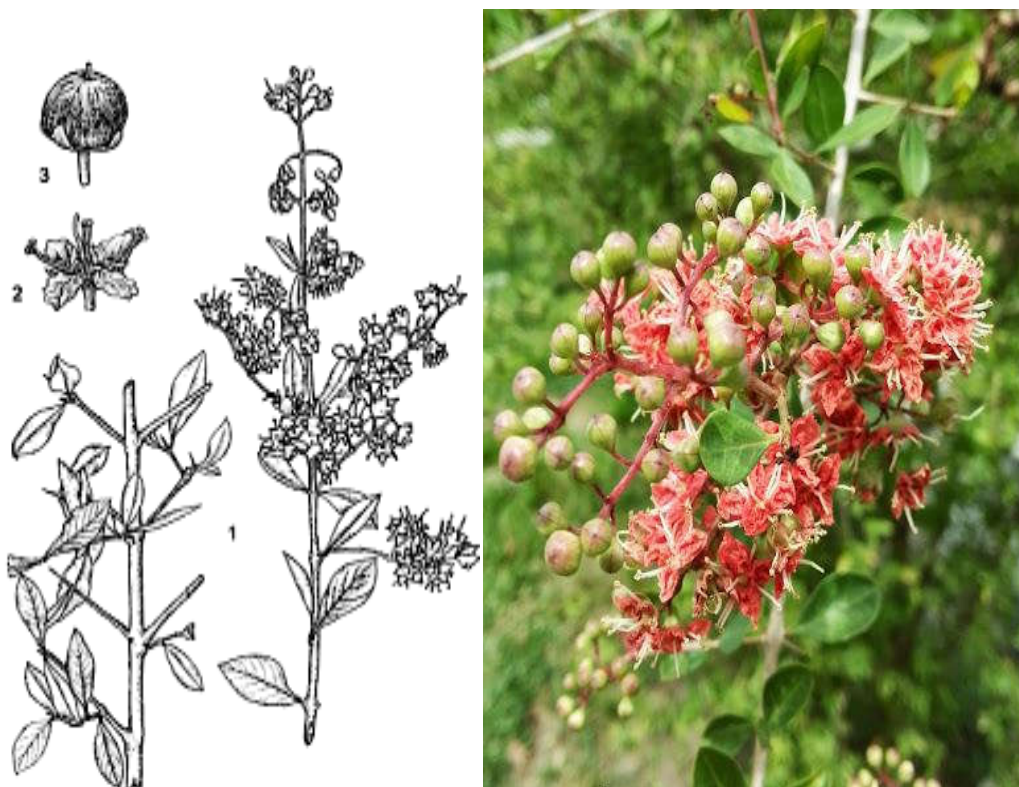


Figure N°8:

Représentation photographique de *Lawsonia inermis* (Fagbohoun, 2014).

1- partie inférieure et supérieure d'un rameau en fleurs; 2- fleur ; 3- fruit

2-2-Classification :

En botanique, la plante *L. inermis* est classée comme suit (Ghédira et al., 2017) :

- Règne : Plantae
- Super-division : Embryophyta
- Division : Tracheophyta
- Subdivision : Spermatophytina
- Classe : Magnoliopsida
- Super-ordre : Rosanae
- Ordre : Myrtales
- Famille : Lythraceae
- Genre : *Lawsonia*
- Espèce : *Lawsonia inermis* L.

2-3-Origine et répartition géographique :

Le Henné « *Lawsonia inermis* », de la famille des Lythracées, est largement cultivé dans diverses régions tropicales telles que l'Asie, l'Afrique et l'Amérique. C'est une plante en fleurs, du genre *Lawsonia*, connue dans le monde entier pour son utilisation en cosmétique comme colorant naturel [(Babili et al., 2013) ; (Sherifa et al., 2015)]. Dans le Henné naturel, la molécule active est appelée la « lawsone » (2-hydroxy-1,4 naphthoquinone). Ce colorant naturel, allant du jaune au rouge-brun selon le mode de préparation, est obtenu en broyant les feuilles d'un arbuste qui porte de même le nom de Henné (*Lawsonia inermis*, Linné, 1753) (Figure_N° 9) (Trop et al., 2011).



Figure N°9 :

Les feuilles de Henné (*Lawsonia inermis*) (Linné, 1753)

2-4-Composition de *Lawsonia inermis* :

Les constituants naturels de *Lawsonia inermis* sont les huiles essentielles, la 1,4-naphtoquinone, les tanins, l'acide gallique, les flavonoïdes, les lipides, les sucres, le tri-acano-tri-décanoate, le mannitol, les xanthones, les coumarines (5-alkyloxy-7-hydroxy-coumarine), les résines (2 à 3%), 5 à 10% d'ingrédients tanniques et jusqu'à 2% de lawsones (2-hydroxy-1,4-naphtoquinone). Les principaux constituants chimiques de *Lawsonia inermis* figurent dans le Tableau N°1 et leurs structures chimiques sur la Figure N°10 (Ghédira et al, 2017).

Tableau N°1 : Les principaux constituants chimiques de *Lawsonia inermis*.

Familles de constituants chimiques	Constituants chimiques principaux
Naphtoquinones	Lawsonie (2-hydroxy-1,4-naphtoquinone), 2-méthoxy-3-méthyl-1,4-naphtoquinone, isoplumbagine (2-méthyl-8-hydroxy-1,4-naphtoquinone)
Xanthones	1,3-dihydroxy-6,7-diméthoxyxanthone, 1-hydroxy-3,6-diacétoxy-7-méthoxyxanthone, 1-hydroxy-3,7-diméthoxy-6-acétoxyxanthone
Coumarines	Lacoumarine, fraxétine, scopolétine, esculétine, daphnéside, daphnorine, carbonates et inermiscarbonates A et B d'isocoumarine
Flavonoïdes	4'-hydroxyflavanone (4), apigénine (5), kampférol (6), lutéoline (7), quercétine (8), (-)-catéchine, cosmosiine (16), isoscutellarine, lutéoline-7-O-rutinoside diosmétique-7-O-rutinoside, acacétine, linarigénine, linariscénine (4'-méthoxy-apigénine), acacétine-7-O-glucoside, lutéoline-7-O-glucoside, apigénine-7-O-β-D-glucopyranoside, lawsochrysine, lawsochrysinine
Naphtalènes	Lawsoniaside (1,2,4-trihydroxynaphtalène-1,4-di-β-D-glucopyranoside), 1,2,4-trihydroxynaphtalène-1-O-β-D-glucopyranoside, lawsonaphthoate A-C, 1,2-dihydroxy-4-Oglucosyloxynaphtalène
Huile essentielle	n-hexadécane (0,5-4,7 %), (2E)-hexénal (0,5-11,7 %), limonène (0,8-14,7 %), carvol (3,8-7,1 %), géranyl-acétone (1,4-7,9 %)(E)-caryophyllène (3,3-8,4 %), (E)-anéthol (0,6-35,0 %), bêta-ionone, 1-octène-3-ol, n-décane, p-cymène, limonène, γ-terpinène, linalol, camphre, terpinène-4-ol, α-terpinéol, n-dodécane, n-décanal, β-cyclocitral, n-tridécane, carvacrol, eugénol, n-tétradécane, α-humulène
Tanins	1,2,3,6-tétra-O-galloyl-β-D-glucose, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-β-D-glucose, acide tannique
Phénylpentenynes	Lawsochyline A-C
Acétophénones	Lalioside
Divers	Triterpènes, lignanes, mannitol

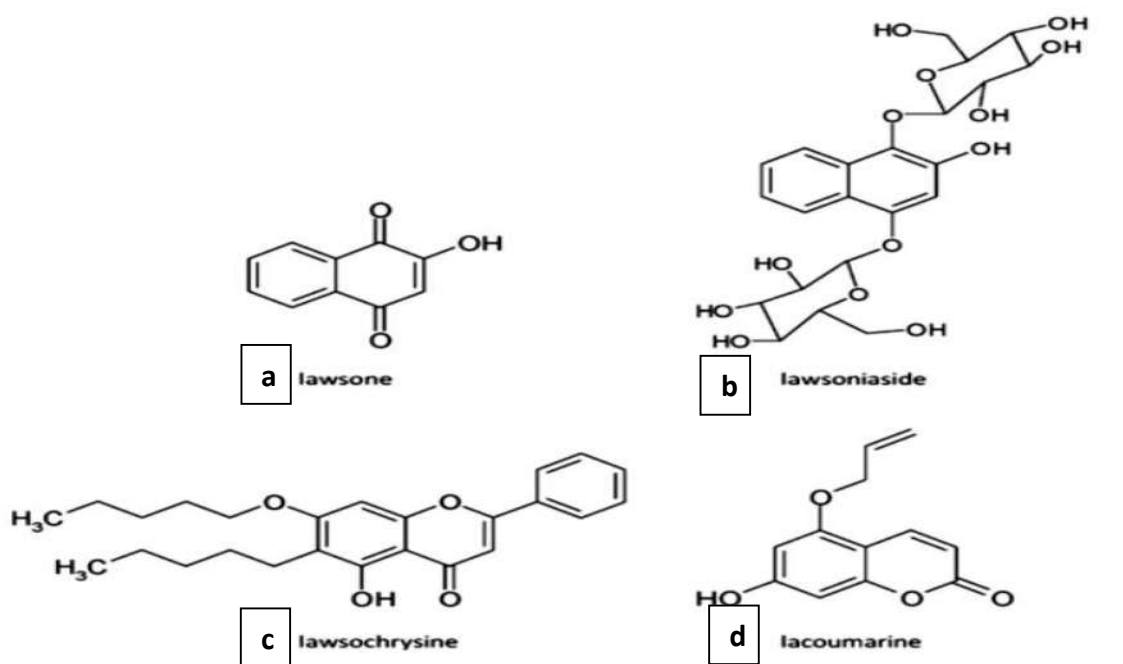


Figure N°10 :

Structures des principaux constituants de *Lawsonia inermis*.

a- Lawsone, b- Lawsoniaside, c- lawsochrysine et d- La coumarine

2-5- Les activités biologiques de *Lawsonia inermis* :

Cette plante a des propriétés de teinture intéressantes qui sont utilisées traditionnellement depuis des siècles en Asie et en Afrique pour la teinture des cheveux et la peinture de la peau et des ongles.

L'extrait brut d'éthanol de *Lawsonia inermis* produit des effets anti-inflammatoires, analgésiques, antibactériens, antioxydants et antipyrétiques. Un bain de bouche à base de la lawsone exerce une activité antifongique supérieure à celle de la Listerine® (Sujanamulk et al., 2016).

La fraction butanolique des feuilles de *Lawsonia inermis* présente un effet antioxydant qui protège le tissu hépatique de l'atteinte par le 2-acétylaminofluorène. Le Henné inhibe aussi la production de NO induite par le lipopolysaccharide [(Yang et al., 2016) ; (Kumar et al, 2017)].

Cette plante produit la plus grande teneur en colorant à une température variant entre 35-45°C (Makhija et al., 2011). Elle est également employée en compresse contre l'eczéma, les furoncles, les abcès, les mycoses, les ulcères, les hémorragies et les fissures des pieds.

L'infusion est utilisée contre les vers intestinaux et les maux de tête. La racine est astringente, dépuratoire, diurétique, emménagogue et abortive. Elle est considérée comme un médicament puissant contre l'infection d'herpès et utile dans le traitement d'hystérie et des troubles nerveux (Chetty 2008). Dans la médecine traditionnelle des Arabes et des Indiens, des préparations à base de feuilles et de racines du Henné sont utilisées pour déclencher l'accouchement. Une décoction à base de feuilles et de racines de la plante est efficace contre la diarrhée (Enneb et al., 2015)

2-6- Travaux antérieurs sur *Lawsonia inermis* :

2.6.1. Effet cicatrisant :

L'activité cicatrisante de l'extrait ethanolic des feuilles de Henné a été évaluée sur des plaies de rats. L'extrait à une dose de 200 mg/kg a présenté une réduction de 71 % de la surface de la plaie sur tous les modèles par rapport au témoin (58 %). Une contraction rapide de la plaie et une résistance élevée à la rupture de la peau ont été observées chez les rats traités, comparativement à ceux traités avec la pommade à nitrofurazone (Nithya et al., 2011)

2.6.2. Effet anti-inflammatoire, antiarthritique, analgésique et antipyrétique :

Imam et ses collaborateurs en 2013, ont montré que l'extrait méthanolique de feuilles présentait une activité anti-inflammatoire significative ($p < 0,01$) dans un essai de contorsion induite par l'acide acétique chez la souris. En outre, l'extrait a entraîné une réduction des stimuli de la douleur nociceptive chimiquement induite, en comparaison avec un témoin positif qui a reçu le diclofénac sodique (20 mg/kg) (Imam et al., 2013).

2.6.3. Effet métabolique :

L'extrait hydro-alcoolique de *Lawsonia inermis* à la dose élevée de 400 mg/kg réduit significativement les niveaux de glucose dans le sang chez des rats diabétiques induits par l'alloxane par rapport au contrôle du diabète. Le pourcentage de réduction du glucose sanguin à la dose de 400 mg/kg d'extrait était de 39,08% au jour 21 par rapport à la ligne de base (jour 0), ce qui est comparable aux médicaments de glibenclamide (44,77%) et de la metformine (46,30%). Les résultats de l'étude ont révélé que le traitement par l'extrait hydroalcoolique de *Lawsonia inermis* réduit de manière significative le taux de glucose sanguin et le taux de lipides sériques chez les rats diabétiques traités ainsi que les taux de

triglycérides et une diminution du taux de HDL. Ceci indique son effet bénéfique sur le métabolisme des graisses, en améliorant ainsi la dyslipidémie (Singh et al., 2015).

