

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



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en science biologique

Option : Microbiologie appliquée

Présenté par : - M^{elle}. Boukacem Fatima Zohra
- M^{elle} Khefif Bassima

Etude phytochimique et évaluation des activités antibactérienne et antifongique des extraits de Henné « *Lawsonia inermis* »

Soutenu le : 14/06/ 2018

Devant le jury composé de :

Président :	Mme Ouadah A	MCB au CUBBAT
Examineur :	Mr Bennabi F	MCB au CUBBAT
Encadreur :	Mme Bentabet N	MCB au CUBBAT

Année universitaire : 2017-2018

Résumé

Introduction : Actuellement le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques ainsi que leurs toxicités ont conduit les chercheurs à puiser dans le monde végétal dont les plantes jouent un rôle bénéfique en termes d'action préventive très importante pour la santé humaine et animale. Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales, nous nous sommes intéressés à faire une étude phytochimique des feuilles de la plante *Lawsonia inermis* et à évaluer l'activité antimicrobienne de ses extraits.

Matériel et méthodes : Afin de pouvoir exploiter une éventuelle activité thérapeutique, des extraits bruts, ainsi que deux fractions de l'extrait des tanins ont été testés pour leur pouvoir antimicrobien par deux méthodes; la diffusion des disques et la méthode des dilutions et ceux vis-à-vis de quatre bactéries à Gram positif, deux bactéries à Gram négatif et une levure *Candida* .

Résultats : Les tests phytochimiques réalisés lors de cette étude révèlent la présence des différentes familles de composés chimiques existantes avec une intensité variée entre les deux extraits étudiés. Les résultats obtenus montrent que chacun des extraits a une activité bien définie sur la croissance des bactéries testées. Les souches bactériennes les plus sensibles à nos extraits sont : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus Cereus* ATCC 1876 et *Bacillus Subtilis* ATCC 6633. La fraction 1-butanol et eau/méthanol du henné ont montré une activité antifongique importante vis-à-vis de la souche testée.

Conclusion : Cette étude justifie ainsi l'usage traditionnel des feuilles de henné dans le traitement de bon nombre de maladies. La consommation massive des feuilles de cette plante en période d'épidémies pourrait être ainsi une bonne mesure préventive.

Mots clés : *Lawsonia inermis*, Extraits végétaux, Métabolites secondaire, Activité antibactérienne, Activité antifongique.

Abstract

Introduction: Currently the development of microbial resistance to antibiotics and their toxicities have led researchers to draw from the vegetable world whose plants play a beneficial role in terms of preventive action how is very important for human and animal health. As part of the development of medicinal plants, we are interested to realize a phytochemical study of the leaves of the plant *Lawsonia inermis* and to evaluate the antimicrobial activity of its extracts.

Material and methods: To be able to exploit a possible therapeutic activity, crude extracts as well as tannin extract were tested for their antimicrobial effect by two methods; the diffusion of the discs and the method of dilutions and those on four Gram-positive bacteria, two Gram-negative bacteria and a *Candida* yeast.

Results: The phytochemical tests carried out during this study reveal the presence of the different families of chemical compounds with a varied intensity between the two extracts studied. The results obtained show that each of the extracts has a well-defined activity on the growth of the bacteria tested. The bacterial strains most sensitive to our extracts are: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus Cereus* ATCC 1876 and *Bacillus Subtilis* ATCC 6633. The 1-butanol and water / methanol fraction of henna showed significant antifungal activity on the strain tested.

Conclusion: This study justifies the traditional use of henna leaves in the treatment of many diseases. The massive consumption of leaves of this plant in times of epidemics could be a good preventive measure.

Key words: *Lawsonia inermis*, Plant extracts, Secondary metabolites, Antibacterial activity, Antifungal activity.

Dédicace

Je dédie ce travail à.....

**Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour,
son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux
conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma
vie*

**Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de
longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à
avancer dans la vie.*

**Mes frères et sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des
exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

A tous les membres de ma famille ainsi qu'à tous mes amis

*A toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce
travail, a tous ceux que j'ai omis de citer*

Bouqacem Fatima Zohra et Kfifif Bassma

Remerciements

En préambule à ce mémoire nous remercions ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.

La première personne que nous tenons à remercier est notre encadreur Mme. BENTABET Nesrine, pour son orientation, sa confiance et sa patience qui ont constitué un apport considérable et sans lesquels ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Mme. Ouadah A et M. Benabi F pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent à monsieur le directeur du centre universitaire M. Boucherit et à tout les personnes administratives de la faculté de science de la nature et de la vie.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Nous adressons nos remerciements à toute l'équipe du laboratoire pédagogique du département des sciences biologiques. Soyez assuré de notre reconnaissance et de notre profonde sympathie pour nous avoir adopté, aidé et facilité le travail de recherche au niveau du laboratoire.

A nos familles et nos amis qui par leurs prières et leurs encouragements, on n'aurait pas pu surmonter tous les obstacles.

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail, trouvent ici nos sentiments de profonde gratitude et de reconnaissance infinie.

Très cordialement.

Table des matières

	Introduction générale	1
Première partie	Synthèse bibliographique	4
Chapitre 1	<i>La phytothérapie et les plantes médicinales</i>	5
1.1.	La phytothérapie	5
1.1.1.	Définition	5
1.1.2.	Différents types de la phytothérapie	5
1.2.	Les plantes médicinales	6
1.2.1.	Les métabolites secondaires	6
1.2.1.1.	Les composés phénoliques	7
a.	Les flavonoïdes	8
b.	Les tanins	9
c.	Les coumarines.	11
1.2.1.2.	Les composés terpéniques	12
a.	Stéroïdes, stérols et terpénoïdes	12
b.	Saponosides	13
1.2.1.3.	Composés azotés : les alcaloïdes	14
Chapitre 2	<i>Monographie de la plante étudiée</i>	15
2.1.	Etude systématique	15
2.2.	Etude botanique	15
2.3.	Origine et répartition géographique	17
2.4.	Composition chimique	17
2.5.	Activité Pharmacologiques et effets thérapeutiques de <i>lawsonia inermis</i>	18
Chapitre 3	<i>Les souches étudiées et leurs effets</i>	19
3.1.	Généralités sur la systématique des bactéries	19
3.2.	Description des bactéries étudiées	19
3.2.1.	Bactéries à Gram positif	19
3.2.1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.2.1.2.	<i>Bacillus cereus</i>	20
3.2.1.3.	<i>Bacillus subtilis</i>	20
3.2.2.	Bactéries à Gram négatif	20

3.2.2.1.	<i>Escherichia coli</i>	20
3.2.2.2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
3.3.	Description des levures étudiées	21
3.3.1.	<i>Candida Albicans</i>	21
Deuxième partie :	Matériel et méthodes	22
1.	Matériel végétal	23
2.	Matériel biologique	23
3.	Méthodes	24
3.1.	Etude phytochimique	24
3.2.	Etude de l'activité antimicrobienne:	25
3.2.1.	Préparation des différents extraits de <i>Lawsonia inermis</i>	25
3.2.2.	Calculs des rendements en extraits	27
3.3.	Evaluation de l'activité antibactérienne de <i>Lawsonia inermis</i>	27
3.3.1.	Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques)	27
3.3.2.	La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI)	28
3.4.	Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures	28
Troisième partie :	Résultats et discussion	29
1.	Etude phytochimique	30
1.1.	Les tests phytochimiques	30
1.2.	Les rendements en extraits secs	31
2.	Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits de <i>Lawsonia inermis</i>	33
2.1.	La technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques)	33
2.2.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)	36
3.	Evaluation de l'activité antifongique des différents extraits de <i>lawsonia inermis</i>	39
Quatrième partie :	Conclusion générale et perspectives	41
Cinquième partie :	Références bibliographiques	43
	Annexe	53

Liste des abréviations

ATCC	: American Type Culture Collection
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
DMSO	: Diméthyl sulfoxyde
FeCl₃	: Chlorure de fer
M.S	: Matière sèche
NaCl	: Chlorure de sodium
NaOH	: Hydroxyde de sodium
NCCLS	: National Clinical Committee Laboratory Standards
NH₄OH	: Hydroxyde d'ammonium
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé

Table des figures

- Figure N°1:** Structure chimique de base des flavonoïdes.
- Figure N°2:** Structures des tanins hydrolysables et condensés.
- Figure N°3:** Squelette de base des coumarines.
- Figure N°4:** Structure de l'isoprène (terpène).
- Figure N°5:** Structure chimique du noyau stérane des stéroïdes.
- Figure N°6:** Description botanique de *Lawsonia inermis*.
- Figure N°7:** Représentation photographique des feuilles de *Lawsonia inermis*
- Figure N°8:** Schéma de l'extraction des tanins des feuilles de *Lawsonia inermis*
- Figure N°9:** Rendements des extraits des feuilles de la plante *Lawsonia inermis*.
- Figure N°10:** Représentation photographique de l'effet des différents extraits des feuilles de *L.inermis* vis-à-vis des souches microbiennes.

Liste des tableaux

- Tableau N°1:** Les différentes classes des composés phénoliques dans les plantes.
- Tableau N°2:** Les différents types de terpenoïdes (Belbache, 2003).
- Tableau N°3:** Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les extraits des feuilles de *Lawsonia inermis*
- Tableau N°4:** Rendement des extraits des feuilles de la plante *Lawsonia inermis*.
- Tableau N°5:** Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D).
- Tableau N°6:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis*.
- Tableau N°7:** Concentration minimal inhibitrice (CMI) (mg/mL) des extraits de feuille de *Lawsonia inermis*
- Tableau N°8:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) et CMI des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* vis-à-vis des souches de *Candida albicans*.

Introduction générale

Les pathologies infectieuses constituent un véritable problème de santé publique dans le monde. Elles sont dues à des virus, des bactéries ou à des eucaryotes parasites (**Gbadamassi, 2007**).

Bien que les maladies infectieuses sont de mieux en mieux diagnostiquées, elles causent toujours un problème de mortalité tel que : la pneumonie, la tuberculose, la méningite, la septicémie et la typhoïde. En 2012, l'organisation mondiale de la santé a estimé plus de 3,3 millions de cas de bactériémies dans le monde, dont près de 850 000 cas en Afrique et 8 700 cas en Algérie seulement (**OMS, 2012**).

Depuis la découverte du premier antibiotique (la pénicilline), la lutte contre les maladies infectieuses par de nouvelles molécules a connu une véritable révolution. Cependant, des microorganismes résistants sont apparus en plus de la toxicité de certains anti-infectieux constituant actuellement un réel problème d'antibiothérapie (**Landry, 2012**). En effet, l'émergence des résistances est due d'une part, au mauvais usage des antibiotiques. D'autre part, à la capacité infinie des germes à muter sous la pression des antimicrobiens, ainsi qu'à leur vitesse de réplication (**Denyer et coll., 2004**).

Face aux limites thérapeutiques des médicaments chimiques, le développement de la recherche sur les plantes médicinales a été orienté vers l'obtention de phytomédicaments. Ce développement constitue une étape indispensable pour l'essor de tout un secteur lié aux besoins non seulement de la thérapie, mais aussi de l'industrie agroalimentaire, de la cosmétique et de la parfumerie (**Michel, 2011**).

L'investigation des plantes représente actuellement un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances (**Arrif, 2009**). La flore algérienne regorge de plusieurs espèces de plantes encore peu ou pas étudiées, mais dotées de réelles propriétés pharmacologiques (**Gonzalez-Tejero et al., 2008**). La maîtrise totale et parfaite des différentes propriétés de ces plantes, qui passe par la détermination de l'ensemble des groupes physicochimiques capables d'engendrer un ou plusieurs effets pharmacologiques, est aujourd'hui un objectif qui occupe un ordre de première place (**Abdelwahed et al., 2007**).

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à faire une étude phytochimique des feuilles de la plante *Lawsonia inermis* et à évaluer les activités antibactérienne et antifongique de ses extraits qui possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques qui rendent cette étude intéressante.

Introduction générale

Au cours de ce travail, nous allons procéder à :

- une préparation des extraits bruts et spécifiques de tanins des feuilles de henné.
- une identification des différents groupes chimiques présents dans les différents extraits.
- une détermination du pouvoir antibactérien et antifongique (in vitro) des extraits obtenus vis-à-vis des souches microbiennes de référence.

Première partie :

Synthèse bibliographique

L'usage thérapeutique des plantes médicinales est très présent dans certains pays du monde, notamment celle des pays en voie de développement où plus de 80 % de la population ont recourt presque exclusivement à la médecine traditionnelle pour ses besoins de santé primaire, du fait de son incapacité à accéder, voire bénéficier des vertus de la médecine moderne (**Khadhri, 2013**).

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances et de composés naturels bioactifs et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaire (**Enneb et al., 2015**).

Parmi les substances naturelles utilisées dans la médication, les métabolites secondaires sont énormément utilisés en thérapeutique. Ces composés sont considérés comme une source très importante de médicaments. Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont appliqués selon leur usage traditionnel (**Berube et Gagnon 2006**).