2.6.4. Effet antiprolifératif

Les fractions hexanique et chloroformique de *Lawsonia inermis* sont antiprolifératifs sur diverses lignées cancéreuses tels que : les cancers human cervical, les adénocarcinomes du sein humain, les adénocarcinomes du poulmon humain et le cancers de ganglions des rats. Les deux fractions ont montré plus de 60% d'inhibition de la croissance dans toutes les lignées cellulaires testées à des concentrations élevées. Dans le dosage clonogénique, différentes concentrations des deux fractions de Henné a diminué le nombre et la taille des colonies par rapport aux cellules de contrôle (Kumar et al., 2015).

Raja et ses collaborateurs (2009), ont démontré que l'extrait aqueux des feuilles de *Lawsonia inermis* possède une forte activité antitumorale sur la carcinogenèse cutanée induite par le 7,12-diméthylbenz(a)anthracène (DMBA) et sur les modèles de mélanome B16F10 chez des souris à une dose de 1000 mg/kg par voie orale. L'extrait a provoqué une diminution significative du nombre de papillomes par rapport au témoin négatif, ainsi qu'une réduction de l'incidence des tumeurs (66 %), comparativement à une incidence tumorale de 100 % dans le groupe témoin. De plus, le nombre moyen de papillomes (rendement tumoral) par souris était estimé à 1,6 comparé à celui du témoin traité par DMBA (3,5) (Raja et al., 2009).

2.6.5. Effet antifongique :

Un bain de bouche à base de la lawsone exerce une activité antifongique supérieure à celle de la Listerine®. Il est plus efficace contre la formation de colonies chez des patients diabétiques (Sujanamulk et al., 2016).

2.6.6. Effet antioxydant :

Hsouna et ses collaborateurs en 2011, ont montré des propriétés antioxydantes pour différents extraits des feuilles de *Lawsonia inermis*, en particulier avec les solvant acétate d'éthyle, 1-butanol et l'eau, qui ont présenté des EC50 inférieures à 10 µg/mL.

3-1-Définition du stress oxydatif :

Le stress oxydant est défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels (Bensakhria, 2005).

3-2 Définition des radicaux libres :

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électrons libres non appariés sur leur couche externe (Lehucher et al., 2001).

3-2-Originé des radicaux libres :

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 primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle $OH^{\bullet}$, ou de l'azote tel le monoxyde d'azote $NO^{\bullet}$. D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet 1O_2 , le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde ($ONOOH$), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactive de l'oxygène (figure N°11).

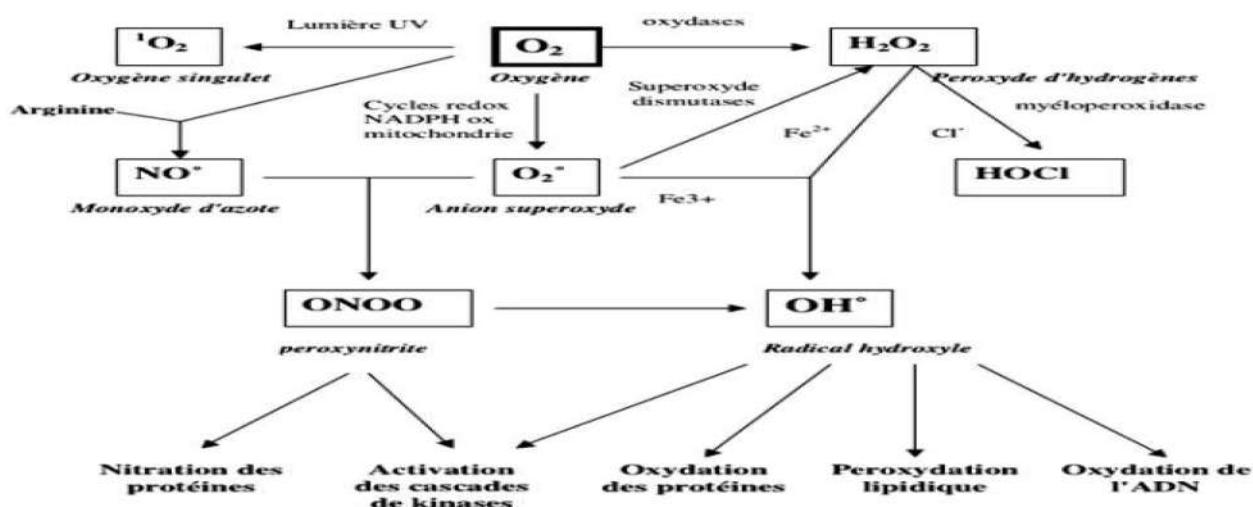


Figure N°11 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

3-3- Rôle physiologique des radicaux libres :

Les radicaux libres peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. En faible quantité, ces radicaux jouent un rôle de messagers secondaires capables de réguler le phénomène de l'apoptose ou l'activation des facteurs de transcription, et aussi de processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène pour percer la paroi membranaire de l'ovule (Haleng et al., 2007).

3-4- Les maladies liées au stress oxydant :

En cas de surproduction, ces radicaux s'attaquent à des composantes cellulaires normales comme les lipides, les protéines et les acides nucléiques (**Figure N°12**). L'activité antiradicalaire d'un composé est associée à sa capacité d'empêcher ou de retarder au maximum l'oxydation (Merouane et al., 2014).

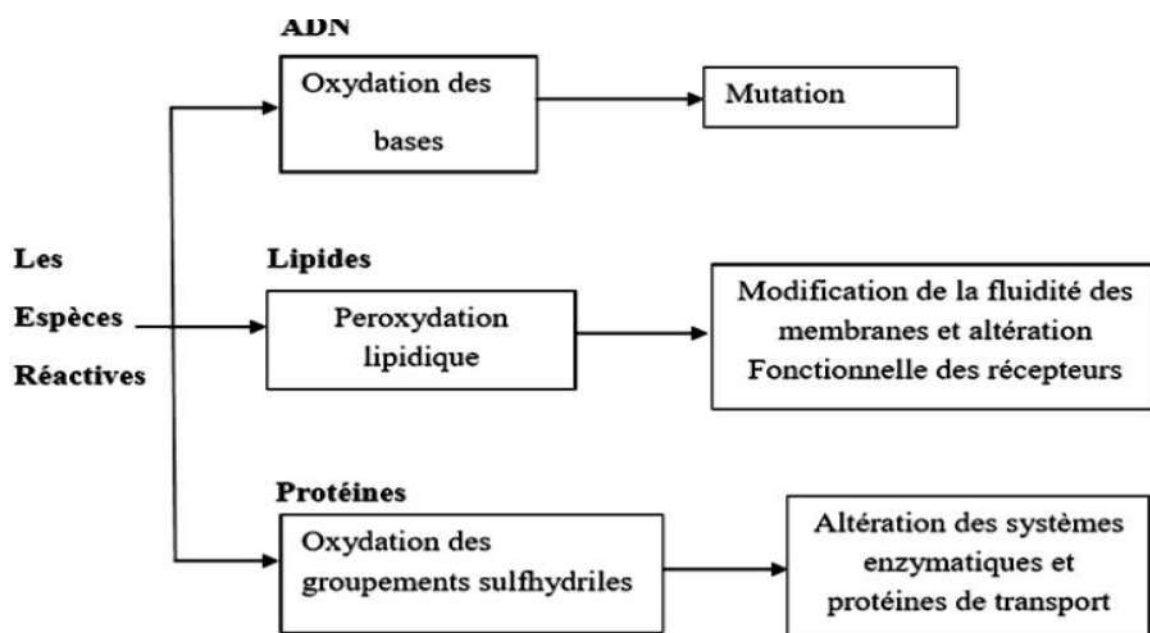


Figure N°12 :

Effets des espèces réactives sur l'organisme (Favier, 2003).

Cette oxydation peut engendrer le phénomène du stress oxydant à cause de ces radicaux libres dont leurs production est augmentée et peuvent conduire ainsi au développement de nombreuses pathologies telles que l'obésité, le diabète de type 2, l'athérosclérose, le cancer, les maladies infectieuses bactériennes et virales ou le vieillissement [(Rashid et al., 2013) ; (Sarr et al., 2015)].

3-5- Les antioxydants et le système de défense antioxydant :

Pour lutter contre les effets nocifs de ces radicaux libres, notre organisme possède des systèmes de défense complexe constitués par des composés appelés « les antioxydants ». Ces systèmes sont capables de bloquer la formation des radicaux libres en les neutralisant ou en les désactivant une fois formés, protégeant ainsi les systèmes biologiques contre tout dommage oxydatif (**Heimeur et al., 2004**). Les antioxydants sont des molécules ayant la capacité de neutraliser des radicaux libres qui sont responsables de nombreuses maladies.

Les composés antioxydants font actuellement l'objet de nombreuses études car, en plus de leurs intérêts dans le traitement de certaines pathologies, ils sont aussi utilisés pour la conservation des denrées comestibles dans l'industrie agroalimentaire (**Cavin, 1999**).

La classification de tous les antioxydants connus est diverse. Ils sont classés généralement selon leur origine chimique en :

3-5-1- Antioxydants endogènes :

La production physiologique des radicaux libres est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, CAT, hème oxygénase, peroxyredoxane), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, ubiquinone), de protéines (transferrine et ferritine) et d'un système de défense secondaire composé de phospholipases, d'ADN endonucléase, de ligases et de macroxyprotéinases. Ces composés empêchent l'accumulation de lipides, d'ADN et de protéines oxydées dans la cellule et participent à l'élimination de leurs fragments toxiques (**Pincemail, 2002**).

3-5-2- Antioxydants exogènes :

En plus des substances propres à l'organisme, l'alimentation et les plantes sont également d'importantes sources d'antioxydants considérés comme facteur protecteur de la santé. Bien que non indispensables à la vie, ces substances jouent un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant par leur capacité de piéger les radicaux libres. Les plus importantes parmi eux sont les vitamines (E et C), les caroténoïdes, les polyphénols, les acides gras (oméga-3 et oméga-6), les huiles essentielles ainsi que des traces des métaux (sélénium, manganèse, et zinc) (**Bruneton, 1999**).

3-6- Méthodes d'évaluation des propriétés antioxydantes *in vitro* :

Plusieurs méthodes sont disponibles pour mesurer l'activité antioxydante des aliments et les systèmes biologiques (Scherer et Godoy, 2009). Elles peuvent être classées en deux groupes selon deux mécanismes : soit par le transfert d'atome d'hydrogène, soit par le transfert d'un simple électron [(Sanchez-Moreno, 2002) ; (Huang *et al.*, 2005)].

Les techniques du premier groupe sont employées pour évaluer la peroxydation lipidique en utilisant un substrat lipidique ou lipoprotéique. La quantification de cette propriété est exprimée par la mesure du degré d'inhibition de l'oxydation (Sanchez-Moreno et Larrauri, 1998).

Alors, les méthodes du deuxième groupe sont celles qui interviennent dans la mesure de la capacité du piégeage des radicaux libres. Elles comportent le balayage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de l'acide hypochloreux ($HOCl$), de l'hydroxyle ($OH\bullet$), des anions superoxyde ($O_2\bullet$), du peroxyde ($ROO\bullet$) et de l'oxyde nitrique ($NO\bullet$) (Sanchez-Moreno, 2002).

Parmi ces techniques, nous citons :

- ❖ la méthode d'ORAC (Capacité d'absorbance du radical de l'oxygène) (Cao *et al.*, 1993) ;
- ❖ la méthode d'ABTS (2,2-azinobis (3-éthyle-benzothiazoline-6-sulphonate) ou TEAC (Capacité antioxydante équivalente de Trolox) (Miller *et al.*, 1993) ;
- ❖ la méthode de FRAP (Capacités réductrices ferriques d'antioxydants) (Benzie et Strain, 1996) ;
- ❖ la méthode du radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Brand-Williams *et al.*, 1995) ;
- ❖ la méthode de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique (Nur alam *et al.*, 2013).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué par des feuilles de *Lawsonia inermis* (**Figure N°13**), récolté dans la Wilaya d'Adrar, située dans le sud-ouest d'Algérie. Les feuilles de la plante ont été séchées à l'ombre et à l'abri de l'humidité à température ambiante pendant quelques jours. Une fois séchées, ces dernières ont été réduites en poudre en utilisant un broyeur automatique puis soumises à l'extraction.



Figure N°13 : Photo des feuilles récoltées de *Lawsonia inermis*.

2. Méthodes:

2.1. Préparation des différents extraits de *Lawsonia inermis* :

Pour l'évaluation de l'activité antioxydante des feuilles de Henné, deux types d'extraits sont préparés : bruts (aqueux et eau/Méthanol) et spécifiques des tannins pour les feuilles de la plante.