1.1 La phytothérapie

1.1.1 Définition

Le terme phytothérapie vient du grec « *phuton* » qui signifie plantes et « *therapeia* » qui signifie traitement. La phytothérapie est une médecine traditionnelle ancestrale basée sur l'utilisation des propriétés pharmacologiques naturelles des molécules contenues dans les plantes. Elle fait partie des médecines parallèles, ou médecines douces. Dans la plupart des pays, notamment en Occident. (**Larousse Médical, 2006**).

Depuis quelques années, cette médecine douce qui fait de plus en plus d'adeptes, est donc la thérapie par le végétal en l'utilisant par différentes formes afin de traiter des maladies ou trouble à titre préventif ou curatif.

1.1.2 Différents types de la phytothérapie

Il existe plusieurs types de phytothérapie :

✓ **L'aromathérapie** : est une thérapeutique qui utilise les essences des plantes, ou les huiles essentielles et substances aromatiques qui sont extraites par distillation. Ces huiles sont des produits complexes à utiliser avec précaution et en respectant les doses prescrites, car ils

ne sont pas totalement sans danger. Leur utilisation la plus fréquente est l'application par voie cutanée (à travers la peau).

✓ **La gemmothérapie** : se fonde sur l'utilisation d'extraits alcooliques et glycerinés de tissus jeunes de végétaux tels que les bourgeons et les radicules appartenant à environ 60 plantes différentes. Ces extraits sont alors dilués au dixième pour pouvoir être utilisés en tant que plantes médicinales.

✓ **L'herboristerie** : correspond à la méthode de phytothérapie la plus classique et la plus ancienne. Elle se sert de la plante fraîche ou séchée; elle utilise soit la plante entière, soit en partie. La préparation d'herboristerie repose sur des méthodes simples, à base d'eau (décoction, infusion, macération).

✓ **L'homéopathie** : Elle a recours aux plantes, mais non exclusive. On peut aussi trouver, en plus petites quantités, des souches d'origines animales et minérales.

✓ **La phytothérapie chinoise** : « médecine traditionnelle chinoise » Elle inclut l'acupuncture et la diététique chinoise. Cette phytothérapie vise à modifier les quantités de différentes énergies dans l'organisme.

✓ **La phytothérapie pharmaceutique** : Elle utilise des produits d'origine végétale obtenus par extraction et par dilution. Elle consiste à dosés en quantités importantes de végétaux pour avoir une action soutenue et rapide. Les concentrations sont alors élevées, et la non-toxicité de ces médicaments est parfois relative.

1.2. Les plantes médicinales

Une plante médicinale est une drogue végétale qui peut être utilisées entière ou sous forme d'une partie de plante pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties (racines, écorce sommités, fleuries, feuilles, fleurs, fruits, graines) peut être employée dans le but de se soigner. Leur efficacité relève de leurs composés, très nombreux et très variés en fonction des espèces, qui sont autant de principes actifs différents (**Schauenberg et Paris, 2013**).

1.2.1 Les métabolites secondaires

Une des originalités majeures des végétaux réside dans leur capacité à produire des substances naturelles très diversifiées. En effet, à côté des métabolites primaires classiques (Les glucides, les protides, les acides nucléiques), ils accumulent fréquemment des métabolites dit « secondaires » dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente mais

qui représentent une source importante de molécule utilisable par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (Berreghioua, 2016).

Ils participent à l'adaptation de la plante avec son environnement, à la tolérance contre les chocs (lumière UV, les insectes nocifs, variation de la température,...) et à la défense contre les pathogènes (moisissures et bactéries phytopathogènes,...) (Jeun *et al*, 2005).

Plus de 200.000 structures de métabolites secondaires ont été définies et classés selon leur appartenance chimique en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les composés azotés (Hartmann, 2007).

1.2.1.1 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des métabolites secondaires d'un poids moléculaires élevé, largement distribués dans le règne végétal. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits.) (Yusuf, 2006).

Les polyphénols sont largement utilisée en thérapeutique comme vasoconstricteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et antimicrobiens.

Parmi les composés phénoliques, on retrouve les flavonoïdes, les quinones phénoliques, les lignanes, les coumarines et d'autres classes existant en un nombre considérable (Tableau N°01) (Mann *et al* ; 1994).

Tableau N°01 : Les différentes classes des composés phénoliques dans les plantes.

Nombre d'atomes de carbone	Squelette de base	Classe
6	C6	Phénols simples.
7	C6 - C1	acides phénoliques.
8	C6 - C2	acétophénone, acide phénylacétique.
9	C6 - C3	acide hydroxycinnamique, polypropène, coumarine, chromons).
10	C6 - C4	naphtoquinone.
15	C6 - C3 - C6	flavonoïdes, isoflavonoïdes.
n	(C6 - C3 - C6) n	tanins condensés.

a- Les flavonoïdes

• Définition :

Les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques qui sont responsable des colorations jaune, orange et rouge de différents organes de végétaux (les fruits , les feuilles ,les fleurs.) (Havasteen, 2002). Ils constituent un groupe de plus de 6 000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires (Ghedira, 2005). Les flavonoïdes sont retrouvés également dans plusieurs plantes médicinales. Leurs structure chimique est constituée de quinze atomes de carbones qui sont arrangés dans une configuration C6-C3-C6, et qui dérive en deux noyau aromatique (noyau A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) (Figure N°01) (Fiorucci, 2006).

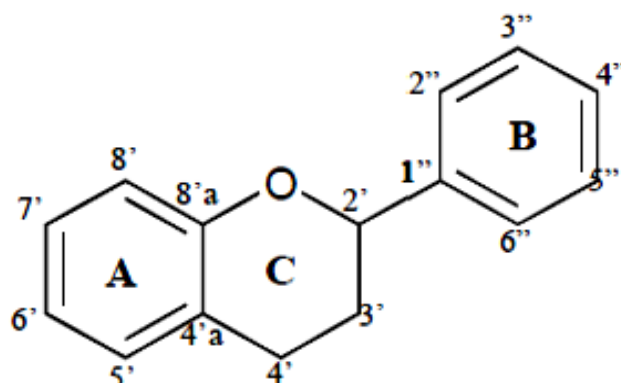


Figure N°01 :

Structure chimique de base des flavonoïdes (Collin et Crouzet, 2011).

Les substitutions variées au sein de l'hétérocycle C donnent les différentes sous classes des flavonoïdes :

- Flavonols: quercétine, myricétine, rutine, kaempférol...
- Flavones : apigénine, lutéoline...
- Flavanones : eriodictyol, naringine, naringénine...
- isoflavones : génistéine, daidzéine...
- anthocyanidines : alpha tocophérol, malvidine (Sarmi et Cheymer 2006).

• Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes utilisés dans le domaine médical sont largement connus par leurs activités antivirales, antimicrobiennes, antispasmodiques, anti-tumorales, anti-agrégation plaquettaires, anti-allergiques, hypocholestérolémiantes et anti-inflammatoires (Cushine et Lamb, 2005).

Comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries. Des études ont démontré le pouvoir antibactérien des flavonoïdes contre des souches de bactéries Gram positif et Gram négatif (**Harikrishna et al., 2004**).

Des études réalisées par **Sylvie en 2011**, ont démontré l'effet bactéricide de différentes flavanones sur l'ADN gyrase d'une bactérie *staphylococcus aureus*.

En effet, en raison de la capacité répandue des flavonoïdes à inhiber la germination des spores pathogènes des plantes, ils sont utilisés comme un traitement contre les microbes fongiques pathogènes de l'homme (**Harborne et Williams, 2000**). Galangin, un flavonol généralement trouvé dans des échantillons de propolis a été montré avoir l'activité inhibitrice contre *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium italicum* (**Afolayan et Meyer, 1997**).

En plus, les flavonoïdes ont une activité antioxydante. Ils agissent principalement comme antioxydants primaires, en stabilisant les radicaux peroxydes mais ils peuvent aussi désactiver les espèces oxygénées réactives (ion superoxyde, radical OH•, oxygène singlet) par chélation de métaux de transition comme le fer ou par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ROS comme la xanthine oxydase, la cyclooxygénase et la lipooxygénase (**Bartosikova et al., 2003**).

b- Les tanins

Les tanins sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton. Ils sont caractérisés par leur capacité antioxydante et leur propriété thérapeutique.

Les tannins sont subdivisés selon leur structure en deux groupes différents, largement distribués chez les végétaux supérieurs et qui sont : les tannins hydrolysables et les tannins condensés ou non hydrolysables (**Figure N°02**) (**Brunet, 2008**).

• Tanins hydrolysables

Les tannins hydrolysables sont des oligo- ou poly-esters d'un sucre, en général le glucose, sur lequel se fixe, au moyen d'une liaison ester, des acides gallique ou un de ses dérivés (acide ellagique, chebulique ou valonique). Leur hydrolyse, par des acides, des bases ou certaines enzymes, libère le glucose ainsi que les acides gallique ou phénolique liés (**Chung et al., 1998**).

- **Tanins condensés**

Les tannins condensés ou proanthocyanidols ont une structure plus complexe. Ce sont des polymères de flavan-3-ol (Catéchine) et de flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidines), ou un mélange des deux. Ils sont aussi désignés sous le nom de tanins catéchiques et ne sont hydrolysables que dans des conditions fortement acides (**Haioun, 2015**).

La propriété tannante résulte de la formation de liaisons des tanins au collagène de la peau. De la même manière, les tanins se combinent à des macromolécules comme la cellulose, les protéines, les pectines et les précipitent (**Price et al., 1978**).

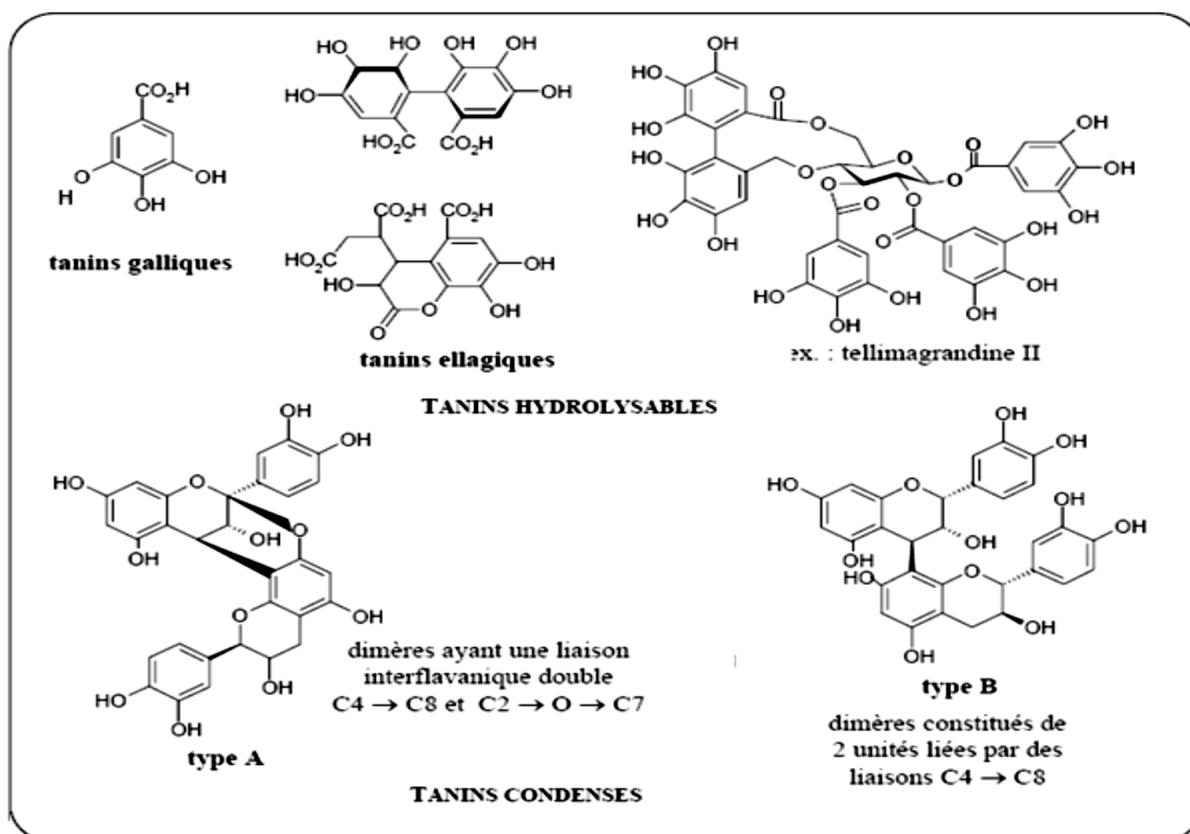


Figure N°02 :

Structures des tanins hydrolysables et condensés.

- **Activité biologique et intérêt pharmacologiques des tanins**

Des études menées par **Brunet en 2008**, montrent que la précipitation des protéines par les tanins protège les microorganismes du rumen de leurs effets délétères. Elle permet également le recyclage de l'urée par la diminution de la concentration d'ammoniac dans le rumen. Les tanins possèdent également un pouvoir cicatrisant car ils favorisent la régénération des tissus en cas de blessure superficielle.