2.1.1. Extrait brut aqueux

40 g de la matière végétale sont mises en contact avec 200mL d'eau distillée froide. L'ensemble est laissé macérer durant 24 h sous agitation continue. L'opération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant toutes les 24 heures. Les trois fractions sont réunies et filtrées puis évaporées à sec dans une étuve à une température de 45°C. Le produit est récupéré sous forme de solide de couleur marron (**Figure N°14**).

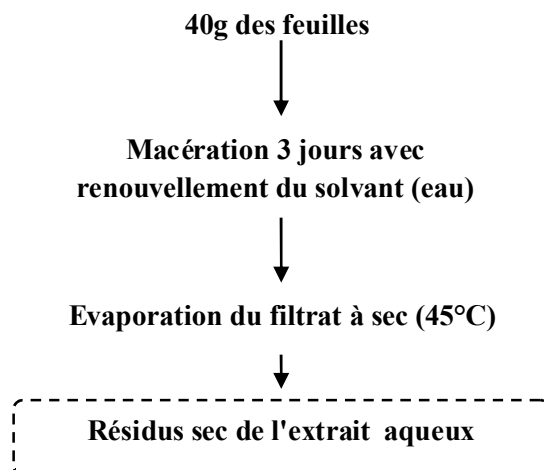


Figure N°14: Schéma de l'extraction aqueuse des feuilles de *Lawsonia inermis*

2.1.2. Extrait brute eau/Méthanol :

Selon la méthode de **Upson et coll. (1999)**, 5 g de la matière végétale séchée sont placées dans un récipient en verre couvert de 100 mL de méthanol aqueux 70% ; le tout est chauffé à 70°C pendant 5 minutes (ce procédé tue le tissu végétal et empêche l'oxydation ou l'hydrolyse enzymatique). L'échantillon est laissé macérer durant 24h, et l'opération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant.

Après filtration des fractions sur du papier filtre, elles sont réunies et évaporées à sec en utilisant un rotavapeur à température 45-50°C (**Figure N°15**).

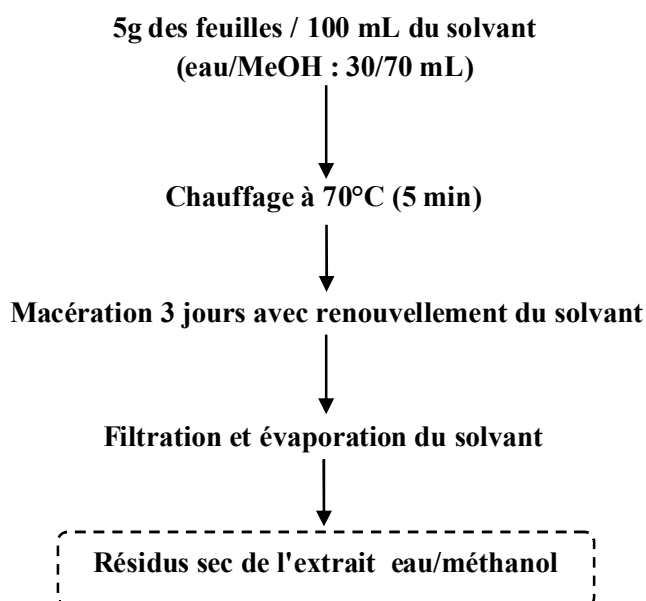


Figure N°15 : Schéma de l'extraction eau/méthanol des feuilles de *Lawsonia inermis*

2.1.3. Extrait des tannins :

L'extraction des tannins des feuilles de la plante *Lawsonia inermis*, est réalisée selon la méthode de **Zhang et coll., 2008**. Les broyats de la matière végétal (5 g) ont été extraits par 100 mL du mélange acétone/eau distillée (70/30 : V/V) durant trois jours à une T° ambiante. La solution obtenue est filtrée et évaporée à 40°C par un rotavapeur type bouché R-200 pour éliminer l'acétone, puis la phase aqueuse est lavée par le dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Après élimination de la phase organique, la phase aqueuse a été traitée deux fois avec l'acétate d'éthyle (V/V). Les 2 phases organiques obtenues sont réunies et évaporées à sec à 40°C par un rotavapeur. La phase aqueuse restante est traitée deux fois par le 1-butanol. Les phases de 1-butanol sont évaporées à sec, afin de récupérer l'extrait sous forme de poudre (**Figure N°16**).

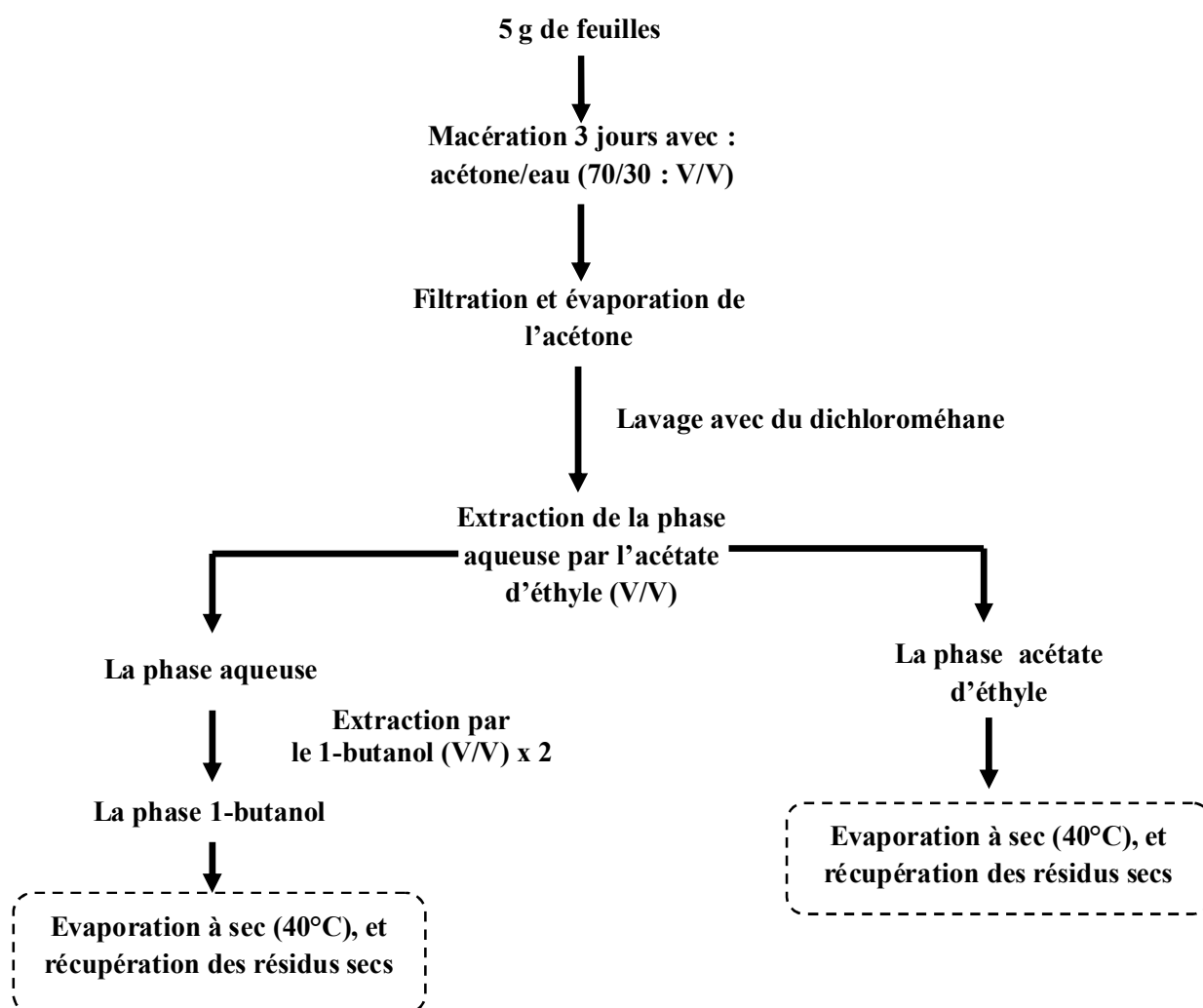


Figure N°16 : Schéma de l'extraction des tanins des feuilles de *Lawsonia inermis*

2.1.4. Le rendement des extraits secs :

Nous avons déterminé le rendement en extrait sec, en calculant le rapport entre le poids de l'extrait sec (poudre) en gramme, et le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme ; selon l'équation suivante:

$$\text{Rdt (\%)} = [(P1 - P2) / P3] \times 100$$

P1 : poids du ballon après évaporation ;

P2 : poids du ballon avant évaporation ;

P3: poids de la matière végétale initial.

2.2. Tests phytochimiques:

Les tests phytochimiques sont réalisés sur les extraits des feuilles de *Lawsonia inermis*.

- **Les tanins (Karumi et al., 2004) :**

On ajoute 3 gouttes de FeCl_3 1% à 1 mL d'extraits. Après deux minutes d'incubation, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue ou verte foncée.

- **Les flavonoïdes (Karumi et al., 2004):**

2 mL de chaque extrait végétal sont traités avec quelques gouttes d' HCL 37%, et avec 0.5 g de tournure de magnésium (Mg). Le test positif est marqué par l'apparition d'une couleur rouge ou orange qui caractérise les flavonoïdes.

- **Les terpénoides :**

On ajoute 1 mL de chloroforme et 1.5 mL de H_2SO_4 concentrée à 2.5 mL de nos extraits. La présence des terpénoides est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase.

- **Les stérols: réaction de Libermann-Burchard**

On traite 1 mL d'extrait avec 2.5 mL d'anhydride acétique et 10 gouttes d' H_2SO_4 concentrée. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée virant au vert.

- **Les coumarines :**

A 1 mL de chaque extrait, on ajoute 1 mL d'eau chaude. La solution obtenue est divisée en deux parties égales dont la première représente un témoin et la deuxième est traitée avec 0.5 mL de NH_4OH à 10%.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines (**Bruneton, 1999**).

- **Les alcaloïdes :**

2.5 mL d'HCl à 1 %, sont ajoutés à 0.1 mL d'extrait, et incubés au bain- marie pendant 10 min. La solution obtenue est divisée en deux parties. On ajoute à l'une le réactif de Mayer et à l'autre le réactif de Wagner. L'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

Réactif de Mayer: Dissoudre 1.358g d' HgCl_2 dans 60 mL d'eau distillée puis 5g de KI dans 10 mL d'eau distillée. Mélanger les deux solutions et ajuster le volume total à 100mL.

Réactif de Wagner: Dans 75mL d'eau distillée, dissoudre 2g de KI et 127g de I_2 . Le volume obtenu est ajusté à 100 mL avec l'eau distillée.

- **Les quinones libres:**

A un volume de 1mL de chaque extrait, on ajoute quelques gouttes de NaOH à 1%. L'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres (**Oloyede, 2005**).

- **Les saponosides :**

On ajoute 1 mL d'eau distillée à 2 mL de chaque extrait, puis la solution est agitée pendant 1 minute. La présence des saponosides est confirmée par l'apparition d'une mousse qui persiste durant 15 minutes. Le test est considéré comme positif si l'épaisseur de la mousse dépasse 1cm.

- **Les composés réducteurs :**

On ajoute à 1 mL de nos extraits 0.5 mL de Liqueur de Fehling A et B puis on chauffe les tubes au bain marie à 100°C. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique (**Trease et Evans, 1987**).

2.3. Evaluation de l'activité antioxydante :

2.3.1. Réduction du fer : FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*) :

2.3.1.1. Principe:

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antiradicalaire. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm (**Oyaizu, 1986**). Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (**Hubert, 2006**).

2.3.1.2. Mise en œuvre pratique:

Le protocole expérimental suivi est celui de **Karagözler et coll., 2008**.

1 mL de l'échantillon à différentes concentrations (0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5 et 3 mg/mL) dilué dans l'eau distillée est mélangé avec 2.5 mL d'une solution tampon phosphate (0.2M ; pH 6.6) et 2.5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%, puis on incube les tubes à 50°C pendant 20 minutes.

- Après refroidissement des tubes à température ambiante, on ajoute 2.5 mL d'acide trichloracétique (TCA) à 10% pour stopper la réaction.
- Les tubes sont centrifugés à 3000 tours/min pendant 10 minutes.
- Prélever 2.5 mL du surnageant et ajouter 2.5 mL d'eau distillée.
- On ajoute au mélange 500 μL d'une solution de chlorure de fer ($\text{FeCl}_3, 6 \text{ H}_2\text{O}$) à 0.1% fraîchement préparée. La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'acide ascorbique et BHT sont utilisés comme des contrôles positifs dans cette expérience dans les mêmes conditions.

3.2.1.3. Expression des résultats:

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonctions des différentes concentrations utilisées pour les différentes fractions des feuilles de la plante étudiée. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des fractions testées.

2.3.2. Test de piégeage du radical libre DPPH. (2,2-diphenyl 1-1picrylhydrazyl) :

2.3.2.1. Principe:

Le DPPH (2,2-Diphényl-1-1picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH $\cdot$ est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH $\cdot$, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon (figure N°17) (Parejo *et coll.*, 2003).

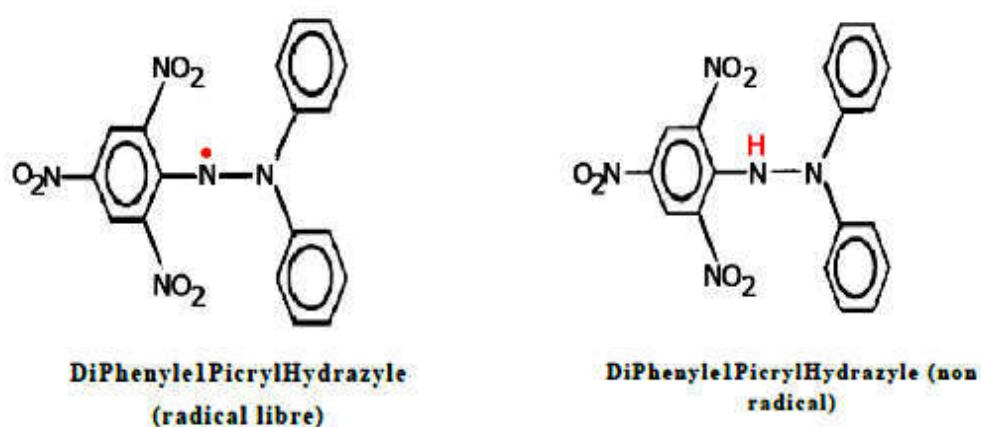


Figure N°17 : Forme libre et réduite de DPPH
(Molyneux, 2004)

2.3.2.2. Mise en œuvre pratique:

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical DPPH. L'effet de chaque extrait sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Sanchez-Moreno *et coll.*, 1998.

Un volume de 50 μ L de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1,95 mL de la solution méthanolique du DPPH (0.025g/L) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 50 μ L du méthanol avec 1,95 mL d'une solution méthanolique de DPPH.

Après incubation à l'obscurité pendant 30 min et à température ambiante la lecture des absorbances est effectuée à 515 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc pour chaque concentration qui contient 50 μ L de chaque concentration de l'extrait et 1,95 mL du méthanol.

2.3.2.3. Expression des résultats:

□ *Calcul des pourcentages d'inhibitions :*

Nous déterminons ainsi les pourcentages d'inhibition grâce à la formule suivante :

$$I\% = [(Ac - At)/Ac] \times 100$$

Ac : Absorbance du contrôle

At : Absorbance du test effectué

□ *Calcul des concentrations 50 " IC50" :*

IC50 (aussi appelée EC50 pour *Efficient concentration 50*), permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées en utilisant le logiciel Sigma-plot. [(Bertonceljet coll., 2007) ; (Marxen et coll., 2007) ; (Scherer et Godoy, 2009) ; (Fabriet coll., 2009)].

2.3.3. Test de blanchiment de β -carotène couplé à l'auto-oxydation de l'acide linoléique :

2.3.3.1. Principe :

Le β -carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits (Bougatef et al., 2009). Cependant, dans le test du blanchiment du β -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le β -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueuse en résultant le blanchiment du β -carotène (Unten et al., 1997). La présence des antioxydants comme les polyphénols réduisent l'ampleur de la destruction du β -carotène en neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système.

Le test de blanchiment de β -carotène utilisé pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de notre plantes est celui du Sun et Ho (2005).

2.3.3.2. Mode opératoire :

Une quantité de 2 mg de β -carotène est dissous dans 10 mL de chloroforme. On prélève 1mL de cette solution dans une fiole contenant préalablement 200 mg Tween 40 et 20 μ L d'acide linoléique. Cette solution est évaporée au rotavapeur (40°C) jusqu'à disparition de l'odeur du chloroforme. Puis, un volume de 100 mL de l'eau oxygénée diluée est ajouté dans la fiole et le mélange résultant est agité vigoureusement. Dans des tubes à vis, l'émulsion β -carotène/acide linoléique de 4 mL est additionnée à 200 μ L des extraits de différentes concentrations. Après une agitation proprement dite, l'absorbance est mesurée immédiatement à 470 nm ce qui correspond à $t = 0$ min contre le blanc contenant l'émulsion sans β -carotène. Les tubes bien fermés sont placés dans un bain marie à 50°C pendant 60 min. Ensuite, l'absorbance de chaque extrait est mesurée à 470 nm à des intervalles de 20min jusqu'à atteindre les 60 minutes. Le control négatif est constitué par 200 μ L de méthanol au lieu de l'extrait. Tous les échantillons sont répétés en deux essais. L'activité antioxydante (%) des extraits est évaluée en termes de blanchiment de β carotène en employant la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition\%} = [(A_{A60} - C_{C60}) / (C_{C0} - C_{C60})] * 100$$

Où

AA(600) : représente l'absorbance en présence de l'extrait (antioxydants) à 60 min ;

Cc(60) : représente l'absorbance du contrôle à 60 min ;

Cc(0) : représente l'absorbance du contrôle à 0 min.

La valeur EC50 est définie comme la concentration des antioxydants correspondant à 50 % d'inhibition. Elle est calculée en traçant la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Etude phytochimique :

1.1. Les tests phytochimiques :

Le screening phytochimique est un ensemble de méthodes et de techniques de préparation et d'analyse des substances organiques naturelles de la plante, ainsi que la détection des groupes chimiques responsables des effets thérapeutiques. Les tests de caractérisation sont basés en partie sur l'analyse qualitative, soit sur la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit sur la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration (Badiaga, 2011).

Les résultats expérimentaux des tests phytochimiques effectués sur les trois extraits bruts de *Lawsonia inermis* sont mentionnés dans le **tableau N°2**. Nous remarquons que tous les extraits testés sont riches en tanins. Les flavonoïdes, les terpénoides, les alcaloïdes et les quinones libres sont abondants dans tous les extraits. Tandis qu'une faible quantité de composés réducteurs, de stérols et de coumarines a été enregistrée dans les extraits eau/acétone et méthanolique.

Une absence totale des saponosides est notée dans tous les extraits testés.

Tableau N°2 : Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les différents extraits de *Lawsonia inermis*.

Tests Extractions	Aqueux	Eau/Méthanol	Eau/Acétone
Tanins	+++	+++	+++
Flavonoïdes	++	++	+++
Terpénoides	++	++	+++
Stérols	-	+	+
Coumarines	-	+	+
Alcaloïdes	+++	++	+++
Quinones libres	++	++	+++
Saponosides	-	-	-
Composés réducteurs	-	+	+

- : absence totale.

+ : Présence en quantité faible.

++ : Présence en quantité moyenne.

+++ : Présence en quantité abondante.

Des études réalisées sur les feuilles du genre *Lawsonia* ont rapportées la présence de métabolites secondaires tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins et les quinones (Wagini et al, 2014). Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés dans l'étude de **Wagini et ses collaborateurs (2014)**, en revanche la révélation des stérols et saponosides est contradictoire avec nos résultats. Cette différence est due à l'intervention de plusieurs facteurs tel que : la nature du solvant, le lieu géographique, la période de récolte et la méthode d'extraction. Les différents composés phytochimiques détectés sont connus pour avoir une importance bénéfique dans les sciences industrielles et médicales (Wagini et al., 2014).

1.2. Les rendements en extraits secs :

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondants dans les feuilles de Henné, nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits aqueux, hydro-méthanoliques et les tannins (fraction acétate d'éthyle, 1-butanol et dichlorométhane).

Le rendement déterminé par rapport à 40 grammes de matière végétale sèche et broyée est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure N°18.

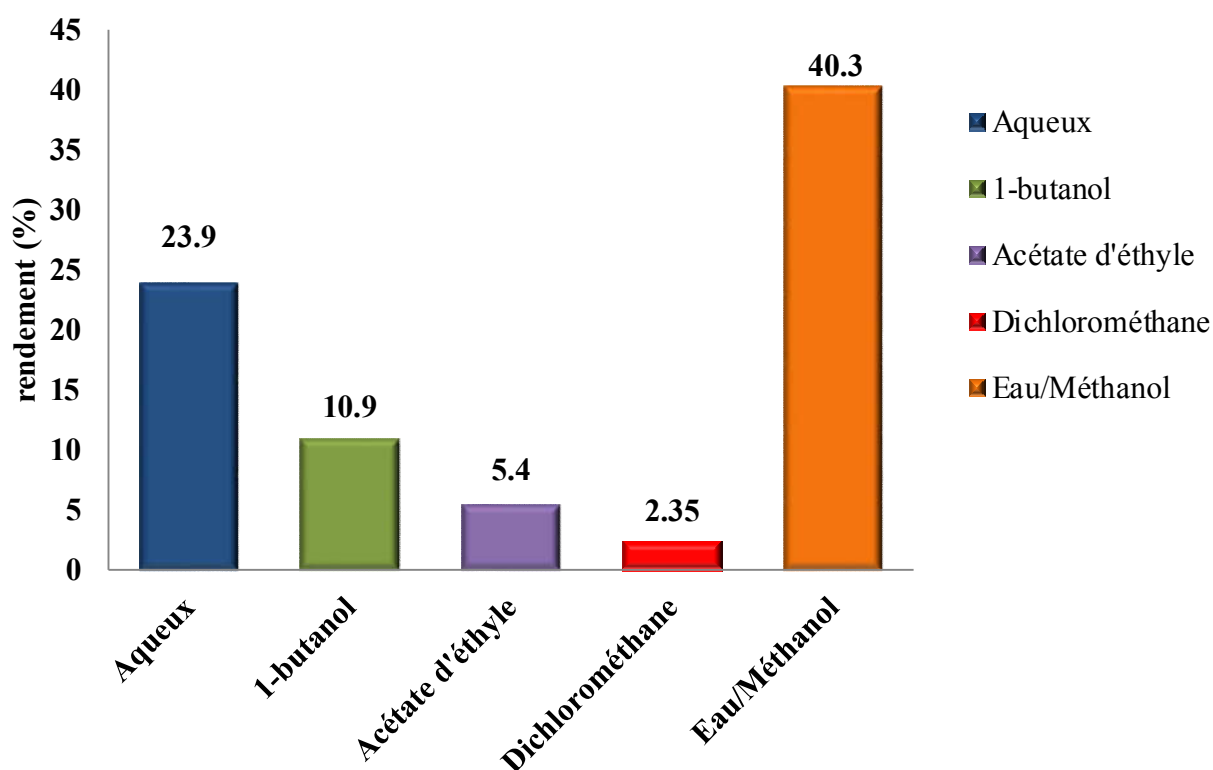


Figure N°18: Rendements des extraits des feuilles de la plante *Lawsonia inermis*.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que l'extrait eau/méthanol représente le rendement le plus élevé, avec un pourcentage estimé à 40.3% suivi par l'extrait aqueux à 23.9%. Concernant l'extrait des tanins, des teneurs importantes sont enregistrées. Le rendement le plus élevé est obtenu dans la fraction 1-butanol avec un taux de 10.9%, suivi de la fraction acétate d'éthyle avec un taux de 5.4%. La fraction dichlorométhane représente le taux le plus faible avec un pourcentage de 2.35%. Ces rendements viennent confirmer les intensités des résultats des tests phytochimiques.

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale, de l'organe utilisé dans l'extraction, des conditions de séchage, du contenu de chaque espèce en métabolites et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou le fractionnement et de sa polarité.

Il est important de noter que les tanins sont des substances reconnues pour leurs propriétés antioxydantes, leurs effets antiseptiques et leurs propriétés de renouvellement des tissus ce qui pourrait expliquer l'utilisation traditionnelle des feuilles de la plante *Lawsonia inermis* dans le traitement des plaies, des furoncles et des abcès (Bruneton, 2009).

2-Activité antioxydante :

2-1-Test de la réduction du fer « FRAP » (*Ferric reducing-antioxidant power*) :

C'est une méthode de mesure de la capacité des substances de nos extraits à réduire le fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+} . C'est une technique rapide, facile et reproductible (Karagozler *et al.*, 2008).

La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Yang *et al.*, 2008).

Au cours de notre travail, nous avons évalué l'activité antioxydante des différents extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* en utilisant la méthode de FRAP et les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. L'acide ascorbique qui est un puissant antioxydant, est utilisé comme témoin. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans la figure N°19, montrent qu'au niveau de chaque espèce, la réduction du $Fe(3+)$ en $Fe(2+)$ est plus importante au fur et à mesure que l'on augmente la concentration en extrait.