Ils ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénol. Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples (Frutos *et al.*, 2004).

De nombreuses études montrent l'effet antimicrobien des tanins sur différents bactéries, virus et champignons (Hatano *et al.*, 2005). Les tannins hydrolysables des différentes plantes agissent contre une large gamme de champignons filamenteux (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum cassis*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*,...) et de levures (*Candida albicans*, *Cryptococcus néoformans*...) (Latte, 2000).

c- Coumarines.

- **Définition**

Les coumarines viennent du mot coumarou qui est un nom vernaculaire de la fève « tonka », d'où fut isolée pour la première fois en 1820 la coumarine. Ce sont des dérivés de la benzo - alfa-pyrone. Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés avec neuf atomes de carbone (Figure N°03) (Ford *et al.*, 2001).

Les coumarines constituent une classe importante de produits naturels. La structure de la coumarine se trouve dans environ 150 espèces, appartenant à 30 familles de plantes différentes.

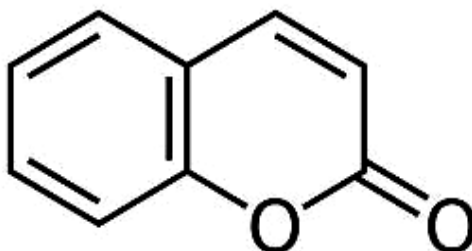


Figure N°03 :

Squelette de base des coumarines (Djemoui, 2012).

- **Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des coumarines**

Les coumarines manifestent diverses activités biologiques comme anti-agrégation plaquettaire, anti-inflammatoire, anticoagulante, antitumorale, diurétiques, antivirale et analgésique (Maged, 2002). En effet les coumarines possèdent une très bonne activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif (Khan *et al.*, 2005).

1.2.1.2 Les composés terpéniques

a- Stéroïdes, stérols et terpénoïdes

Les stéroïdes, les stérols et les terpénoïdes constituent la plus grande tranche des métabolites secondaires des végétaux. Ils regroupent plusieurs sous familles. Les terpénoïdes sont construits par l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta-carbonées (C₅H₈) ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène et appelées "isoprène" (Bruneton, 1993). Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) (Figure N°04) (Tableau N°02) (Benaïssa, 2011).

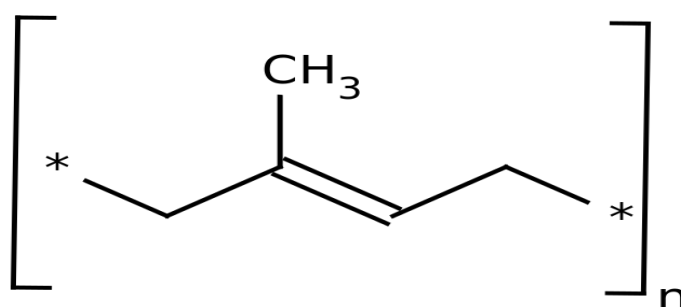


Figure N°04 :

Structure de l'isoprène (terpène) (Belbache, 2003).

Tableau N°02 : Les différents types de terpénoïdes (Belbache, 2003).

N (n=nombre d'isoprène).	Squelette carboné	Type de terpénoïdes	Exemple de molécule
1	C ₅	Hémiterpènes	Isoprène
2	C ₁₀	Monoterpène	Huiles essentielles, Nérol
3	C ₁₅	Sesquiterpène	β-Cadinène
4	C ₂₀	Diterpène	Sclaréol
6	C ₃₀	Triterpène	Lanostérol
8	C ₄₀	Tetraterpène	Caroténoïdes
> 8	>40	Polyterpène	Caoutchouc, cytoquinines

Les stérols des végétaux sont des substances naturelles présentes dans les parois cellulaires des plantes, appelés aussi phytostérols. Tous les stérols ont en commun le même noyau et ils ne diffèrent que par la chaîne latérale. Les molécules stéroïdes se composent de quatre anneaux A, B, C et D qui ont un certain nombre de résidus supplémentaires R (**Figure N°05**) (**Kartal, 2005**).

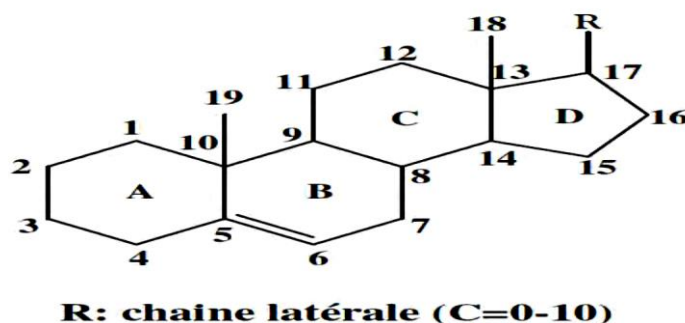


Figure N°05 :

Structure chimique du noyau stérane des stéroïdes.

- **Propriétés chimiques**

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable, Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles.

Ces composés sont largement utilisés dans le secteur de la nutrition humaine (saveur, conservateur). Aussi, les extraits terpéniques sont employés comme parfum (**Boutine ; 2011**).

- **Propriétés biologiques**

Des études faites sur des animaux montrent que certaines classes des terpènes telle que : le β -sitostène, possèdent des propriétés anti-inflammatoire, antipyrétique, antineoplasique, antiseptiques et immuno-modulatrice (**Boutaoui ; 2012**).

b- Saponosides

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques à poids moléculaire élevé, constitués de stérols ou triterpènes. Le nom saponoside vient du mot latin «sapo» qui signifie savon et qui est caractérisé par leur action tensioactive car ils se dissolvent dans l'eau en

formant des solutions moussantes. Aussi, La plupart des saponines possèdent des propriétés hémolytiques et sont toxiques à l'égard des animaux à sang froid (**Bruneton, 2009**).

- **Propriétés biologiques**

Les saponosides possèdent un large spectre des propriétés biologiques notamment des propriétés anti-inflammatoire, Immuno-adjuvante, cytotoxique, anti-tumorale et hypocholestérolémiant. Des études montrent que les saponines isolées à partir des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle, possèdent des propriétés antibactérienne et antifongique (**Bouhadjera, 2005**).

1.2.1.3 Composés azotés : les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques, hétérocycliques d'origine végétale (rarement animale). La présence d'azote confère à la molécule un caractère basique. Leur importance tient d'une part à leur activité thérapeutique et d'autre part a leur toxicité (**Cordell 1981**). Ils ont un poids moléculaire qui varie entre 100 à 900 g/mol. Ainsi, on divise les alcaloïdes en trois classes : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes et les pseudo-alcaloïdes (**Badiaga, 2011**).

De nombreux alcaloïdes sont utilisés comme des médicaments vendus en pharmacie ; on a l'exemple des dérivés de morphine connus pour leurs propriétés analgésiques, antipaludiques. On a aussi la quinine qui est utilisée pour combattre l'excès d'acide urique (colchicine) et la cocaïne qui est une drogue ayant une action stimulante. Les alcaloïdes jouent aussi le rôle d'antibiotique comme la cyclosérine et la mytomycine (**Badiaga, 2011**).

2.1. Etude systématique

Selon **Wong et Theng (1995)**, *Lawsonia inermis*, populairement connu comme plante de henné ou appelée également mehendi appartient au :

Règne :	<i>Plantae</i>
Embranchement :	<i>Spermaphytes</i>
Sous-embranchement :	<i>Angiospermes</i>
Classe :	<i>Magnoliopsida</i>
Sous Classe :	<i>Archichlamydeae</i>
Ordre :	<i>Myrtales</i>
Famille :	<i>Lythraceae</i>
Genre :	<i>Lawsonia</i>
Espèce :	<i>Inermis L</i>
Synonymie :	<i>L.abla Lam</i> <i>L .spinosa</i> <i>Rotantha combretioides</i>
Noms vernaculaires :	Henna: (Dans tout le Maghreb). Fagua: (Le nom de fleur henné au Maroc). Henne : (France). German: (Hennastrauch). Spanish : (Alcana, Alheña).

2.2. Etude botanique

Lawsonia inermis (henné) est un arbuste ou petit arbre glabre et multi-ramifié, de 2 à 6 mètres de haut à écorce marron-grise avec des rameaux à pointe épineuse. Les feuilles sont petites, entières, opposées, ovales, à environ 1,5 à 5 cm de long, 0,5 à 2 cm de large de couleur verte et pétiole court (**Bezanger et al., 1986**).

Les fleurs du henné sont parfumées et ont un diamètre d'environ 6 millimètres. Elles possèdent quatre sépales persistant et un tube de calice de 2mm. Ses pétales sont orbiculaires à obovales blanchâtres, parfois rougeâtres. Les fruits sont de petites capsules sphériques de 5mm de diamètre. Les graines sont angulaires à tégument épais (**Figure N°06**).



(A) : Arbuste de *L. inermis*



(B) : Fleurs



(C) : Fruits



(D) : Feuilles



(E) : Feuilles séchées



(F) : Poudre des feuilles séchées

Figure N°06 :

Description botanique de *Lawsonia inermis*

2.3. Origine et répartition géographique

Cette plante originaire de l'Inde ou de l'Afrique de l'Est, est naturalisée principalement dans les régions tropicales et sub-tropicales de l'Asie, de l'Afrique et de l'Australie, plus rarement dans les régions tempérées (**Philippe, 2013**).

Elle est cultivée sous le nom de Henné en Afrique du Nord, au Moyen- Orient et en Inde occupant une aire partant de l'Afrique de l'Ouest jusqu'en Asie du sud-est. La plante est retrouvée sur tout type de sol. Cependant, elle tolère mal les sols alcalins. Elle pousse principalement le long des cours d'eau et dans les régions semi-arides et a besoin de températures élevées pour sa germination, sa croissance et son développement.

Au cours de l'apparition de précipitations hivernales, la plante se développe rapidement, émet de nouvelles pousses, puis la croissance ralentit (**Musa et Gasmelseed 2012**). La poudre de ses feuilles, dite également henné, a été largement diffusé en Europe depuis 1890 (**El Babili et al., 2013**). Actuellement elle est l'objet d'un commerce intense entre l'Afrique du nord, le sous-continent indien et l'Europe (**Botineau 2010**).

Le henné est cultivé comme plante ornementale et colorante. Il est utilisé pour colorer les mains, les doigts, les ongles et les cheveux et joue un rôle naturel thérapeutique.

2.4. Composition chimique

• Fruits :

Les fleurs de la plante *L.inermis* donnent une huile essentielle à ionone qui est responsable de leur parfum, dont les graines contiennent 5.6 % d'une huile fixe renfermant 10.5 % de cire et d'insaponifiable et 37.7 % d'acides solides avec une matière colorante.

Les acides de cette huile sont les acides bénéfiques (1.69 %), arachidiques (9.6 %), stéariques (15.78 %), palmitiques (9.07 %), oléiques (34.66 %), et linoléiques (29.31 %) (**Paris et Moyse, 1965**).

• Feuilles :

Les feuilles du henné contiennent :

- 7 à 8 % de tanins, refermant des flavonoïdes.
- 6 % de lipides comprenant des xanthones et des coumarines.
- 2 % de résines et de pigments flavoniques.

- 1 % de pigment naphthoquinonique dont le plus important est la lawsone. Cette substance cristallisée en aiguilles rouge orangé est très peu soluble dans l'eau froide et plus soluble à chaud et dans les solvants organiques (**Sarita, 1991**).

De plus les feuilles du henné renferment d'autres constituants comme la manite en grande quantité, la vitamine K et l'acide gallique (**Paris et Moysse, 1965**).

2.5. Activité Pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Lawsonia inermis*

Le Henné est à la fois, une plante aromatique, traditionnelle et médicinale. En médecine populaire, on attribue à cette plante de nombreuses propriétés : diurétique et astringente dans les ulcères gastro-intestinaux. Aussi des propriétés colorantes sont recherchées depuis l'antiquité pour teindre les cheveux et colorer les ongles (**Botineau 2010**).

En 1973, quatre fractions ont été isolées par chromatographie sur couche mince de l'extrait alcoolique des feuilles de *Lawsonia inermis* ayant une activité antibactérienne. Dont trois ont été identifiés comme étant l'acide gallique, la lawsone et le 1,4-naphthoquinone (**Abd-el-Malek et al. 1973**).

Les résultats obtenus par **Rahmoun et ses collaborateurs en 2010**, montrent une bonne activité antibactérienne de la lawsone contre quatre souches de bactéries pathogènes, à savoir *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et contre une souche multirésistante de *Candida Albicans* ATCC 10231.

Malekzadeh (1968), démontre dans ses études que la substance antimicrobienne dans le henné est très soluble dans l'eau et que son activité inhibitrice contre *Bacillus anthracis*, a été significativement augmentée par une élévation de la température. Il conclut que c'est probablement la raison pour laquelle la pâte est couramment utilisée avec de l'eau chaude plutôt que l'eau froide.

En Algérie des travaux publiés par **Pacha et Benazzouz en 1998**, mettent en évidence un effet probable de *Lawsonia inermis* comme produit cicatrisant sur des brûlures du 3ème degré chez le lapin.

En plus, il a été rapporté que les feuilles de *L. inermis* exhibent une activité antioxydante comparable à celle de l'acide ascorbique (**Botros et al., 2004**).

Enfin la racine de la plante est traditionnellement utilisée dans le traitement des bronchites, ou encore comme diurétique. Les feuilles sont recommandées contre l'ulcère cutané ou variqueux, l'éléphantiasis, l'hépatite, la ménorragie, la diarrhée ou comme antihelminthique, (**Arbonnier, 2009**).

Les microorganismes sont définis historiquement comme des organismes vivants trop petits pour être distingués à l'œil nu. Ce terme est donc utilisé pour désigner des organismes unicellulaires ou constitués d'un nombre limité de cellules. Parmi les organismes unicellulaires, nous trouvons des eucaryotes (les protistes, ce terme désigne l'un des règnes du vivant regroupant tous les êtres vivants mobiles et unicellulaires et certains champignons dont les levures) et des procaryotes (les archéobactéries et les eubactéries) (Odile, 2004).

3.1 Généralités sur la systématique des bactéries

Une bactérie est un microbe, visible au microscope, appartenant à une zone de transition entre le règne animal et le règne végétal, généralement formé d'une seule cellule. Certaines bactéries sont mobiles grâce à des cils vibratiles. Selon leur mode de nutrition et leur comportement vis-à-vis de l'oxygène, les bactéries sont classées en aérobies et en anaérobies. Aussi ils se reproduisent selon deux modes :

- la division simple ou scissiparité
- la sporulation, la spore représentant la forme de résistance et de dissémination du germe. (Mogode, 2005)

Les bactéries vivent dans tous types d'environnements, y compris ceux hostiles. En effet, il existe des bactéries psychrophiles (Qui se développent à des températures avoisinant 0°C), thermophiles (qui vivent à des températures avoisinant 100°C), des barophiles (qui aiment les hautes pressions) et les halophiles (qui survivent dans des environnements très salés) (Boutine, 2014)

On peut classer les bactéries grâce à la coloration de Gram, qui distingue deux types de bactéries : Les bactéries à Gram positif et celles à Gram négatif.

3.2 Description des bactéries étudiées

3.2.1. Bactéries à Gram positif

Les bactéries qui retiennent le cristal violet dans le procédé de coloration de Gram sont appelées bactéries Gram positives. En taxinomie bactériologique, se sont des bactéries enveloppées d'une membrane plasmique, doublée d'une épaisse paroi de peptidoglycane et dépourvues d'une membrane externe.

On peut citer :

3.2.1.1. *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des cocci à Gram positif d'une forme sphérique, ayant un diamètre de 0.8 à 1 µm. Généralement, elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce sont des bactéries asporulés, immobiles et habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (**Patrick et al., 1988**).

L'espèce *S. aureus* est incriminée dans de nombreuses pathologies telles que: la méningite, l'ostéomyélite et la diarrhée (**Steven et al., 2004**).

3.2.1.2. *Bacillus cereus*

Ce sont des bacilles de grande taille (>1.0 µm) à Gram positif, Ils se distinguent des autres *Bacillus* essentiellement par leur aptitude à croître en anaérobiose. Généralement, ils sont mobiles grâce à une ciliature péritriche. Certaines espèces sont aussi capables d'infecter des mammifères et/ou des insectes. Les espèces du groupe *cereus* sont très répandues dans la nature et sont souvent isolées du sol, de la poussière ou de la surface de végétaux, ce qui favorise leur prolifération dans les aliments (**Kotiranta, et al., 2000**).

3.2.1.3. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est une bactérie aérobie, Gram-positif. Elles sont caractérisées par leurs différentes protéines qui se trouvent dans la membrane et qui permettent des échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Ces bactéries peuvent exporter des déchets de leur métabolisme mais aussi d'importer des nutriments ou des signaux chimique (**Kunst, et al., 1997**).

3.2.2 Bactéries à Gram négatif

Ce type de bactéries ne retient pas le violet de gentiane dans le procédé de coloration de Gram. Elles sont enveloppées d'une membrane plasmique, d'une mince paroi de peptidoglycane, et d'une membrane externe. On retrouve :

3.2.2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille à Gram négatif. Elle est de type anaérobie facultatif, de forme non sporulée et généralement mobile grâce aux flagelles. Sa longueur varie de 2 à 6 μm , et sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm (Steven *et al.* 2004).

L'espèce *E. coli* constitue la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien des méningites néo-natales (Patrick *et al.*, 1988).

3.2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa sont des bacilles à Gram négatif, fines de 1.5 à 3 μm de long et de 0.5 à 0.8 μm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche.

P. aeruginosa ne forme ni spores ni sphéropastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le premier rang pour les infections pulmonaires et le troisième rang pour les infections urinaires (Richard et Kiredjian, 1995).

3.3 Description des levures étudiées

Les levures sont des champignons microscopiques unicellulaires de forme sphérique ou ovoïde. Ces champignons se reproduisent par un phénomène asexué (bourgeoisement) auquel peut s'associer, selon les espèces, une reproduction sexuée. Elles ont un thalle constitué d'éléments unicellulaires appelés blastopores et mesurent de 4 à 10 μm . Les levures sont responsables des levuroses qui sont des mycoses (les affections cutanées, les muqueuses viscérales et septicémiques). (Bouchet *et al.*, 2005).

3.3.1. *Candida Albicans*

Ce sont des champignons à formes variées. Ils sont le plus souvent arrondis, globuleux et à bourgeoisement multiple. Ils ont une surface cireuse avec une couleur blanc-cassée à crème. *C.albicans* se trouve dans les cavités naturelles de certains animaux et de l'homme. En pathologie *C.albicans* est la cause, de 70 à 80 % des cas de candidoses humaines (Bouchet *et al.* 2005).

Deuxième partie :

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué par les feuilles (**Figure N°10**) de *Lawsonia inermis*, récolté dans la Wilaya d'Adrar, située dans le sud-ouest d'Algérie. Les feuilles sont débarrassées du sable collé. Après, le matériel végétal est séché à l'ombre et à température ambiante (**Brunneton, 1999**).

Après séchage, les feuilles sont finement broyées à l'aide d'un broyeur mécanique et conservées dans des bocaux hermétiques, à sec et à l'abri de l'humidité (**Figure N°07**).



Figure N°07:

Représentation photographique des feuilles de *Lawsonia inermis*

2. Matériel biologique :

Pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des différents extraits de *Lawsonia inermis*, nous avons choisi des souches bactériennes et fongiques de références. Ces dernières sont disponibles au laboratoire du centre universitaire d'Ain Temouchent. Elles sont entretenues par des repiquages successifs et réguliers sur gélose nutritive pour les bactéries et sur gélose sabouraud pour les levures puis conservées à +4°C.

Il s'agit de :

✓ **Quatre (4) souches à Gram positif :**

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Staphylococcus aureus methicillin resistant ATCC 43300

Bacillus cereus ATCC 1876

Bacillus Subtilis ATCC 6633

✓ **Deux (2) souches à Gram négatif :**

Escherichia coli ATCC 25933

Pseudomonas.aeruginosa ATTC 27853

✓ **Une souche de levure :**

Candida albicans ATCC 10231

3. Méthodes

3.1. Etude phytochimique

L'extraction des différentes composantes des feuilles de la plante, est réalisée dans les mélanges eau/acétone et eau/éthanol à chaud et sous agitation continue.

Pour cela, dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, en place 5 g de notre matière végétale séchée et broyée avec 50 ml du solvant utilisé. L'ensemble est porté sous reflux pendant 30 minutes (**Trease et Evans, 1987**). Les extraits sont filtrés et stockés sous forme liquide à 4°C pour les analyses ultérieures (tests phytochimiques).

3.1.1. Les tanins (Karumi et coll., 2004) :

On ajoute 3 gouttes de FeCl₃ 1% à 1 mL de chaque extrait. Après deux minutes d'incubation, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue ou verte foncée.

3.1.2. Les flavonoïdes (Karumi et coll.,2004) :

2 mL de chaque extrait sont évaporés et le résidu est repris dans 5 mL d'alcool chlorhydrique dilué 2*N. En ajoutant 2 à 3 copeaux de magnésium, la présence des flavones aglycones est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange.

3.1.3. Les terpénoïdes :

On ajoute 1 mL de chloroforme et 1.5 mL de H₂SO₄ concentrée à 2.5 mL de notre extrait. La présence des terpénoïdes est révélée par l'apparition de deux phases et une couleur marron en interphase.

3.1.4. 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 NH₄OH à 10 %.

L'examen est réalisé sous la lumière ultraviolette et l'apparition d'une fluorescence intense révèle la présence de coumarines. (**Benmehdi, 2000**)

3.1.5. Les alcaloïdes :

2.5 mL d'HCl à 1 %, sont ajoutés à 0.1 mL de l'extrait, et incubés au bain- marie. L'extrait obtenu est divisé en deux parties. On ajoute à l'un le réactif de Mayer et l'autre servira de témoin. L'apparition d'un précipité blanc ou brun révèle la présence des alcaloïdes.

Matériel et méthodes

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.

3.1.6. Les quinones libres :

A un volume de 1 mL 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).

3.1.7. 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 1 cm.

3.1.8. Les composés réducteurs :

On ajoute 1 mL de nos extraits 0.5 mL de Liqueur de Fehling puis on chauffe les tubes au bain marie à 40°C. Un test positif est indiqué par l'apparition d'un précipité de couleur rouge brique (Trease et Evans, 1987)

3.2. Etude de l'activité antimicrobienne:

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

3.2.1.1. Préparation de l'extrait brut aqueux

Nous avons utilisé la technique d'extraction sous reflux continue. 10g de poudre des feuilles de *Lawsonia inermis* sont mises en contact avec 100mL d'eau distillée. L'opération est répétée trois (03) fois en renouvelant le solvant toutes les 30 minutes. Les trois (03) fractions sont réunies puis filtrées et évaporées à sec.

3.2.1.2. Préparation de l'extrait eau /méthanol :

Pour la préparation de l'extrait eau/méthanol, nous avons utilisé le protocole d'Upson et ses collaborateurs (2000). 5g de poudre végétale sont laissées macérer pendant 48h dans 50mL de méthanol à 70% en renouvelant le solvant toutes les 24 heures. Après filtration, le filtrat est évaporé sous vide à sec en utilisant un rotavapeur.

3.2.1.3. Préparation de l'extrait des tanins :

L'extraction des tannins des feuilles et racines de la plante *Lawsonia inermis* est réalisée selon la méthode de **Zhang et coll., 2008**. Les broyats de la matière végétal (2.5 g) ont été extraites par 50 mL du mélange acétone/eau (35/15 : V/V) durant trois jours à température 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 trois fois avec l'acétate d'éthyle (V/V). Les 3 phases organiques obtenues sont réunies et évaporées à sec à 40°C par un rotavapeur. La phase aqueuse restante est traitée trois fois par le 1-butanol. Les phases 1-butanol sont évaporées à sec, afin de récupérer l'extrait sous forme de poudre (**Figure N°08**).