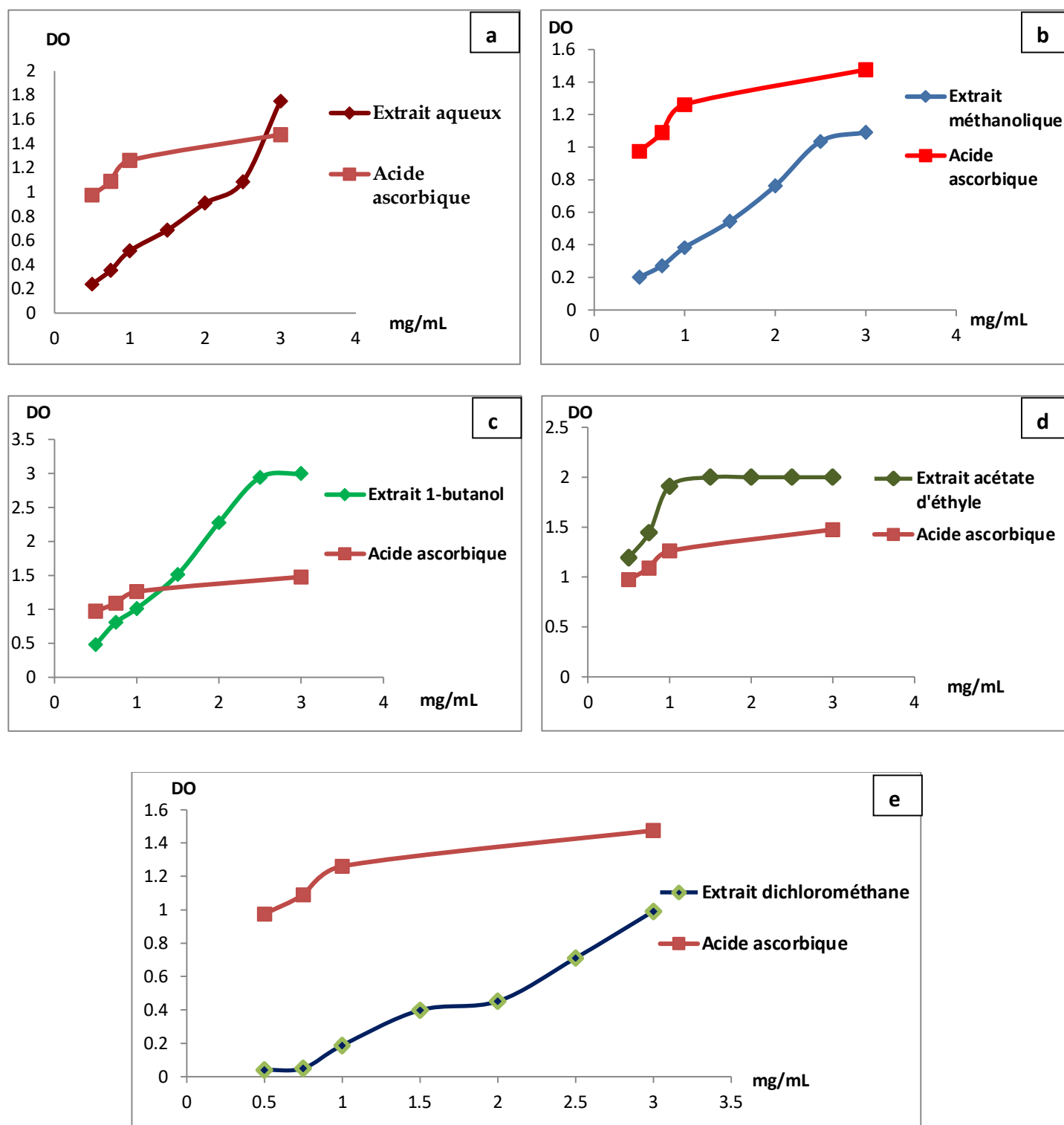


Figure N°19 : Pouvoir réducteur des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* par la méthode de FRAP.

a : Extrait aqueux, **b :** Extrait eau-méthanol, **c :** Extrait 1-butanol, **d :** Extrait acétate d'éthyle, **e :** Extrait dichlorométhane.

D'après les graphes de la **figure 19 (d)**, nous remarquons que l'extrait acétate d'éthyle présente une activité importante de réduction du fer qui atteint sa valeur maximale et stationnaire avec une $DO=2$ à une concentration de 1.5mg/mL, suivi de la fraction 1-butanol qui a atteint une DO maximale égale à 3 à une concentration de 3mg/mL.

Les fractions acétate d'éthyle et 1butanol des tanins ont une capacité à réduire le fer largement supérieure à celle de l'acide ascorbique (6mg/mL).

En comparant les différents extraits de la plante, on remarque que la capacité à réduire le fer pour l'extrait aqueux est plus inférieur à celle des deux fractions de tanins (**Figure 19 (a)**).

Nous remarquons que les extraits méthanolique et dichlorométhane représentaient respectivement dans **les figures 19 (b) et (e)**, montrent une faible capacité de réduire le fer avec des valeurs de densité optique qui ne dépassent pas la valeur de 1 comparée à l'acide ascorbique (1.47).

Si on classe nos extraits selon la puissance de réduction de fer par rapport à l'acide ascorbique à la concentration de 1,5 mg/mL, on obtiendra l'ordre suivant: Acétate d'éthyle > 1- butanol > Acide ascorbique > Aqueux > Eau/méthanol > Dichloromethane.

De ce classement, nous pouvons déduire que l'activité antioxydante de l'extrait acétate d'éthyle et butanolique des feuilles peut être due aux tanins et celle de l'extrait aqueux à l'effet synergique entre les composés de cet extrait. Par contre, les autres extraits ont présenté une activité faible par rapport aux extraits cités précédemment.

Ce test montre en effet, que le pouvoir réducteur des espèces est probablement dû à la présence de groupement hydroxyle dans les composés phénoliques contenus dans ces extraits qui peuvent servir comme donneur d'électrons. Par conséquent, les antioxydants sont considérés comme des réducteurs désactivant les oxydants. Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle [(Jeong *et al.*, 2004) ; (Kumaran et Karunakaran, 2007)].

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Guha et ses collaborateurs (2011)** qui ont montré que l'extrait aqueux de Henné était un réducteur de Fe^{3+} plus fort que l'extrait méthanolique. De même les travaux de **Madhumitha et son équipe en 2011**, ont démontré que la capacité de l'extrait aqueux de Henné à réduire le Fe(III) est comparable à celle de l'acide ascorbique.

Cette étude a montré aussi que l'activité anti-oxydante et les concentrations des extraits en composés phénoliques et en flavonoïdes sont proportionnelles les unes aux autres.

L'extrait ethanologique de graines de Henné est un antioxydant efficace, qui peut être utilisé pour une isolation supplémentaire de composés actifs et des applications pharmaceutiques.

2-2- Test de piégeage du radical libre DPPH :

Le test de DPPH est un des tests les plus utilisés pour déterminer l'activité antiradicalaire des extraits de plantes (**Laguerre et al., 2007**) . Cette activité peut être évaluée vis-à-vis du radical DPPH à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH•) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 515nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires (**Majhenič et al., 2007**).

Dans notre travail nous avons étudié l'activité antioxydante des feuilles de la plante *Lawsonia inermis* par la méthode de DPPH afin de déterminer la fraction la plus active où l'acide ascorbique et le BHT sont utilisés comme molécules de références.

A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée dans la partie matériel et méthodes. Les valeurs obtenues ont permis de tracer des courbes représentées sur **la figure N°20**, qui représentent la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de nos extraits. Nous avons déterminé graphiquement la concentration correspondante à 50 % d'inhibition (IC50) de chaque extrait.

Les résultats expérimentaux sont représentés dans les figures ci-dessous.

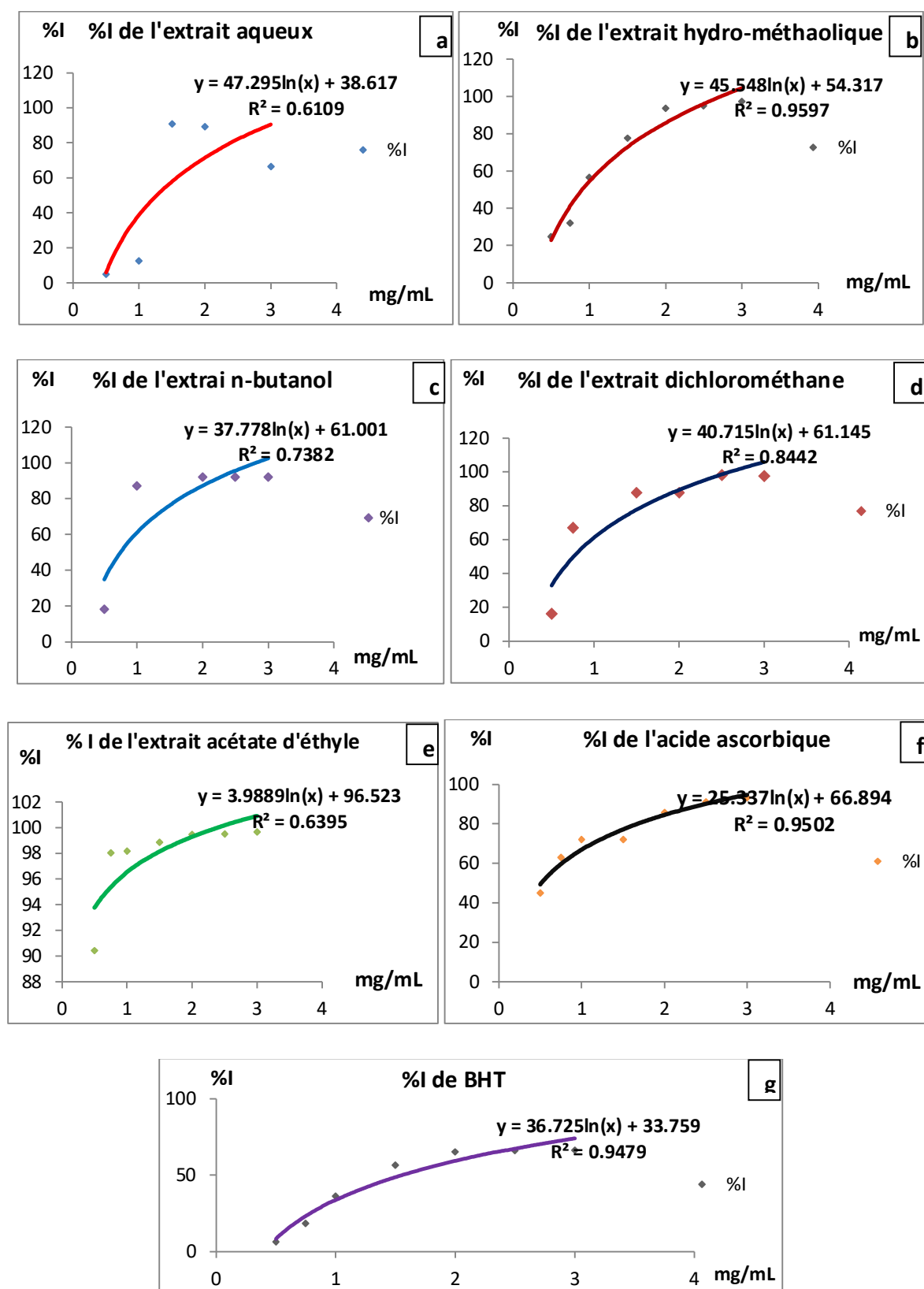


Figure N°20 : Pourcentage d'inhibition du radicale libre DPPH· en fonction des différentes concentrations des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis*.

a : Extrait aqueux, **b :** Extrait eau/méthanol, **c :** Extrait 1 butanol, **d :** Extrait dichlorométhane, **e :** Extrait acétate d'éthyle, **f :** Acide ascorbique et **g :** BHT.

Nous remarquons que l'extrait acétate d'éthyle représenté dans **la figure N°20 (e)** possède une activité très élevée de piégeage du radical DPPH[•] par rapport aux autres extraits. Ceci est montré par l'allure des graphes qui correspond à une courbe exponentielle avec la présence d'une phase stationnaire qui définit la réduction presque totale du radical DPPH en sa forme non radicalaire. Cet extrait a présenté à une très faible concentration (0.75mg/mL) des pourcentages d'inhibition importants (98%) contrairement à l'acide ascorbique et au BHT où leurs pourcentages maximaux étaient à 93,18% et 66,19% respectivement à une concentration de 2mg/mL.

Pour la même concentration, l'extrait hydro-méthanolique produit un pourcentage d'inhibition de 32 % (**Figure N°20 (b)**) et l'extrait aqueux a présenté le plus faible pourcentage de réduction et qui est égale à 10% (**Figure N°20 (a)**).

Concernant les fractions 1-butanol et dichloromethane représentées respectivement dans les **figures N°20 (c) et (d)**, elles présentent une activité presque similaire. Nous remarquons que pour une concentration de 3 mg/mL, le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 97.47% et 91.96% pour le 1 butanol et le dichloromethane respectivement.

A partir des graphes de **la figure N°20**, nous constatons que tous nos extraits ont présenté une activité de piégeage du radical DPPH plus importante que celle de BHT et similaires à celle de l'acide ascorbique. Les composés phénoliques semblent être de bons candidats pour l'activité antioxydante, du fait de la présence de nombreux hydroxyles pouvant réagir avec les radicaux libres (**Sokół-Lętowska et al., 2007**).

Les valeurs des IC₅₀ trouvées pour tous les extraits testés de *Lawsonia inermis* sont représentées dans le **tableau N°03** et sur **la figure N°21** sous forme d'histogramme.

Tableau N°03: Valeurs des IC50 trouvées pour les extraits de *Lawsonia inermis*, de l'acide ascorbique et de BHT.