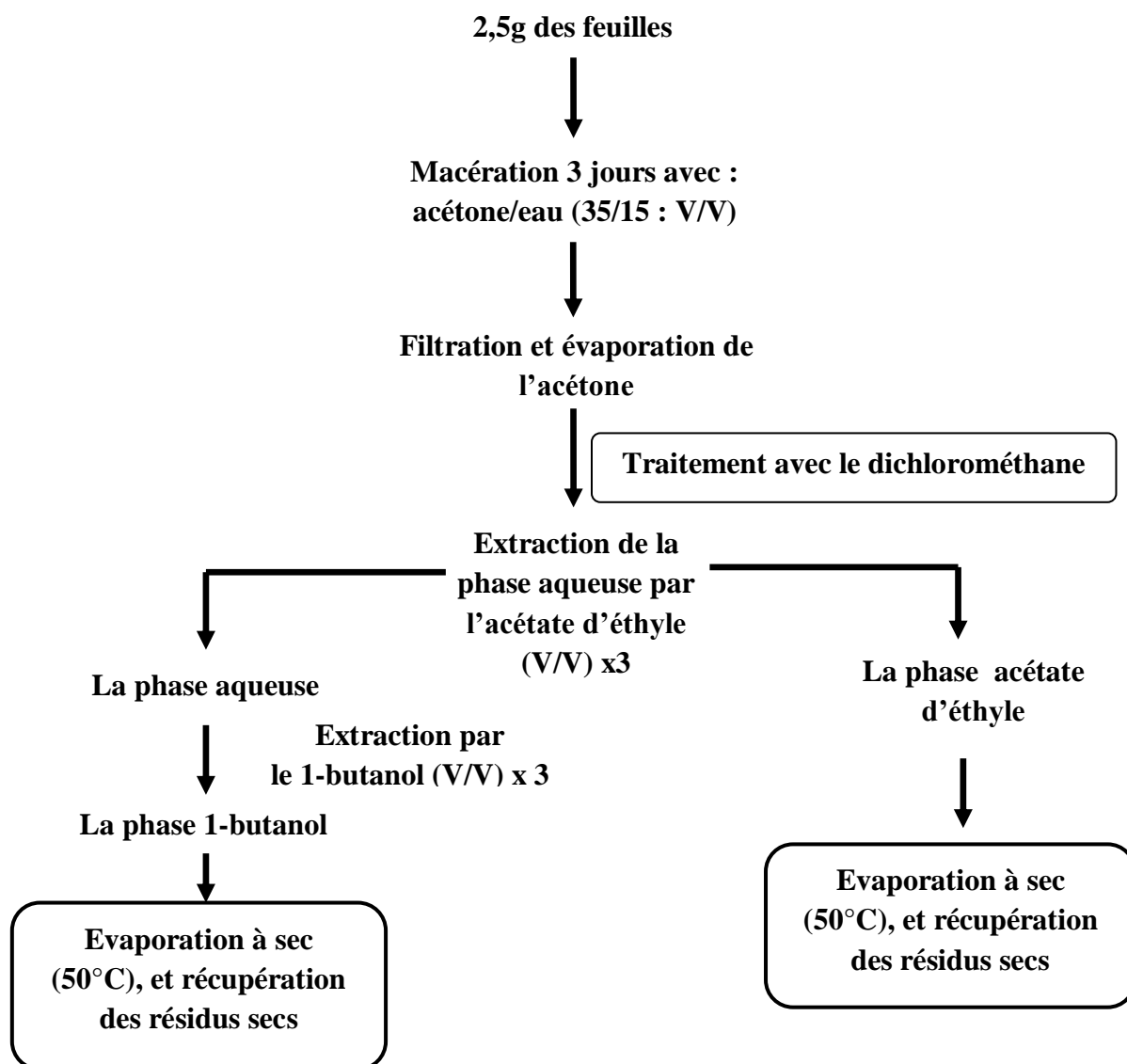


Figure N°08:

Schéma de l'extraction des tanins des feuilles de *Lawsonia inermis*

3.2.2. Calculs des rendements en extraits:

Le rendement en extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait brut sec et la masse du matériel végétal broyé à traiter.

$$R = (M1/M2) \times 100$$

R : rendement en extrait brut sec exprimé en %.

M1 : masse en grammes de l'extrait brut sec.

M2 : masse en grammes du matériel végétal broyé.

3.3. Evaluation de l'activité antibactérienne de *Lawsonia inermis*:

L'activité antibactérienne des différents extraits de *Lawsonia inermis* a été évaluée par deux méthodes de référence:

- La technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques);
- La méthode de microdilution en milieu liquide pour déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).

Il faut noter que le DMSO à la concentration finale utilisée, n'exerce aucune activité vis-à-vis des souches testées.

3.3.1. Technique de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode des disques)

Pour la préparation de l'inoculum, chaque culture bactérienne estensemencée en stries sur une gélose nutritive pour obtenir des colonies bien isolées. Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, quelques colonies sont transférées à l'aide d'une anse de platine dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique. Les densités optiques sont ajustées à l'aide d'un spectrophotomètre «SPECORD 200 plus» à une longueur d'onde de 625 nm. La densité optique doit être comprise entre 0,08 et 0,1 l'équivalent de 10⁸ UFC/mL (CLSI, 2006).

L'inoculum ainsi préparé est dilué au 1/100^{ème} dans de l'eau physiologique. La densité optique finale obtenue de l'inoculum doit être équivalente à 10⁶ UFC/mL. Les boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton gélosé sontensemencées par écouvillonnage [(EUCAST, 2003) ; (Joffin et Leyral, 2006)]. Des disques de 6 mm de diamètre sont préparés en extemporané à partir de papier filtre stérile, puis imprégnés avec les extraits à tester (20µL pour chaque disque). Les disques sont placés aseptiquement sur la gélose inoculée préalablement. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne est déterminée par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques. L'activité antibactérienne se traduit par un

halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré et est exprimé en millimètre (Joffin et Leyral, 2006).

3.3.2. La méthode de la microdilution en milieu liquide (CMI)

Le bouillon Muller Hinton (MHB) supplémenté en cations est largement utilisé comme milieu standard pour la microdilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes, en plus de son faible effet antagoniste vis-à-vis des antibiotiques (EUCAST, 2003). La microplaque à 96 puits permet de déterminer les CMI des différents extraits végétaux. Dans les puits des colonnes 1 à 12, nous avons introduit à l'aide d'une micropipette 100µL de bouillon Muller Hinton (MHB). Ensuite, 100µL de l'extrait végétal est ajouté dans le 2ème puits (qui servira de témoin négatif) et 100µL dans le 3ème puits. A partir de ce dernier, nous avons procédé à des dilutions de 100µL de puits à puits à l'aide d'une micropipette. Le facteur de ½ est pris en considération dans le calcul des concentrations des produits à tester. Chaque puits contient 100µL de bouillon et le produit testé en dilution. Ensuite, nous avons additionné 100µL de l'inoculum (10^6 UFC/mL) dans les 96 puits sauf ceux de la colonne 2 (témoin négatif). Le puits 1 sert de témoin positif (100µL du bouillon et 100µL de l'inoculum). La microplaque est couverte et incubée à 37°C de 18 à 20 heures. La lecture se fait à l'œil nu sachant que la CMI est la plus faible concentration de la substance testée, à laquelle aucun trouble visuel n'est observé. Nous avons utilisé comme antibiotique de référence la gentamycine à une concentration finale de 5 mg/mL.

3.4. Evaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des levures

L'évaluation de l'activité des extraits vis-à-vis des levures est réalisée par la méthode de diffusion sur milieu solide recommandée par CLSI (Espinel-Ingroff, 2007).

Nous avons utilisé le milieu Mueller Hinton additionné de 2% de glucose et de 0,5 µg/mL de bleu de méthylène. L'inoculum équivalent au 0,5 McFarland est préparé selon les mêmes étapes que celles décrites pour les bactéries sauf que l'absorbance est de l'ordre de 0,12 à 0,15 à une longueur d'onde de 530 nm équivalent à $1-5 \cdot 10^6$ UFC/mL. L'ensemencement est effectué par inondation. Les disques immergés par les produits à tester sont déposés après séchage de la boîte. Ces dernières sont incubées à 35°C pendant 24h. La lecture est réalisée de la même façon que celle décrite pour les bactéries.

L'étude de la CMI des levures est réalisée de la même manière que celles des bactéries, sauf que le milieu de culture utilisé est le milieu sabouraud liquide. L'inoculum est ajusté à une absorbance de l'ordre de 0,12 à 0,15 lue à 530 nm.

Troisième partie :
Résultats et discussion

1. Etude phytochimique

1.1. Les tests phytochimiques

Les tests phytochimiques sont des méthodes et des techniques de préparation et d'analyse qui consistent à détecter quelques grands groupes de métabolites secondaires contenus dans les extraits étudiés de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces derniers sont basés sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés. Les résultats obtenus sont résumés dans **le tableau N°03**.

Nous remarquons une forte présence dans les feuilles de la plante *lawsonia inermis* : des tanins et des terpénoïdes dans les deux extraits testés. La recherche des alcaloïdes et des quinones libres s'est révélée moyennement positive. L'apparition d'une fluorescence sous une lumière UV indique la présence des coumarines uniquement dans l'extrait eau / acétone des feuilles de la plante.

Pour les flavonoïdes, leur présence est plus importante dans l'extrait eau / acétone que dans l'extrait eau / éthanol des feuilles de *Lawsonia inermis*. Dans les différents extraits testés, la recherche des composés réducteurs et des saponosides s'est montrée négative.

Tableau N°03: Résultats des réactions de caractérisation des différents groupes chimiques recherchés dans les extraits des feuilles de *Lawsonia inermis*.

Test phyto-chimique / Extrait	Eau/éthanol	Eau/acétone
Les tanins	++	++
Les flavonoïdes	-	+
Les terpénoïdes	++	++
Les coumarines	-	++
Les alcaloïdes	+	+
Les quinones libres	+	+
Les saponosides	-	-
Les composés réducteurs	-	-

Réaction positive : ++

Réaction moyennement positive : +

Réaction négative : -

Résultats et discussion

Les résultats de notre évaluation chimique concordent avec de nombreux travaux publiés. Effectivement, quatre groupes de composés bioactifs sont identifiés: triterpènes, alcaloïdes, tannins et quinones sont présents dans nos extraits bruts méthanoliques et aqueux des feuilles de *Lawsonia inermis* (Gagandeep et al., 2010). En revanche les composés flavonoïdes ne sont révélés dans aucun extrait de la plante étudiée. Ce qui n'est pas en accord avec les travaux de certains auteurs. Cette non concordance des résultats serait due au choix du solvant et au mode d'extraction comme l'a affirmé Mamyrbekova-Bekro et ses collaborateurs en 2013.

Selon Musa et Gasmelseed (2012), l'analyse phytochimique des constituants polyphénoliques des extraits de feuilles de *Lawsonia inermis* a permis l'isolement et l'identification des tanins condensés dans les proportions de (11,12%). Ce constat est affirmé par Trigui et al., (2013) qui a mis en évidence des flavonoïdes, des quinones, des tanins et des terpènes lors de son analyse chimique sur les feuilles de *Lawsonia inermis*.

Les différentes familles existantes dans la plante justifient leur utilisation thérapeutique. En effet, la présence des tanins explique l'utilisation de *L.inermis* pour la cicatrisation des tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure et pour protéger les organes digestifs des attaques nuisibles (effet anti diarrhéique). D'autre part la présence des terpénoïdes justifie l'utilisation traditionnelle des feuilles de la plante de henné pour calmer les douleurs dues aux céphalées ou au rhumatisme.

1.2. Les rendements en extraits secs :

Les extractions des différents composés les plus abondants dans notre plante nous ont permis de calculer le rendement de chaque extrait notamment les extraits bruts aqueux, eau/méthanol et tannins (fraction acétate d'éthyle et 1-butanol) à partir des feuilles de *Lawsonia inermis*. Le rendement qui est déterminé par rapport à 10g de la matière végétale sèche et broyée, est exprimé en pourcentage. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau N°04 et la figure N°09.

Tableau N°04 : Rendement des extraits des feuilles de la plante *Lawsonia inermis*.

Les extraits des feuilles	Rendement en %
Brut aqueux	11,8%
Brut: Eau/ Méthanol	24,9%
Acétate d'éthyle	14,8%
1- butanol	9,4%

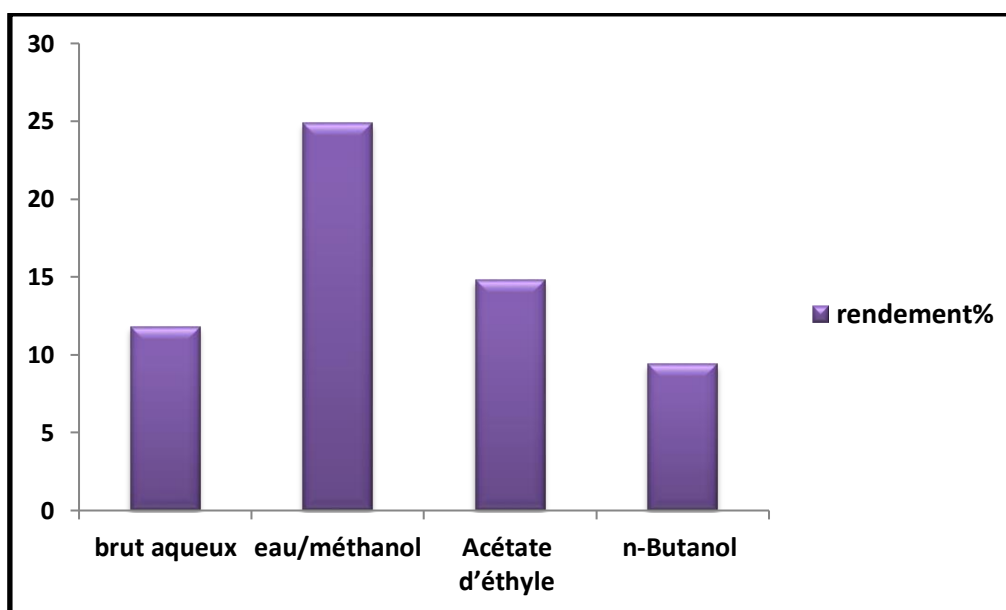


Figure N°09:

Rendements des extraits des feuilles de la plante *Lawsonia inermis*.

D'après les résultats enregistrés dans le **tableau N°04**, nous remarquons que l'extrait brut représente le rendement le plus élevé, avec un pourcentage de 24.9% dans l'extrait eau/méthanol et de 11.8% dans l'extrait brut aqueux.

De même pour l'extrait des tanins, le rendement le plus élevé est enregistré dans la fraction acétate d'éthyle (14.8%), suivi de la fraction 1-butanol (9.4%). Les différents rendements illustrés dans la **figure N°09** viennent confirmer les intensités des résultats des tests phytochimiques et nous pouvons dire que l'extrait brut des feuilles est essentiellement constitué en polyphénols.