Extrait	IC50
Aqueux	1,345
Eau/ méthanol	0,906
Dichlorométhane	0,760
Acétate d'éthyle	$8,60 \cdot 10^{-6}$
1-butanol	0,747
Acide ascorbique	0,513
BHT	1,556

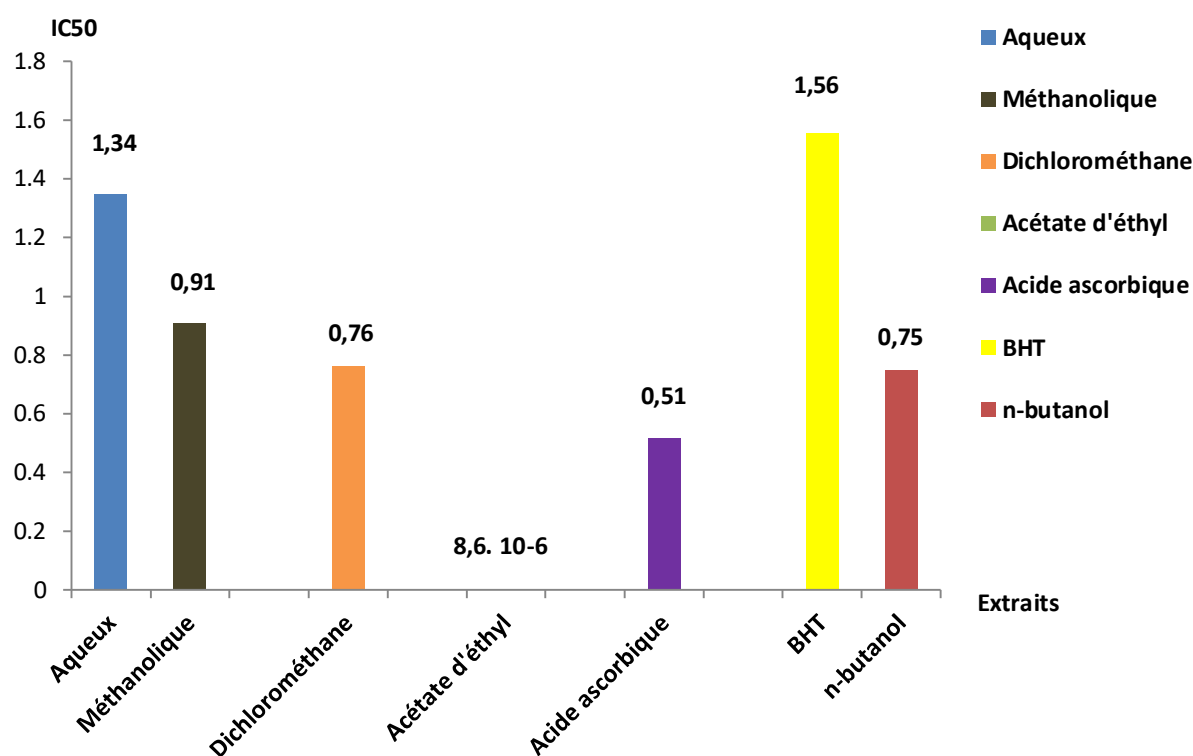


Figure N°21:

Histogramme des valeurs des IC50 des différents extraits de *Lawsonia inermis*, de l'acide ascorbique et du BHT.

L'effet scavenger des extraits vis-à-vis du radical DPPH• est exprimé par la concentration inhibitrice à 50% (IC50) qui correspond à la concentration des extraits nécessaire pour inhiber ou réduire 50% de la concentration initiale du DPPH•. Une IC50 faible représente l'activité anti-radicalaire la plus élevée (**Kadri et al., 2011**). Tous les IC50 sont calculés à partir de la partie linéaire des courbes de pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des différents composés à tester

D'après les IC50 obtenus dans **le tableau N°3**, nous constatons que l'extrait acétate d'éthyle présente l'IC50 la plus faible ($8,6054 \cdot 10^{-06}$ mg/mL) comparé à celle de l'acide ascorbique (0,51 mg/mL), ce qui signifie une activité antioxydante importante. Ces résultats permettent de classer les extraits par rapport aux standards selon leur pouvoir antioxydant par ordre décroissant (fraction acétate d'éthyle > acide ascorbique > fraction 1-butanol > fraction dichlorométhane > extrait hydro-méthanolique > extrait aqueux > BHT).

Des travaux réalisés par **Hsouna et ses collaborateurs en 2011**, ont montré des propriétés antioxydantes pour différents extraits de feuilles de *Lawsonia inermis*, en particulier avec l'acétate d'éthyle, le 1-butanol et avec l'eau. Tous ces extraits possèdent des activités antioxydantes avec des IC50 inférieures à 10 µg/mL. Il a été rapporté que l'activité de piégeage des radicaux libres est fortement influencée par la composition phénolique de l'échantillon.

L'équipe de **Madhumitha en 2011**, ont trouvé que les extraits aqueux, éthanolique, dichlorométhane et éther de pétrole ont pu piéger les radicaux DPPH avec un IC50 très proche de l'acide ascorbique. Le balayage du radical DPPH par les extraits de dichlorométhane et éther de pétrole peut être due à la présence de traces de composés phénoliques. Les phytostérols sont des triterpènes qui sont des composants graphiques structurels importants des membranes plasmiques qui peuvent avoir une activité antioxydante (**Moreau, Whitaker et al. 2002**).

De même **Enneb et ses collaborateurs (2015)**, ont montré que l'évaluation de l'activité antioxydante de *Linermis* vis-à-vis de DPPH, a révélé que les extraits méthanoliques des différents organes de Henné testés exhibent un pouvoir antioxydant intéressant. Le taux le plus important a été enregistré dans l'extrait des feuilles (IC50 = 25.73 µg/mL). Ce pouvoir inhibiteur de Henné pourrait être utilisé à des fins thérapeutiques notamment un adjuvant aux traitements dermatiques.

2-3-Test de blanchissement du β - carotène :

Cette méthode consiste à la mesure de la capacité de nos extraits à minimiser la décoloration de la β -carotène.

La cinétique du blanchissement ou de décoloration de la β -carotène en présence et absence des extraits de feuilles de *Lawsonia inermis* et des deux références (BHT et Acide ascorbique), ainsi que les pourcentages d'inhibition de la peroxydation lipidique (%IPL) sont présentés dans les **figures N°22 et N°23** respectivement.

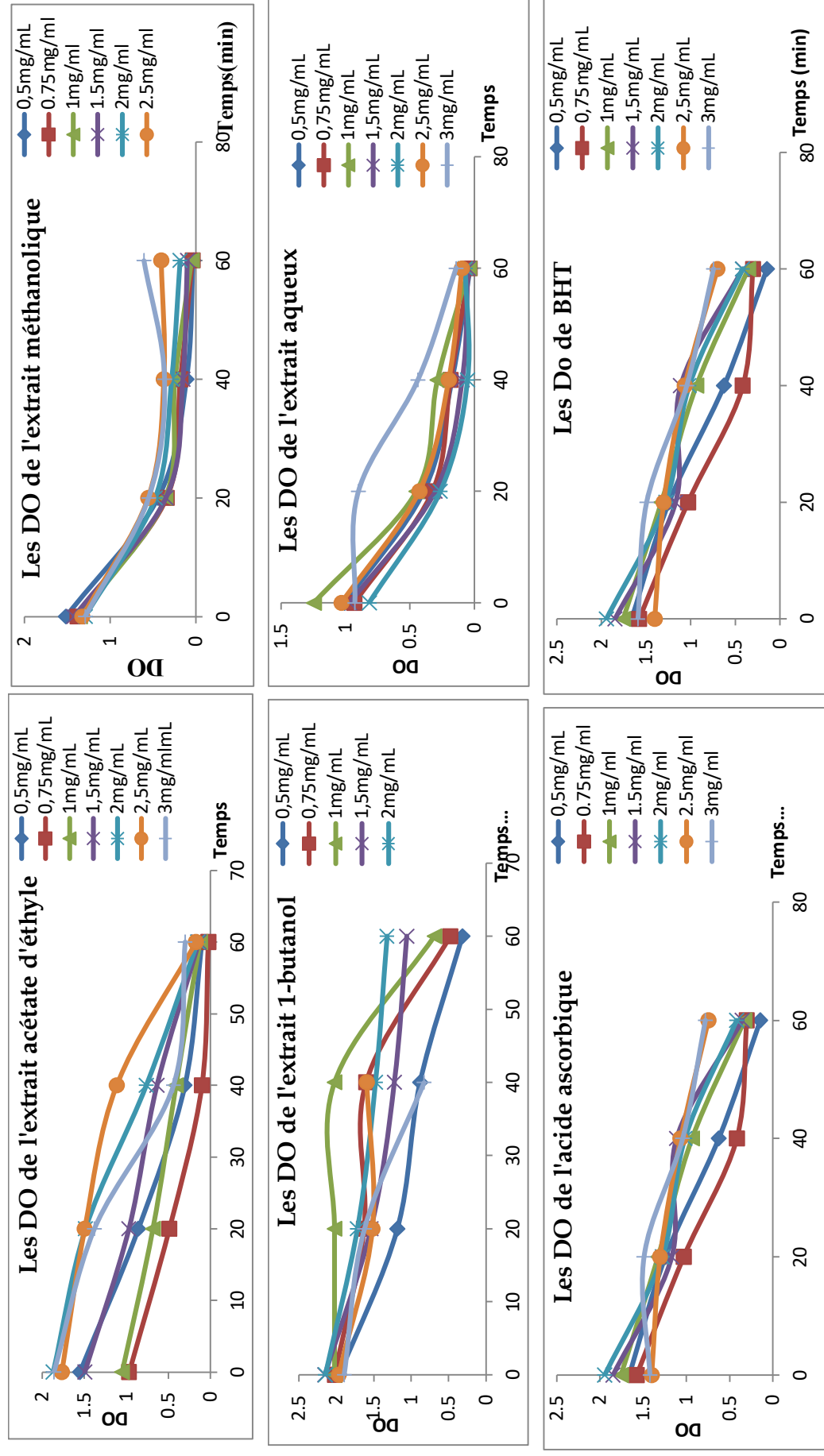


Figure N°22 :

Cinétique de blanchissement du bêta carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de feuilles de *Lawsonia inermis*, du BHT et de l'acide ascorbique en fonction du temps.

A partir des courbes de cinétique de blanchissement du β -carotène représenté dans la **figure N°22**, on remarque que tous les extraits de Henné ainsi que le BHT et l'acide ascorbique exercent un grand effet préventif significatif contre l'oxydation du β -carotène par les radicaux peroxydes, en comparaison avec le contrôle négatif qui a produit une décoloration et une diminution rapide de l'absorbance durant 60 minutes d'incubation.

La diminution de l'absorbance est due à l'oxydation du β -carotène par l'acide linoléique. L'ajout d'une substance antioxydante, joue un rôle protecteur et inhibe ou ralentit cette oxydation.

La **figure N°23** présente l'effet des extraits de feuilles sur l'oxydation de β -carotène par les produits de la dégradation de l'acide linoléique. On remarque que l'ensemble des extraits inhibent la décoloration de la β -carotène à différentes valeurs par le piégeage de radicaux libres.

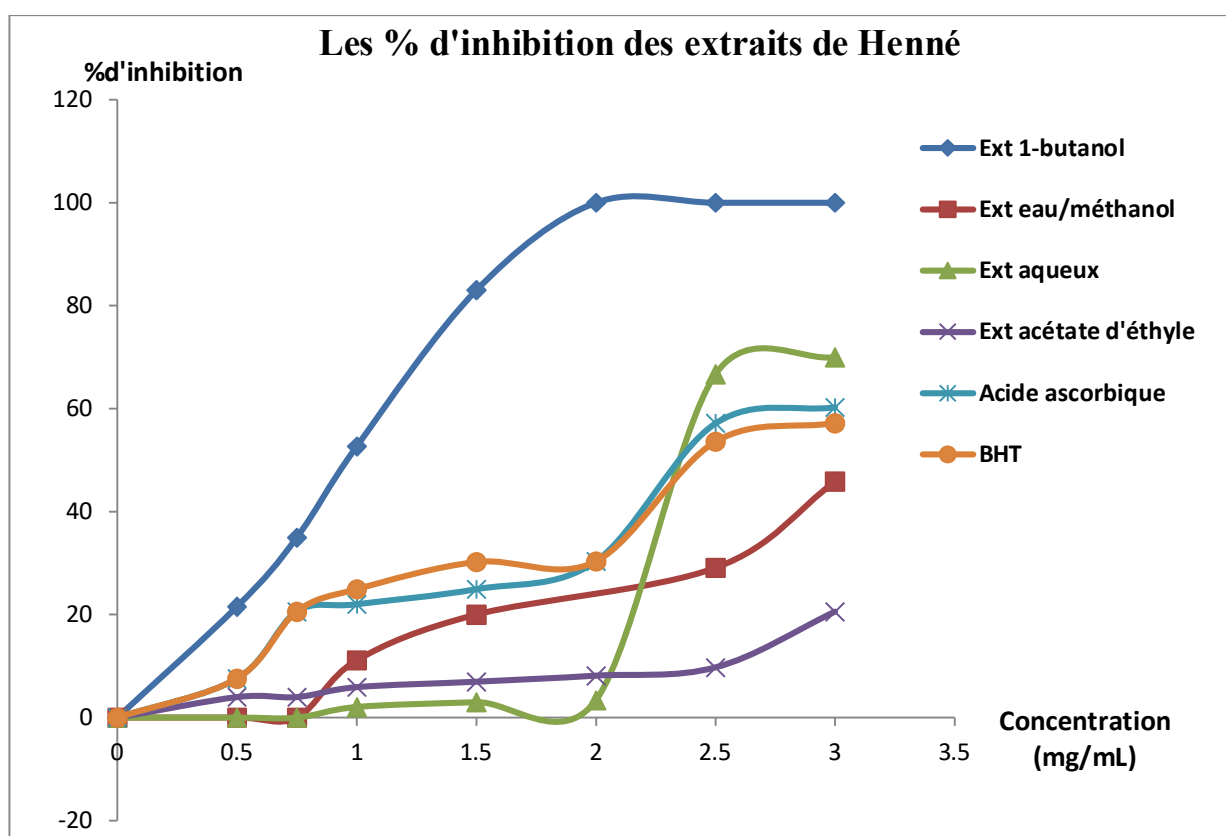


Figure N°23 :

Pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β carotène en fonction des concentrations des extraits de *Lawsonia inermis* et des témoins positifs.

A une concentration de 1.5mg/mL la fraction 1-butanol révèle la plus grande activité inhibitrice estimée à 83% par rapport à l'acide ascorbique (% I=24.93%) et au BHT (% I=30.24%). Pour les autres extraits le pourcentage d'inhibition est de l'ordre de 20%, 6,95% et 3% pour l'extrait eau-méthanol, la fraction acétate d'éthyle et l'extrait aqueux respectivement à la même concentration, ce qui signifie une faible activité inhibitrice.

En termes d'efficacité, la valeur d'IC₅₀ la plus faible possède la capacité inhibitrice des radicaux la plus élevée. De ce fait, on remarque dans le **tableau N°4** et sur la **figue N°24** que la fraction 1-butanol a un IC₅₀ de 0.995mg/mL suivie de l'extrait aqueux et l'extrait eau-méthanol ayant des valeurs de 1.874 et 2.728µg/mL, respectivement; tandis que la fraction acétate d'éthyle présente l'efficacité la plus faible avec une IC₅₀ élevée estimé à 7.3 mg/mL.

Tableau N°4 : Valeur des IC₅₀ des extraits de *Lawsonia inermis*, de BHT et de l'acide ascorbique.

Echantillon:	IC ₅₀ (mg/mL)
Ext 1-butanol	0,995
Ext eau/méthanol	2,728
Ext aqueux	1,874
Ext acétate d'éthyle	7,3
Acide ascorbique	2,186
BHT	2,331

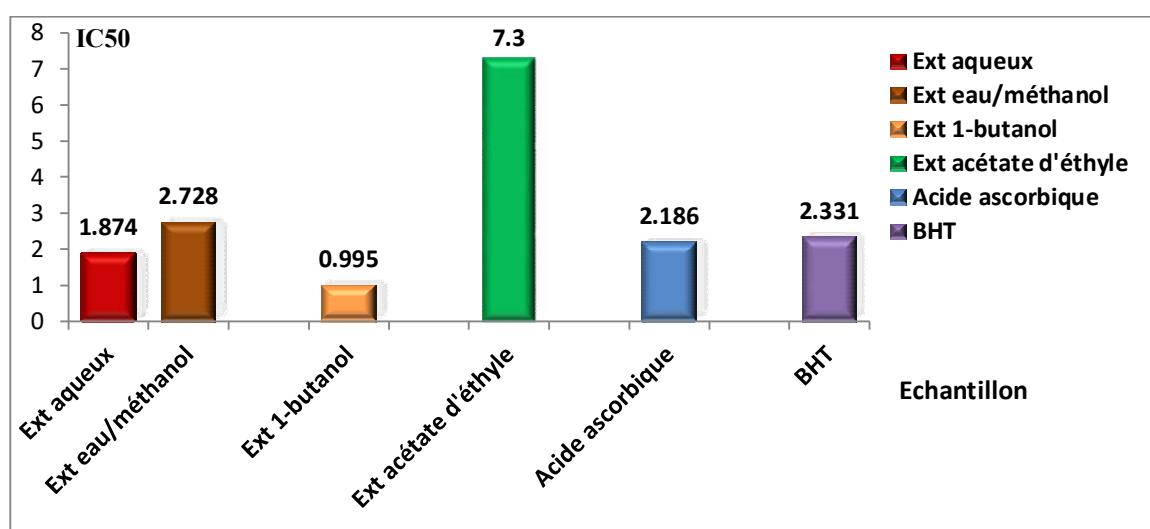


Figure N°24 :

Histogramme qui représente les IC₅₀ des différents extraits de *Lawsonia inermis*, de l'acide ascorbique et de BHT.

Nous remarquons que la fraction 1-butanol et l'extrait aqueux ont montré une forte activité antioxydante avec des valeurs d'IC₅₀ qui sont nettement inférieures à ceux du BHT (IC₅₀=2.331mg/mL) et de l'acide ascorbique (IC₅₀=2.186mg/mL).

Des études réalisées par **Hsouna et son équipe (2011)**, ont montré que les fractions n-hexane, acétate d'éthyle, 1-butanol et l'eau présentent une activité antioxydante dépendante de la concentration, à l'exception des fractions chloroformiques. Lors de la comparaison des valeurs d'IC₅₀, il a été trouvé que l'ordre des activités antioxydantes était le suivant : le n-hexane>l'eau> l'acétate d'éthyle > le 1-butanol.

Des études récentes ont mis en évidence que la polarité et l'hydrophobicité des agents antioxydants sont deux facteurs importants dans les systèmes de biomembranes (**Terpinc et al., 2009**). C'est la raison par laquelle beaucoup de chercheurs qui travaillent sur l'activité antioxydante choisissent le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplés à celle du β - carotène comme modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (**Ferreria et al., 2006**).

A la lumière de ces résultats, les extraits bruts et ceux des tanins ont un effet inhibiteur contre la peroxydation lipidique par clivage des réactions de peroxydation lipidique en chaînes par piégeage du radical peroxy $\text{LOH}^\bullet$, par conséquent ils constituent une source prometteuse de potentiel thérapeutique.

Les différentes activités de balayage des extraits contre les radicaux DPPH, peroxydes et Fe^{3+} peuvent être dues aux différents mécanismes des réactions radicaux-antioxydants dans ces essais. La stœchiométrie des réactions entre les composés antioxydants contenus dans les extraits et le DPPH $^\bullet$, les radicaux peroxydes et Fe^{3+} sont distinctement différents, ce qui peut être expliqué par la différence dans le potentiel de balayage.

La diversité du balayage des radicaux dans ces essais peut également être due à des facteurs tels que la stéréo-sélectivité des radicaux ou la solubilité différentielle des extraits dans les trois systèmes d'essai (**Yu et al., 2002**). Par conséquent, la différence d'efficacité considérable des antioxydants des extraits testés dans les trois modèles est justifiée.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les composés antioxydants font l'objet de nombreux travaux car, en plus de leur utilisation comme des conservateurs dans les denrées alimentaires en remplaçant les antioxydants de synthèse, ils interviennent dans le traitement de nombreuses maladies.

Dans le cadre de la découverte de nouveaux antioxydants à partir des sources naturelles, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'étude des composés phénoliques et l'évaluation des propriétés antioxydantes des extraits de feuilles de la plante médicinale du Sud-Ouest Algérien : *Lawsonia inermis*

Ces molécules naturelles de nature phénolique sont très recherchées en phytothérapie vue les effets secondaires des médicaments et les séquelles néfastes des antioxydants de synthèse à savoir le BHA et le BHT.

Pour valoriser cette espèce, des extraits de métabolites secondaires des feuilles ont été évalués par des méthodes chimiques. Les tests phytochimiques menés sur cette plante ont montré une richesse remarquable en métabolites secondaires susceptibles d'avoir des propriétés pharmacologiques intéressantes. Les résultats obtenus ont montré que notre plante est riche en alcaloïdes et en phénols totaux représentés majoritairement par les tannins, les flavonoïdes et les quinones libre. Tandis que la fraction de coumarines et de composés réducteurs dans l'extrait eau/méthanol et eau/acétone était faible.

Cette espèce végétale a présenté des rendements variables en extraits. Le rendement le plus élevé est celui de l'extrait eau-méthanolique (40.3%) suivi de l'extrait aqueux (23.9%). Concernant l'extrait des tanins, des teneurs importantes sont enregistrées. Le rendement le plus élevé est obtenu dans la fraction 1-butanol suivi de la fraction acétate d'éthyle

L'activité antioxydante des différents extraits de Henné est évaluée par trois méthodes différentes à savoir: le test de réduction de fer, la méthode de réduction de radical libre DPPH· et le test blanchissement du β -carotène. Les résultats obtenus ont révélé que les extraits de tanins des feuilles de *Lawsonia inermis* ont une importante activité antioxydante qui varie en fonction du solvant d'extraction et de la concentration des extraits. Ces derniers ont exercé une bonne activité réductrice du fer, une activité anti radicalaire vis-à-vis du radical DPPH et une activité inhibitrice du blanchissement de β -carotène supérieure à celle de l'acide ascorbique et du BHT.

Ces résultats ne constituent qu'une première étape de valorisation de cette espèce végétale. Ainsi, il est intéressant d'approfondir cette étude par:

- a- des extractions sélectives des différentes familles chimiques;
- b- Tester les différentes molécules isolées *in vivo* afin de trouver une application thérapeutique de ces molécules actives;
- c- Evaluer d'autres activités de *Lawsonia inermis*;
- d- Il serait également intéressant de compléter ce travail par la purification et l'identification de diverses molécules isolées en utilisant des techniques de chromatographie liquide à haute performance.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- **Akroum S., (2011).** Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels. Thèse de Doctorat en Science de l'Université de Constantine
- **Babili, F. E., Bouajila, J., Valentin, A., & Chatelain, C., (2013).** Lawsoniainermis: its anatomy and its antimalarial, antioxidant and human breast cancer cells MCF7 activities. *Pharmaceut Anal Acta*, 203.
- **Badiaga M., (2011).** Etude ethnobotanique ; phytochimique et activité biologique *Nauclea latifolia* Smith., une plante médicinale Africaine récoltée au Mali. *Thèse de doctorat en chimie organique. Université de Bamako.*
- **Benaissa O., (2011).** Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 63p.
- **Benariba N., Djaziri R., Zerriouth B.H., Boucherit K., Louchami K., Sener A et Malaisse W.J., (2009).** Antihyperglycemic effect of *Citrullus colocynthis* seed aqueous extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *Metab. and Func. Res. on Diabetes*, 2: 71-76.
- **Bertoncelj J., Dobersek U., Jamnik M. et Golob T., (2007).** Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*, 105 :822-828.
- **Bhat, S.V., Nagasampagi, B.A., Sivakumar, M., (2005).** Chemistry of Natural Products. Narosa Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi.
- **Boudjouref M., (2011).** Etude de l'activité antioxydant et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L.. Mémoire de Magister. Université de Sétif.
- **Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y et Nasri M., (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114, 1198-1205.
- **Bouhadjera K., (2005).** Contribution à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes *Oudney africain r.br.* et *Aristide pungens l.* thèse Diplôme de Doctorat d'état université Abou bekr belkaid Algérie 149p.
- **Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C., (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie*, 28: 25-30.

- **Brunet, S. (2008).** *Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestif des ruminants* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- **Bruneton, J., (1999).** Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- **Bruneton, J., (1993).** Pharmacognosie – Phytochimie et plantes médicinales. 2ème édition Lavoisier–Paris. pp 363-364-467-474.
- **Cao, G. et Prior, R.L., (1998)** "Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum." *Clin.Chem*, 44: 1309-1315.
- **Cavin A., (1999).** Investigations phytochimiques des trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires. *Tinospora crisp* (Menispermaceae), *Merremia emarginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae). Thèse de doctorat, Lausanne, 243 p.
- **Chetty K.M., (2008).** Flowering plants of Chittoor, Edn 1, Andhra Pradesh, pp 132.
- **Chira, K., Suh, J. H., Saucier, C., &Teissèdre, P. L., (2008).** Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6(2), 75-82.de la défense antioxydante. Nutrition clinique et métabolisme. 16 : 233-239.
- **Cowan M.M., (1999).** Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12:564-582.
- **Didier, D. S., Emmanuel, M. M., Alfred, N., France, K. M., & Lagarde, B. J., (2011).** Ethnobotanique et phytomédecine des plantes médicinales de Douala, Cameroun. *Journal of Applied Biosciences*, 37, 2496-2507
- **Eddouks, M., Ouahidi, M. L., Farid, O., Moufid, A., Khalidi, A., & Lemhadri, A., (2007).** L'utilisation des plantes médicinales dans le traitement du diabète au Maroc. *Phytothérapie*, 5(4), 194-203.
- **El Youbi, A. E. H., Boust, D., Jamoussi, B., Greche, H., El Mansouri, L., Benjilali, J., & Soidrou, S. H., (2012).** Activités antioxydante, apoptotique et antiproliférative de *Tetraena gaetula* (Emb. & Maire) Beier & Thulin et de *Berberis hispanica* Boiss. & Reut. originaires du Maroc. *Phytothérapie*, 10(3), 151-160.
- **Enneb, H., Belkadhi, A., Cheour, F., et Ferchichi, A., (2015).** Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis* L.). *Journal of New Sciences*, 20.