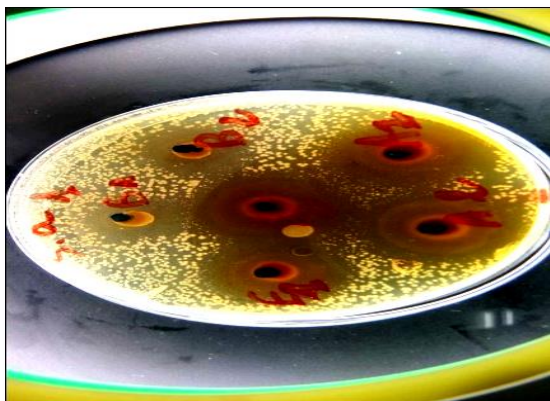
2. Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits de *Lawsonia inermis* :

2.1. La technique de diffusion sur gélose Mueller Hinton (méthode des disques)

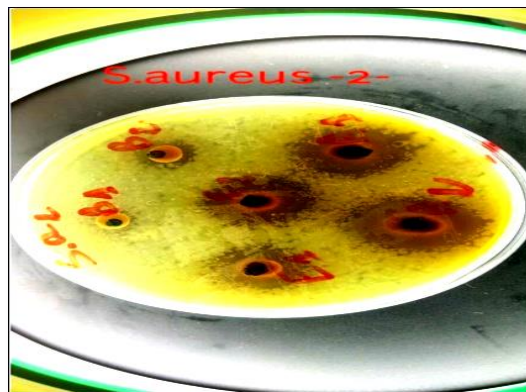
La technique de diffusion des disques sur milieu solide est une technique qualitative basée sur la mesure des diamètres d'inhibitions en mm. En effet, les différents extraits de notre plante sont testés sur des bactéries de référence à Gram (+) et à Gram (-). Cette mesure est transcrite dans différents symboles proportionnels à l'activité (**Tableau N°05**) (**Figure N°10**).

Tableau N°05 : Transcription des valeurs des diamètres d'inhibition (D)

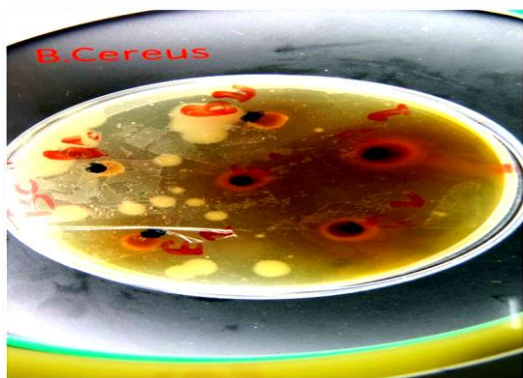
Inhibition	Sensibilité
$D < 8\text{mm}$	Résistante
$9\text{mm} \geq D \leq 14$	Sensible
$15\text{mm} \geq D \leq 19\text{mm}$	Assez sensible
$D > 20\text{mm}$	Très sensible



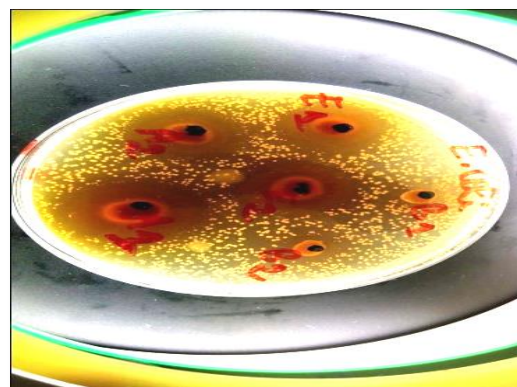
Staphylococcus aureus (1) ATCC 25923



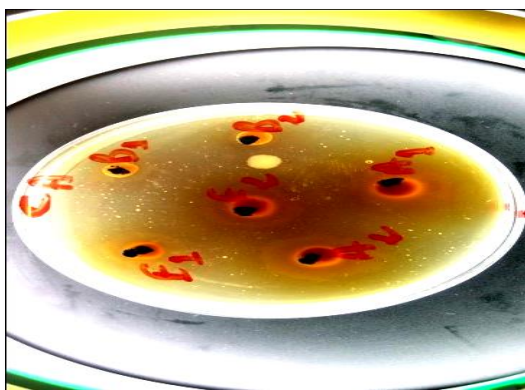
Staphylococcus aureus (2) ATCC 43300



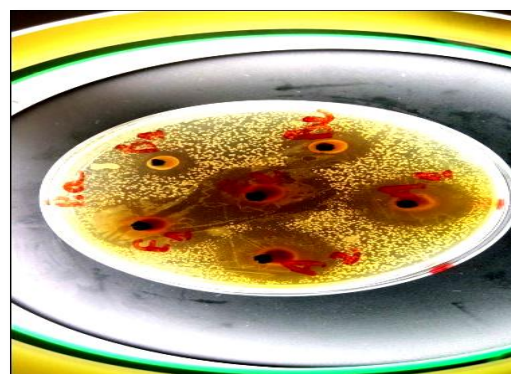
Bacillus Cereus ATCC 1876



Escherichia coli ATCC 25922



Candida albicans ATCC 10231



Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Figure N°10 : Représentation photographique de l'effet des différents extraits des feuilles de *L.inermis* vis-à-vis des souches microbiennes.

B1 : extrait brut aqueux = 200mg/mL

B2 : extrait brut aqueux = 300mg/mL

E1 : extrait eau/méthanol =250mg/mL

E2 : extrait eau/méthanol = 500mg/mL

A1 : extrait acétate d'éthyle = 300mg/mL

A2 : extrait acétate d'éthyle =200mg/mL

N1 : extrait 1 butanol =200mg/mL

Résultats et discussion

Les résultats des tests qualitatifs de l'activité antibactérienne des extraits obtenus sont regroupés dans le **tableau N°06**. Les valeurs indiquées sont les moyennes des triplicatas pour chaque test.

Tableau N° 06: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis*

Extraits	Diamètres des zones d'inhibition (mm)					
	Bactéries à Gram positif				Bactéries à Gram négatif	
	<i>B. Cereus</i> ATCC 1876	<i>B. Subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATTC 25923	<i>S. aureus</i> ATTC 43300	<i>E. coli</i> ATTC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATTC 27853
Brut Aqueux 1	12	6	16	8	13	11
Brut Aqueux 2	15	10	17	11	11	14
Eau/méthanol 1	21	15	24	14	20	18
Eau/méthanol 2	16	17	25	18	23	21
Acétate d'éthyle 1	20	23	23	18	24	16
Acétate d'éthyle 2	22	21	27	20	19	20
1-butanol	18	21	25	15	23	12

Résultats et discussion

Les résultats représentés montrent que chacun des extraits a une activité bien définie sur la croissance des bactéries testées. En se basant sur les résultats illustrés dans **le tableau N°06**, nous pourrions déduire que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* que les bactéries à Gram négatif. En effet, les diamètres d'inhibition varient de 11 à 27 mm chez les bactéries à Gram positif et de 11 à 24 mm chez les bactéries à Gram négatif.

La fraction acétate d'éthyle (2) a un réel effet antibactérien sur la totalité des souches bactériennes de références en donnant des diamètres d'inhibition variables (20- 27mm).

Les souches *B.Cereus* ATCC 1876 et *B.Subtilis* ATCC 6633 sont sensibles à tous les extraits testés.

Nous remarquons aussi que l'extrait spécifique de la fraction butanolique des feuilles exercent une activité inhibitrice remarquable vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *B. Cereus* ATCC 1876 avec des diamètres d'inhibition de 27mm et 22mm respectivement.

Sur la base des résultats obtenus nous pouvons dire que tous les extraits de *Lawsonia inermis* possèdent une activité antibactérienne relativement importante vis-à-vis des bactéries testées. Cette activité inhibitrice est probablement liée à leur richesse en flavonoïdes, alcaloïdes, tanins et coumarines qui peuvent être qualifiés de molécules antibactériennes.

2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) :

L'activité antibactérienne des différents extraits qualifiés par l'antibiogramme ont été quantifiés par la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (**CMI**). La CMI est un critère d'importance majeure. Elle est jugée comme la plus faible concentration à laquelle nous observons une réduction importante de la croissance bactérienne (aucun trouble n'est observé). Ces concentrations nous permettent de comparer l'activité de nos extraits avec celle de l'antibiotique de référence choisi. Notre choix a porté sur la gentamycine préparée à une concentration mère de 5 mg/mL.

Les résultats relatifs aux CMI de la gentamycine et des différents extraits de *Lawsonia inermis* vis-à-vis des six souches testées sont regroupés dans **le tableau N°07**

Résultats et discussion

Tableau N°7: Concentration minimal inhibitrice (CMI) (mg/mL) des extraits de feuille de *Lawsonia inermis*

Extraits	CMI (mg/mL)					
	Bactéries à Gram positives				Bactéries à Gram négatives	
	<i>B. cereus</i> ATCC 1876	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>S. aureus</i> ATTC 25923	<i>S. aureus</i> ATTC 43300	<i>P. aeruginosa</i> ATTC 27853	<i>E. Coli</i> ATTC 25922
Brut Aqueux	12,5	12,5	12,5	3,1	1,56	25
Eau /méthanol	0,97	15,16	1,95	0,48	/	3,90
Acétate d'éthyle	0,75	0,75	4,68	0,75	0,75	0,93
1-butanol	0,5	6,25	3,25	0,5	6,5	6,25
Antibiotique Ampinax (5mg/mL)	0,31	0,62	2,5	0,62	0,62	0,15

Sur la base de ces résultats nous pouvons dire que les valeurs des CMI varient d'une bactérie à l'autre en fonction des différents extraits testés. Ces derniers sont beaucoup plus actifs sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Les CMI varient de 0,48 à 15,16 mg/mL chez les bactéries à Gram positif et de 0,75 à 6,25 mg/mL chez les bactéries à Gram négatif.

Résultats et discussion

Les résultats obtenus dans le **tableau N°07** des différents extraits sur les 6 souches bactériennes, montrent que :

- Les extraits bruts aqueux et eau/méthanol présentent des CMI intéressantes vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATTC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 et *Bacillus cereus* ATCC 1876 avec des concentrations égales à 0,48 ; 1,56 et 0,97 mg/mL respectivement.
- L'extrait spécifique de la fraction acétate d'éthyle est doué d'une bonne activité antibactérienne avec une CMI = 0,75 mg/mL vis-à-vis de *B. cereus*, *S. aureus* ATTC 43300 et de *P. aeruginosa*.
- L'extrait spécifique de la fraction butanolique du henné est lui aussi très actif vis-à-vis des deux souches de *B. cereus* et *S. aureus* ATTC 43300 avec une CMI de 0,5 mg/mL.
- Par contre l'extrait brut aqueux s'est montré le moins actif par rapport aux autres extraits avec une CMI qui varie entre 1,56 et 12,5 mg/mL.

En comparant ces valeurs avec celles obtenues avec l'antibiotique, nous remarquons que l'effet inhibiteur de la gentamycine est plus important.

L'extrait alcoolique des feuilles de henné possède des propriétés antibactériennes d'une nature étendue ; il est plus au moins actif selon les espèces. Cette activité antibactérienne est due à des composés phénoliques et principalement à la lawsone, l'acide gallique et la 1,4 naphthoquinone (**Munshi et al., 1977**).

L'activité antibactérienne des produits naturels dérivés de henné tel que : naphthoquinone alkannin et shikonin et leurs dérivés a été étudiée (**Riffel et al., 2002**). En général, ils sont actifs contre les bactéries Gram-positif telles que *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* et *Bacillus subtilis*, mais sont inactifs contre les bactéries Gram-négatif (**Papageorgiou et al., 1999**). **Emori et ses collaborateurs en 1993**, démontre que dans l'infection nosocomiale, *Staphylococcus aureus* est l'un des micro-organismes les plus répandus dans le monde. Les souches résistantes à la méthicilline représentent 15 à 45% de tous les isolats de *Staphylococcus aureus*. L'action inhibitrice du henné a été montrée contre les deux microbes Gram négatif et Gram positif.

Les études menées par **Sharma et al., (1995)** montrent que la lawsone, l'agent antimicrobien dans le henné a exercé des effets inhibiteurs sur les pathogènes urinaires nosocomiaux courants tels que *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* à certaines concentrations.

Résultats et discussion

3. Evaluation de l'activité antifongique des différents extraits de *lawsonia inermis* :

Cette évaluation est effectuée sur une souche de *Candida albicans* (ATCC 10231) suivant les méthodes de référence CLSI (NCCLS) M38-A2 pour la technique de diffusion sur gélose et de microdilution en milieu liquide.

Nous avons utilisé comme antifongique de référence la fungizone (0,1mg/mL). Il s'agit de l'antifongique le plus utilisé en milieu clinique.

Les résultats des tests qualitatifs et quantitatifs de l'activité antifongique des extraits de la plante *Lawsonia inermis* sont regroupés dans le **tableau N°08**.

Tableau N° 08: Diamètres des zones d'inhibition (mm) et CMI des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* vis-à-vis des souches de *Candida albicans*.

Extraits	Levure	
	<i>C.albicans</i> ATCC 10231	
	Diamètres des zones d'inhibition (mm)	CMI (mg/mL)
Brut Aqueux 1	11	
Brut Aqueux 2	15	0,78
Brut : Eau/méthanol 1	16	
Brut : Eau/méthanol 2	19	0,24
Acétate d'éthyle 1	24	
Acétate d'éthyle 2	20	0,25
1-butanol	23	0,1
Antifongique Fungizone (0,1mg/mL)	25	0,01

Résultats et discussion

Les extraits des deux fractions de tanins des feuilles du henné possèdent une bonne activité vis-à-vis de la souche de *Candida albicans* par rapport aux extraits bruts.

Les diamètres des zones d'inhibition des extraits des tanins varient de 20 à 24 mm (comparativement à celui de l'amphotéricine B).

Selon les résultats des tests quantitatifs de l'activité antifongique des extraits de la plante *L.inermis* mentionnés dans le **tableau N°08**, nous pourrions dire que la fraction 1-butanol et eau/méthanol du henné ont montré une activité importante vis-à-vis de la souche testée. Cependant, cette activité reste nettement inférieure à celle de la fungizone.

Concernant *L. inermis*, **Misra et Dixit (1979)** ont rapporté que l'extrait méthanolique de cette plante possède une activité antifongique. Des analyses phytochimiques de cette plante ont révélé la prédominance de composés phénoliques tels que : les coumarines, les flavonoïdes, les naphthalènes et les dérivés de l'acide gallique (**Siddiqui et al., 2003**).

Abulyazid et ses collaborateurs en 2010, ont signalé la richesse de cette plante en naphthoquinones dont les principaux composants sont la juglone, la lawsone et la plumbagone. Des études portées sur les naphthoquinones naturelles (**Brigham et al., 1999**) et celles obtenues par synthèse (**Riffel et al., 2002**) ont démontré que ces molécules inhibent la croissance de souches fongiques et bactériennes pathogènes.

Rahmoun et al. (2010) affirment que les différents extraits d'éthanol et d'acétate d'éthyle du henné comme étant les fractions les plus actives contre la levure *C. albicans*. Ces données suggèrent que cette activité est fortement liée à la présence de la *lawsone* dans des feuilles de henné. L'inhibition de la croissance de micro-organismes témoigne que le henné Algérien peut être largement exploité dans la recherche de nouveaux médicaments antimicrobiens.

Quatrième partie
Conclusion générale
et perspectives

Conclusion générale et perspectives

En raison de sa richesse en métabolites secondaires doués d'une activité antimicrobienne, notre plante étudiée « *Lawsonia inermis* » peut être une source primordiale pour produire de futurs remèdes naturels contre les différentes maladies infectieuses.

Il convient donc de placer ce travail dans un contexte plus prospectif, car sur de nombreux points, il ouvre plusieurs nouvelles voies de recherche. Il se place également dans une problématique de recherche pluridisciplinaire, associant des techniques caractéristiques de la chimie organique, de la microbiologie mais aussi de la biochimie. Nous avons pu aborder ces dernières de manière générale, en privilégiant toutefois la microbiologie qui constitue l'ossature de l'étude.

Les études phytochimiques ont montré la présence de nombreux composés dans les feuilles de henné, tels que les tanins, les stérols et triterpènes, les quinones libres, les alcaloïdes et les coumarines. Ces groupes chimiques sont connus pour leurs activités antimicrobiennes et leurs propriétés pharmacologiques.

Concernant l'activité antimicrobienne des extraits des feuilles de la plante, elle est testée vis-à-vis de six souches bactérienne de références et une seule souche de levure (*C.albicans* ATCC10231) par la méthode des disques diffusés sur gélose et la technique des microdilutions sur milieu liquide. Ces extraits possèdent en générale, une bonne activité vis-à-vis des sept microorganismes étudiés. Les souches bactériennes les plus sensibles à nos extraits sont : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus Cereus* ATCC 1876 et *Bacillus Subtilis* ATCC 6633.

Il ressort de cette étude que les résultats obtenus in-vitro constituent une première étape dans la recherche de substances naturelles biologiquement actives. Il serait toute fois intéressant d'approfondir les investigations phytochimiques et biologiques de cette plante afin d'isoler les molécules responsables des activités observées, ce qui permettra d'élargir l'arsenal thérapeutique des médicaments à base de plantes. Ces produits ont l'avantage d'avoir un faible coût pour des populations à faible pouvoir économique et qui, de surcroît, sont très sensibles à la valorisation de sa médecine traditionnelle.

Il serait donc intéressant d'approfondir cette études par :

- Une étude de l'activité antifongique de *Lawsonia inermis* vis-à-vis des souches de champignons et moisissures.
- Des extractions sélectives des différentes familles chimiques.
- Tester les différentes molécules isolées in-vivo afin de trouver des applications thérapeutiques de ces molécules actives.

Cinquième partie :
Références bibliographiques

- **Abd-el-Malek Y, El-Leithy MA, Reda FA, Khalil M., (1973).** Antimicrobial principles in leaves of *Lawsonia inermis*. *Landwirtschaftliche und Technische Mikrobiologie* 128: 61-67.
- **Abdelwahed A, Bouhleb I et Skandrani I, (2007)** Study of antimutagenic and antioxidant activities of gallic acid and 1,2,3,4,6- pentagalloylglucose from *Pistacia lentiscus* Confirmation by microarray expression profiling. *Chemico-Biol Interact* 165: 1–13
- **Abulyazid, I. Elsayed M.E. Mahdy b, Ragaa M. Ahmed., (2010).** Biochemical study for the effect of henna (*Lawsonia inermis*) on *Escherichia coli*. *Arabian Journal of Chemistry*, doi:10.1016/j.arabjc.2010.10.005(In press).
- **Afolayan A. J. ET Meyer J. J. (1997)** the antimicrobial activity of 3, 5, 7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *J. Ethnopharmacol.* 57:177-1781.
- **Aighevi B.A., Akoroda, M., Asiedu, R. (1998).** “Preliminary studies of seed yam production from minisetts with different thicknesses of cortex parenchyma in white yam (*Dioscorea rotundata*)”, 6th Symposium of the ISTRC-AB, Lilongwe (Malawi),p: 22-28 .
- **Arbonnier M (2009)** Arbres, arbustes et lianes des zones sèches d'Afrique de l'Ouest. Editions Quae Amazon France 3^{ème} édition 528 P.
- **Arrif S., (2009)** Etude des métabolites secondaires de deux scrophulariacées du genre *Verbascum*: *V. ballii* et *V. dentifolium*.
- **Awad M.H.and El egami A; (2002).**"The Regioselectivity of Glutathione Adduct Formation with Flavonoid Quinone/Quinone Met hides is pH-Dependent".*Chem. Res. Toxicol.* 15: 343-351 Bacilles à gram négatif aérobies stricts: *Pseudomonas*, *Alcali gènes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, Brucelles, Bordetella. 2^{ème} édition. Ed Institut. Pasteur .Paris. P: 42-43.
- **Badiaga, M. (2011).** Etude ethnobotanique, phytochimiques et activités biologiques de *Nauclea latifolia smith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako10 p. 183 p.
- **Bartosikova, Neca, Such et Kubinova (2003).** Antioxydative effects of *M orine inischemia*, reperfusion of kidney in the laboratory. *Drug and Chemical Toxicology*, 72, 87-94.

Références bibliographiques

- **Belbache, H. (2003).** Investigation phytochimiques de l'extrait chloroforme de *Centaurea Parviflora Desf*, mémoire de magister en chimie organique, université Mentouri Constantine. p 16-20.
- **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.
- **Benmahdi H. (2000).** Synthèse des molécules à double activité anti-PAF et anti-HIV. Thèse de Doctorat à l'université de Béchar.
- **Berreghioua. (2016).** Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux brassicaceae médicinales du sud algérien : *Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera*, Thèse en vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat p 13.
- **Berube-Gagnon J (2006).** Isolation et identification de composés antibiotiques des écorces de *Picea mariana*. Thèse de doctorat a l'université de Québec.
- **Besle J, Lamaison J, Pradel P, Fraisse D, Viala D and Martin B (2004).** Les flavonoïdes, des fourrages au lait. *Renc Rech Ruminants*, 11, 67-70.
- **Bezanger - Beau Quesne L- Pinkas. M. (1986)** Les plantes dans la thérapeutique moderne 2ème édition MALOINE –Paris. Pp 68-262-268.
- **Botineau., (2010)** Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs édition Lavoisier 501pp.
- **Botros R., Mikhaeil Farid A., Badria Galal T. Maatooq and Mohamed M. A. Amer (2004).** Antioxidant and Immunomodulatory Constituents of Henna Leave, *Z. Naturforsch.* 59c: 468-476.
- **Bouchet PH., Guignard J.-L. Pou chus Y.-F., Villard J., (2005)** Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Abrégés de Pharmacie, Paris : Masson.
- **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.
- **Boutaoui ; N. (2012).** Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires de *Matricaria Chamomilla* (Asteraceae) Etude de la phase acétate d'éthyle. Thèse pour obtenir le diplôme de Magister. P47.
- **Boutine ; D. (2011) ;** évaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne d'une plante endémique algérienne *Ampelodesma mauritanica*. Mémoire l'obtention du diplôme de magister.p9.

Références bibliographiques

- **Brigham, L.A., Michaels, P.J., Flores, H.E., (1999).** Cell-Specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Physiol.* 119, 417–428.
- **Brouta F., Dexamps F., Losson B., Mignon B., (2001).** Données récentes sur la pathogénèse de l'infection à *Microsporium canis* chez les Carnivores domestiques. *Ann. Méd. Vêt.* Vol. 145 ; pp 236-242.
- **Bruneton J. (1993).** Pharmacognosie - Phytochimie - Plantes médicinales. 3^{ème} édition, *Technique et documentation, Lavoisier*, Paris. France.
- **Bruneton J., (1999).** Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. *Tec. & Doc.* Lavoisier 3^{ème} édition, Paris.
- **Bruneton J., (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Paris, 4^{ème} Edition Lavoisier.
- **Burt S., (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 94, pp.223-253
- **Chung KT., Wong TY., Wei CI., Huang YW and Lin Y., (1998).** Tannins and human health: a *Chrysanthemum segetum* L. By capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 709 197-202.
- **Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI. (2009).** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. CLSI document. M07-A8. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.
- **Cordell, G. A., (1981).** Introduction to alkaloids, a biogenetic approach, John Wiley, New York.
- **Cottiglia F., Loy G., Garan D., Floris C., Casu M., Pompei R., Bonsignore L., (2001).** Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine*, 8(4): 302-305.
- **Cushine T P T et Lamb A J (2005).** Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrobial Agent*, 26, 343-356.
- **Das H C, Wang J H and Lien E (1994).** Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoides: a structure system-activity relationship analysis. *Journal of Food Engineering*, 69, 133-136.
- **Degryse A.C., Delpla I. & Voinier M.A., (2008).** Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles. *Atelier santé environnement -IGS- EHESP*, 87p.
- **Delporte. G., Mascolo. N., Izzo. A. A., et al., (1999).** *Life. Scien.* 65(4), 337-53.

Références bibliographiques

- **Denyer S.P., Hodges N.A. et Gorman S.P., (2004).** *Pharmaceutical Microbiology ; Seventh Edition Blackwell, New York.*
- **Djemoui, D. (2012).** Contribution à l'étude de l'activité antioxydants et antibactérienne de quelques coumarines synthétisées. Mémoire Master Academique, Spécialité : Chimie Appliquée. 53p.
- **Drobniewski FA (1993)** BACILLUS-CEREUS AND RELATED SPECIES. *Clinical Microbiology Reviews* 6: 324-338.
- **El Babili F, Valentin A, Chatelain C., (2013).** Lawsonia Inermis: Its Anatomy and its Antimalarial, Antioxidant and Human Breast Cancer Cells MCF7 Activities. *Pharmaceut Anal Acta* 4: 203. Volume 4 Issue 1.
- **El Haib, A.R. (2011).** VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES, DOCTORAT en Chimie organique et catalyse, UNIVERSITÉ DE TOULOUSE. p 10, 12, 15.
- **Emori, T.G. and R.P. Gaynes, (1993).** An overview of nosocomial infections including the role of microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev.*, 6: 428-42.
- **Endemann G, Abe Y, Bryant C M, Feng Y, Smith C W and Liu D Y (1997).** Novel anti-inflammatory compounds induce shedding of L-selectin and block primary capture of neutrophils under flow conditions. *J. Immunol*, 158, 4879-4885.
- **Enneb , A. Belkadhi , F. Cheour ET A. Ferchichi, H (2015).** Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis* L) .p789.
- **Epsinel-ingroff A. (2007).** Standardized disk diffusion method for yeasts. *Clin. Microbiol. Newsl*, 29: 97-100.
- **European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious diseases (ESCMID). (2003).** Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and infectious*, 9 (8): 1-7.
- **Figueredo, G. (2007).** Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (Lamiaceae) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne, thèse présentée pour obtenir le grade de docteur d'université, université Blaise pascal. p15-17.