- **Fabri R.L., Nogueira M.S., Braga F.G., Coimbra E.S. et Scio E. (2009).** *Mitracapus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology*, 100: 428-433.
- **Fagbohoun L, Gbaguidi A. Fernand, Ayedoun A. Abel, Mathe Carole Moudachirou Mansourou et Vieillescazes Cathy (2014).** Etudes ethnobotanique et phytochimique des plantes tinctoriales sources de colorants naturels et matériaux résineux traditionnels du Bénin dans le domaine artisanal (Ifangni/Bénin) *SFE* in Press.
- **Favier A., (2003).** "Le stress oxydant." L'actualité chimique 108.
- **Ferreria A., Proenca C., Serralheiro L.M.L., Aranja M.E.M., (2006).** The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, **108** : 31-37.
- **Ford R.A., Hawkins D.R., Mayo B.C., Api A.M., (2001).** The in vitro dermal absorption and metabolism of coumarin by rats and by human volunteers under simulated conditions of use in fragrances. *Food and Chemical Toxicology*, p39, 153-162
- **Frutos P, Hervás G, F Giráldez and A Mantecón., (2004).** Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (2), 191-202.
- **Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie RE., Cosentino LM., Ballas LM., Jiang JB., Janzen WP., Chen IS., et Lee KH., (1994).** Anti-AIDS Agents, 11. Betulinic Acid and Platanic Acid as Anti-HIV Principles from *Syzigium clavi florum*, and the Anti-HIV Activity of Structurally Related Triterpenoids. *Journal of Natural Products*, 57 (2), pp : 243–247.;
- **Ghédira, K., & Goetz, P., (2017).** Le henné *Lawsonia inermis* L. (Lythraceae). *Phytothérapie* ; 4 : 162 – 169.
- **Gheffour, K., Boucherit, K., & Boucherit-Otmani, Z., (2015).** Étude phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des extraits d'*Echinops spinosus*. *Phytothérapie*,
- **Guha, G., Rajkumar, V., Kumar, R. A., & Mathew, L., (2011).** Antioxidant activity of *Lawsonia inermis* extracts inhibits chromium (VI)-induced cellular and DNA toxicity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- **Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J. O., Charlier, C., & Chapelle, J. P., (2007).** Le stress oxydant. *Revue médicale de Liège*, 62(10), 628-38.

- **Heimeur N., Idrissi H., Seghini M., (2004).** Les polyphenols de *Pyrus mamorensis* (Rustaceae). Reviews in biology and biotechnology. Vol 3 N°1, p 37-42.
- **Hsouna, A. B., Trigui, M., Culioli, G., Blache, Y., &Jaoua, S., (2011).** Antioxydant constituents from *Lawsonia inermis* leaves: isolation, structure elucidation and antioxidative capacity. Food Chemistry, 125(1), 193-200.
- **Huang D., Prior R.L., (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 : 1841-1856.
- **Hubert A.J., (2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de Soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine. Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctoral des sciences écologiques, vétérinaires, agronomiques et bioingénieries, spécialité : qualité et sécurité des aliments, p 174.
- **Imam H., UddinMahbub N., Khan F., (2013)** Alpha amylase enzyme inhibitory and anti-inflammatory effect of *Lawsonia inermis*. Pak J BiolSci 16:1796–800.
- **Jeong S.M., Kim S.Y., Kim D.R., Jo S.C., Nam K.C., Ahn D.U., and Lee S.C., (2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52: 3389-3393.
- **Kadri, A., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M., & Gdoura, R., (2011).** Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia. African journal of biotechnology, 10(19), 3908-3914.
- **Karagözler A., Erdag C.S. et Çalmaz Emek Y. (2008).** Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111 : 400-407.
- **Karagözler A., Erdag C.S. et Çalmaz Emek Y. (2008).** Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111: 400-407.
- **Karumi Y., Onyeyili P.A., Oyugbuaja V.O. (2004).** Identification of active principals of *M. Balsamia* (Balsam Apple) leaf extract. *J.Med.Sci*, 4 (3) : 179 -182.
- **Khenaka, K., (2011).** Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin, Diplôme de Magister En Microbiologie Appliquée, Université Mentouri Constantine. p19, 24.

- **Kumar, M., Kaur, P., Chandel, M., Singh, A. P., Jain, A., & Kaur, S., (2017).** Antioxidant and hepatoprotective potential of *Lawsonia inermis* L. leaves against 2-acetylaminofluorene induced hepatic damage in male Wistar rats. *BMC complementary and alternative medicine*, 17(1), 56.
- **Kumar, M., Kaur, P., Kumar, S., & Kaur, S., (2015).** Antiproliferative and apoptosis inducing effects of non-polar fractions from *Lawsonia inermis* L. in cervical (HeLa) cancer cells. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21(2), 249-260.
- **Kumaran, A. et Karunakaran, R.J., (2007).** *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 40: 344-352.
- **Laguerre, M., Lopez-Giraldo, L., Lecomte, J., Pina, M., Villeneuve, P., (2007).** Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *Oxford College of London*, 14 (5): 278-292.
- **Lehucher-Michel MP., Lesgards JF., Delubac O., Stocker P., Durand P., (2001).** Stress oxydant et pathologies humaines. La presse médicale. 30-1076-1081. Loussert.R., Brousse.G. (1999). L'Olivier (fr), éditions Maisonneuve (Paris).
- **Lobstein, A., (2010).** Substances naturelles et pharmacognosie, les alcaloïdes, pp 3-25.
- **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux: un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR presses polytechniques.
- **Majhenič, L., Škerget, M., & Knez, Ž., (2007).** Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food chemistry*, 104(3), 1258-1268.
- **Makhija, I. K., Dhananjaya, D. R., Kumar, V. S., Devkar, R., Khamar, D., Manglani, N., & Chandrakar, S., (2011).** *Lawsonia inermis*-from traditional use to scientific assessment. *African journal of pharmaceutical sciences and pharmacy*, 2(1).
- **Malecky, M., (2005).** Métabolisme des terpenoïdes chez les caprins, thèse Pour obtenir le grade de docteur de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, Agro Paris Tech. p 9, 13-19, 20, 27.
- **Marxen K., Vanselow K.H, Lippermeir S., Hintze R., Ruser A., Hansen U.P., (2007).** Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal Species by Linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*, 7 : 2080-2095.

- **Maurice N., (1997).** L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXI^e siècle. Ed. Tec et Doc, Paris. France. Pp 12-14.
- **Merouane A, Noui A, Medjahed H, Nedjari Benhadj Ali K, Saadi A., (2014).** Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 8(4): 1865-1870. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v8i4.45>.
- **Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V. et Milner, A.A., (1993)** "Novel methods for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates." *Clin.Sci*, 84: 407-412.
- **Molyneux P., (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26(2) : 211-219.
- **Moreau, R. A., Whitaker, B. D., & Hicks, K. B., (2002).** Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Progress in lipid research*, 41(6), 457-500.
- **Nithya V, Baskar A., (2011).** A preclinical study on wound healing activity of *Lawsonia ulba* Linn. *Res J Phytochem* 5:123–9 pathologies humaines. *Press Med*. 30 : 1076-1081.
- **Oloyede O.I., (2005).** Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan journal of nutrition*, 4 : 379-381.
- **Orwa C, A Mutua, Kindt R, Jamnadass R, S Anthony. (2009).** Agroforestry tree Database: a reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>)
- **Oyaizu M., (1986).** Studies on products of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of nutrition*, 44 : 307-315.
- **Parejo I, Viladomat F. et Bastida J . (2003).** Investigation of bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sci*, 73 :1667-81. *Pharmacologyonline* 2:1243–9.
- **Philip, J. P., Madhumitha, G., & Mary, S. A. (2011).** Free radical scavenging and reducing power of *Lawsonia inermis* L. seeds. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(6), 457-461. *Phytothérapie*, 15(2), 85-90.
- **Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J. O. (2002).** Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16(4), 233-239.

- **Rahman M.S., Han J.C., Park J., Lee J.H., Eo S.K., et Chae J.S., (2006).** Prevalence of brucellosis and its association with reproductive problems in cows in Bangladesh. *V et. Rec.*, 159 : 180-182.
- **Rahmoun, N., Boucherit-Otmani,Z. ,Boucherit,K., Benabdallah,M., Choukchou-Braham, N., (2013).**AntifungalactivityoftheAlgerian *Lawsonia inermis* (henna). *Pharmaceutical Biology*51,131–135.
- **Raja W, Agrawal RC, Ovais M., (2009).** Chemopreventive action of *Lawsoniainermis*leafextract on DMBA-induced skin papilloma and B16F10 melanomatumour.
- **Ramawat K.J. et Merillon J.M., (2008).** Bioactives molecules and medicinal plant. Edition Springer, Berlin Héidelberg. V erlag, ISBN 978-3-540-74603-4.
- **Sanchez-Moreno C. (2002).** Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3) : 121-137.
- **Sanchez-Moreno C., Larrauri J.A., Saura-Calixto F., (1998)** *Sci Food. Agr.* 76 : 270.
- **Sarni-Manchado, V. Cheynier, (2006)** : Les polyphenols en agroalimentaire, Lavoisier, Editions Tec & Doc, 398.
- **Satish U., Mendell M. J., Shekhar K., T. Hotchi, Sullivan D., Streufert S., et Fisk W.J., (2012).** Is CO₂ an Indoor Pollutant? Direct Effects of Low-to-Moderate CO₂ Concentrations on Human Decision-Making Performance. Upstate Medical University, New York, and Lawrence Berkeley National Laboratory, California, USA. Vol. 120 (12) : 1671-1677.
- **Scherer R., Goboy H.T. (2009).** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112 :654-658.
- **Sherifa, M. S., Luluah, M. R. A., Hala aeeh, S. A., & Alaa, A., (2015).** The importance of the chemical composition of Henna tree leaves (*Lawsonia inermis*) and itsability to eliminate Tineapedis, with reference to the extent of usage and storage in the Saudi Society, Taif, KSA. *J. Pharm. Biolog. Sci*, 10, 23-29.
- **Singh S, Verma N, Karwasra R., (2015).** Safety and efficacy of hydroalcoholicextractfrom*Lawsoniainermis*leaves on lipid profile in alloxan-induceddiabetic rats. *Ayu* 36:107–12
- **Sofowora, A., (2010).** *Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique.* Karthala Editions

- Sokół-Łętowska, A., Oszmiański, J., & Wojdyło, A., (2007). Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. *Food chemistry*, 103(3), 853-859.
- Sujanamulk B, Chintamaneni R, Chennupati A., (2016). Evaluation of antifungal efficacy of ethanolic crude lawsone and Listerine® mouthwash in uncontrolled diabetics and denture wearers — A randomized clinical trial. *J Clin DiagnRes* 10:ZC90–ZC5
- Sun, T., Powers, J.R., Tang, J., (2007). Evaluation of the antioxidant activity of *Asparagus broccoli* and their juices. *Food Chem*, 105: 101-106.
- Terpin, P., Bezjak, M., Abramovic, H. (2009). A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. *Food Chemistry*, **115** : 740-744.
- Trease. G.E et Evans. W.C (1989). Pharmacognosy. 13ème édition Ballière-Tindall. pp.436- 445.
- Trop, M. (2011). Ingestion volontaire de décoction de henné (*Lawsonia inermis*) à l'origine d'une anémie hémolytique chez une patiente atteinte d'un déficit en G6PD. *Médecine Tropicale*, 71(3), 292-294.
- Unten, L., Koketsu, M., Kim, M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on β -carotene. *J. Agr Food. Chem*, 45: 2009-2019.
- Upson T.M., Grayer R.J., Greenham J.R., Williams C.A., Al-ghamdi F., Chen F-I., (2000). Leaf flavonoides as systematic characters in the *Genera lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical systematic and ecology*; 28,99 1-1007.
- Vallet A., (1996). Contribution à l'étude de la biosynthèse des alcaloïdes tropaniques chez le *Datura innoxia* Mill, transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes* et culture de chevelus lacunaires. Mémoire d'Études Approfondies (D.E.A) en génie enzymatique, bioconversion et microbiologie. Université de Picardie Jules Vienne.
- Wagini, N. H., Soliman, A. S., Abbas, M. S., Hanafy, Y. A., & Badawy, E. S. M., (2014). Phytochemical analysis of Nigerian and Egyptian henna (*Lawsonia inermis* L.) leaves using TLC, FTIR and GCMS. *Plant*, 2(3), 27-32. 13(5), 288-294
- Yang J.Y., Lee H.S., (2013). Antimicrobial activities of active component isolated from *Lawsonia inermis* leaves and structure–activity relation ships of its analogues against food-borne bacteria. *Journal of Food Science and Technology*, <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-013-1245-y> (in press).

- **Yang, C. S., Huang, H. C., Wang, S. Y., Sung, P. J., Huang, G. J., Chen, J. J., &Kuo, Y. H., (2016).** New diphenol and isocoumarins from the aerial part of *Lawsonia inermis* and their inhibitory activities against NO production. *Molecules*, 21(10), 1299.
- **Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., Qian, M., (2002).** Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1619–1624.
- **Zhang M., Hongfei J., Aiti A., Haizhou L., Chew L.T et Sheng L., (2008).** A Tree Sequence Alignment based Tree-to-Tree Translation Model. *ACLHLT-08*. 559-567.
- **Ziegler J, Facchini P.J., (2008).** Alkaloid Biosynthesis : Metabolism and Trafficking. *Annu Rev Plant Biol* ; 59 : 735 – 769.
- **Zouhri, A., Bousfiha, A., &Aarab, L., (2017).** Évaluation des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et photoprotectrices des lipides de *Lawsonia inermis*. *Phytothérapie*, 15(2), 67-71.