Références bibliographiques

- **Fiorucci S., (2006).** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat. Université Nice-Sophia Antipolis, 212 p.
- **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).** Review: Tannins and ruminant nutrition. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2 (2), 191-202.
- **Gagandeep C, Sandeep G and Priyanka P,(2010).** *Lawsonia inermis Linnaeus: A Phytopharmacological Review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research.* 2(2): 91-98.
- **Gaignaut J.C., Bitdet D., Perronet J. and Gaillard M; (1989).** "Stérols et stéroïdes", Partie I, Paris-11-31
- **Gbadamassi F., (2007).** La pneumonie, première cause de la mortalité infantile en Afrique, Togo.
- **Ghedira, K. Phytotherapy (2005).** Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie, springer.* Volume 3, Issue 4, pp 162–169.
- **Gonzalez-Tejero M.R., Casares-Porcel M., Sanchez-Rojas C.P., Ramiro-Gutierrez J.M et Molero-Mesa J., (2008).** Medicinal plants in the Mediterranean area: Synthesis of the results of the project Rubia. *J. Ethnopharmacol*, 116: 341-357.
- **Haioun , A. Hamoudi F., (2015).** Activité antioxydante et anti-inflammatoire de la plante médicinale algérienne *Anethium graveolens* et leur effet cardioprotectrice contre la toxicité. Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Master.
- **Harborne J. B., Williams C. A. (2000)** advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 55: 481-504.
- **Harikrishna D., Appa Rao A. V. N., Prabhakar M. C. (2004)** Pharmacological investigation of a flavonoid glycoside. *Indian. J. Pharmacol.* 36 : 244-250.
- **Harkati B. (2011)** « valorisation et identification structurale des principes actifs de la plante de la famille ASTERACEAE : *Scorzonera Undulata* », thèse de doctorat UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE.
- **Hartmann, T. (2007).** From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metab1997olism. *Phytochemistry.*

Références bibliographiques

- **Hatano T., Kusuda M., Inada K., Ogawa T.O., Shiota S., Tsuchiya T., Yoshida T., (2005).** Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66:2047-2055.
- **Havsteen, B.H. (2002).** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* p96, 67– 202.
- **Igor Passi L B. (2002).** Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam. (*Rutaceae*). Thèse Pharmacie, Bamako ; P 133.
- **Jeun, J. M., Annie. F., Chrystian. J. L. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux, p203- 204.
- **Joffin J.N. et Leyral G. (2006).** Microbiologie Technique. Tome 1, Dictionnaire des techniques. 4^{ème} Edition A.S.M Washington, 967-971.
- **Kartal, M., Mitaine-Offer, A.C., Abu-Asaker, M., Miyamoto, T., Calis, I., Wagner, H., Lacaille-Dubois, M.A; (2005).** Two new triterpene saponins from *Eryngium campestre*; *Chem. Pharm. Bull*; 318–1320; 53.
- **Karumi Y., Onyeyili P.A et Oyugbuaja V.O. (2004).** Identification of active principals of *M. Balsamia* (Balsam Apple) leaf extract. *J.Med. Sci*, 4 (3): 179 -182
- **KHADHRI A., (2013).** Composés phénoliques et activités antioxydantes de deux extraits de chardon a glu: *Atractylis gummifera*. *Revue Soc. Sci. Nat. de Tunisie*, 39 : 44-52.
- **Khan I., Kulkari M.V., Gopal M., Shahabuddin., (2005).** Synthesis and biological evaluation of novel angularly fused polycyclic coumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15: 3584-3587.
- **Kotiranta, A., Lounatmaa, K. & Haapsalo, M. (2000).** **Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections.** *Microbes Infect.* **2**, 189-198.
- **Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini M, Alloni G, Azevedo V, M G Bertero, P Bessières, a Bolotin, Borchert S, Borriss R, Bour-sier L, a Brans, Braun M, Brignell S C, S Bron, S Brouillet, Bru-schi C V, Caldwell B, Capuano V, Carter N M, Choi S K, J Codani, Connerton I F, et Danchin A. (1997).** the complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657):249–56.
- **Landry Y. (2012).** Initiation a la connaissance du médicament. Université de Strasbourg, ISBN 978-2-10-058213-6. Paris, France.
- **Larousse Medical. (2006).** Paris: Larousse.

Références bibliographiques

- **Latte LP, Kolodziej H., (2000).** Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Naturforsch* 55(5-6):467-72.
- **Maged, A.S.J (2002).** *Braz. Chem. Soc*, 13, 67-69.
- **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.
- **Malekzadeh F (1968).** Activité antimicrobienne de *Lawsonia inermis L.* *American Society for Microbiology* : 16 (4): 663-634.
- **Mamyrbekova-Bekro J. A., Boua B.B., Diaby A., Bekro Y.A., (2013).** Screening phytochimique bio guidé et évaluation in vitro des propriétés purgatives d'*Anchomanes difformis* (Blume) Engl., une plante utilisée en Côte d'Ivoire dans le traitement folklorique de la constipation. *Revue « Nature & Technologie »*. BSciences Agronomiques et Biologiques, n° 09/ Pages 20 à 26
- **Mann J., Daridson R.S., Hobbs J.B., Banthorpe D.V. et Harborne J.B. (1994)** . "Natural Product: Their chemistry and biological significance", 1ere Edition.
- **Michel .T, Destandau .E, Elfakir. C., (2011).** Evaluation of a simple and promising method for extraction of antioxidants from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides L.*) berries: Pressurised solvent-free microwave assisted extraction. *Food Chemistry*, 126, 1380–1386
- **Misra, S. B. et Dixit, S. N., (1979).** Antifungal activity of leaf extracts of some higher plants. *Acta Botanica Indica*, 7(2), 147–150
- **Mogode D, (2005).** « Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans* vahl (Caesalpinaceae) utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad » .Université de Bamako.neutrophils under flow conditions. *J. Immunol*, 158, 4879-4885.
- **Munshi SR, Shetye TA, Nair RK (1977).** Antifertility of three indigenous plant preparation. *Planta med* ;31: 73-75.
- **Musa A.E et Gasmelseed G.A (2012).** Characterization of *Lawsonia inermis* (Henna) as Vegetable Tanning Material. *Journal of forest products & Industries*, 1(2), 35-40.
- **O.M.S, 2002.- Organisation Mondiale de la santé (OMS) Rapport sur la médecine traditionnelle : Besoins et potentiel. N° p: 4. 6.**
- **Odile P (2008).** Le masque dans la société béninoise. *Revue Teheran* N°33.
- **Okamura H., Mimura A., Yakou Y., (1993).** Antioxydant activity of Tannins and flavonoid in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemical*, 33, 557-561.

Références bibliographiques

- **Oloyede O.I. (2005).** Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*. *Pakistan journal of nutrition*, 4 : 379-381.
- **Organisation Mondiale de la Santé (OMS), (2012).** Statistiques sanitaires mondiales, la piste dans le monde. *Organisation Mondiale de la Santé*.
- **Pacha H., Benazzouz. Y , BelkhirI. H (1998).** Effet cicatrisant de *Lawsonia inermis* dans les brûlures du 3ème degré. *Revue Med. Pharm. Afr.* Vol 11-12 pp151- 157.
- **Papageorgiou V. P. (1980).** Naturally occurring isohexenyl naphthazarin pigments : a new class of drugs. *Planta Medica*, 38:193–203.
- **Paris R. R et Moyse. , (1965).** Précis de matière médicale Edition Paris : Masson.
- **Patrick B., Jean L., and Michel S. (1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris. p: 100-108-274.
- **Philippe M., (2013).** Les familles des plantes à fleurs d'Europe: Botanique systématique et utilitaire. Presses universitaires de Namur.
- **Přemysl Mladěnka, Kateřina Macáková, Tomáš Filipský, Libuše Zatloukalová, Luděk Jahodář, Paolo Bovicelli, Ilaria Proietti Silvestri, Radomír Hrdina and Luciano Saso (2011).** In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry*: 105, 693–701.
- **Price M.L., Vanscoyoc S et Butler G. (1978).** Evaluation of vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *I- Agric. Food. Chem.*, 26: 1210-1218.
- **Rahmoun M.N., Benabdallah M., Villemin D., Boucherit K., Mostefa-Kara B., Ziani-Cherif C., Choukchou-Braham N., (2010).** Antimicrobial screening of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). *Scholars Research Library. Der Pharma Chemica*, 2010, 2(6): 320-326. review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 38(6), 421-64.
- **Richard C et Kiredjian M., (1995).** Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Brucella*, *Bordetella*. 2ème édition. Ed Institut. Pasteur .Paris. pp: 42-43.
- **Riffel, A., L.F. Medina, V. Stefani, R.C. Santos, D. Bizani and A. Brandelli, (2002).** In vitro antimicrobial activity of a new series of 1, 4-naphthoquinones. *Braz. J. Med Biol Res.*, 35: 811-18.
- **Sarita.G. Mohd.A. Sarwar.A. (1991).** Ethycholest 4 en 3 b ol from the roots of *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*, vol 31 n° 7 PP 2558-2560.
- **Sarmi M.P., et Cheymer V. (2006).** Les polyphénols en agroalimentaire. *Ed Lavoisier*. P 2 -10.

Références bibliographiques

- Schauenberg, P. Paris, F. (2013). Depuis l'Antiquité, les plantes médicinales sont le réservoir de la médecine populaire. **Delachaux et Niestlé**. Collection : **les guides du naturaliste**
- **Sharma Ankita et Sharma Kanika (2013)** Efficacy of *lawsonia inermis* linn. And eucalyptus citriodora hook. essential oils and their combination as antifungal and antiaflatoxin agent. International Journal of Biological and Pharmaceutical Research 130-143.
- **Siddiqui, B. S., Kardar, M. N., Ali, S. T. et Khan, S., (2003)**. Two new and a known compound from *Lawsonia inermis*. Helvetica Chimica Acta, 86(6), 2164–2169.
- **Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., and Peter W.J. (2004)**. Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press. Pp71-132.
- **Sylvie M. (2011)**. "Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae)". Thèse de doctorat. L'UFR des Sciences Pharmaceutiques et d'Ingénierie de la Santé d'ANGERS.
- **Tahrouch S, Audary C, Rapior S, Moudolot L, Gargadenneca and Fruchner A (2000)**. Polyphenol investigation of *Argania spinosa* (Sapotaceae) endemic tree from Morocco. *Acta Bot. Gallica*, 147(3), 225-232.
- **Trease.G.E et Evans.W.C (1989)** Pharmacognosy. 13^{ème} édition Ballière-Tindall. pp.436- 445.
- **Upson T. M., Grayer R. J., Greenham J. R., Williams C. A., Al-ghamdi F., et Chen F. (2000)**. Leaf flavonoids as systematic characters in the *Genera lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical systematic and ecology*, 28: 991-1007.
- **Wong.K.C- Teng Y.E (1995)** Volatile component of *Lawsonia inermis* L. Fowers. Jou- Essent – Oil- Res- vol 7 pp 425-428.
- **Yusuf, Y. (2006)**. Trends Food Sci. Tech. p17, 64-71.
- **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.

Annexes

Milieux de culture

- **Bouillon Nutritif (Fluka, BioChemika)**

Formule en g/L

Extrait de viande	3,0
Peptone	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 7,2 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 13g de la poudre dans un litre d'eau distillée, ensuite stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Gélose Nutritive (GN, Fluka, BioChemika)**

Formule en g/L

Extrait de viande de boeuf	1,0
Extrait de levure	2,0
Peptone	5,0
Chlorure de sodium	5,0
Agar	15,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH = 7,2 ($\pm 0,2$) à 37°C

Suspendre 28 g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Gélose Mueller Hinton (Fluka BioChemika)**

Formule en g/L

Infusion de viande de bœuf	4,0
Hydrolysate de caséine	17,5
Amidon	1,5
Agar	15,0
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 7,4 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 38g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Bouillon Mueller Hinton (Fluka BioChemika)**

Formule en g/L

Hydrolysate de caséine	17,5
Infusion de viande de bœuf	4,0
Amidon	1,5
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 7,4 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 23 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, ensuite stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Bouillon Sabouraud**

Formule en g/L

Peptone pepsique	10
Glucose	20
Eau Distillée	qsp 1L

pH= 5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 30 g de la poudre dans un litre d'eau distillée, chauffer si c'est nécessaire pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.

- **Gélose Sabouraud**

Formule en g/L

Peptone pepsique	10
Glucose	20
Agar	15
Eau Distillée	qsp 1L

pH=5,8 ($\pm 0,2$) à 37°C.

Suspendre 45 g de la poudre dans un litre d'eau distillée ensuite chauffer sous agitation jusqu'à ébullition pour la dissolution totale du milieu et stériliser par autoclavage à 121°C pendant 15 min.