

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



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 : Biochimie

Présenté par : - Melle BEKKOUR Chahrazed  
- Melle BEN ZAZOUH Ikram

---

**Evaluation de l'effet cytotoxique des différents extraits et  
huile des feuilles de *Lawsonia inermis*  
vis-à-vis des globules rouges humain.**

---

Soutenu le : 25/06/ 2019

Devant le jury composé de :

Présidente :	Mme Ilias .F	MCA au CUBBAT
Examinatrice :	Mme Benhabib .O	MAB au CUBBAT
Encadreur :	Mme Bentabet .N	MCB au CUBBAT

Année universitaire : 2018-2019

# Remerciements

*« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».*

قبل كل شيء الشكر لله الذي أمدنا بالإرادة و القوة لتحقيق هذا العمل المتواضع فالحمد و الشكر لله أولا و أخرا على عونه و فضله لإتمام هذا العمل

*En premier lieu, on tient à remercier très sincèrement notre encadreur Mme. BENTABET Nesrine, Maitre de conférences classe B au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, centre universitaire Belhadj Bouchaib d'avoir accepté de nous encadrer. Nous la remercions également pour sa confiance, sa disponibilité, son attention et son degré d'implication dans ce travail ainsi ses qualités humaines pour cela on tient à lui exprimer toute notre gratitude.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail, nous vous sommes très reconnaissantes et en espérant être à la hauteur de votre confiance.*

*A Mme Ilyes Maitre de conférence classe A au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, centre universitaire Belhadj Bouchaib, de nous avoir fait l'honneur de présider ce jury.*

*Nous exprimons également nos sincères remerciements à Mme Benhabib-Brixi O, Maitre assistante classe B au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, centre universitaire Belhadj Bouchaib, d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail ainsi à son aide durant notre pratique.*

*Nos profonds remerciements et notre profonde reconnaissance, aux ingénieurs et aux personnels du laboratoire pédagogique de biologie Mme. Meftahi chokria, M. Rahmani khaled et M. Mhamedi walid pour leur gentillesse et leur aide.*

*Nous sommes redevables à l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation durant ces 5 dernières années par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques.*

*On tient à exprimer notre reconnaissance envers nos parents et nos familles pour leurs contributions, leurs encouragements et leur patience.*

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

Très cordialement



## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents (Souad et Mohamed), sans votre affection, vos conseils, vos sacrifices, vos encouragements, vos prières et vos efforts que vous avez déployés durant toute ma vie, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Je vous présente ma pleine gratitude et mon profond respect, j'espère que Dieu vous donne la longue vie et la bonne santé, je vous aime énormément.*

*Mes deux chers frères (Djamel et Ayoub), j'espère que Dieu vous garde et vous montre le droit chemin.*

*Mes chers grands parents pour les prières qui m'ont accompagné tout au long de ma vie.*

*Mon cher fiancé (Ibrahim Rafik) pour sa disponibilité son soutien moral et surtout sa patience.*

*Je dédie aussi cette réalisation :*

*A toute ma famille ainsi qu'à ma belle famille (Belkadi)*

*A notre promotrice Mme. BENTABET Nesrine, qui a été toujours avec nous.*

*A mon binôme, Ben zazouh Ikram.*

*A toute la promotion de biochimie «2018/2019 ».*

*A tous ceux qui ont été à mes côtés de près ou de loin.*

*A tous ceux qui aiment la nature.*

***Bekkor Chahrazed***



## Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à :*

*Mes très chers parents (Kadda et Aicha), sans votre affection, vos conseils, vos sacrifices, vos encouragements, vos prières et vos efforts que vous avez déployés durant toute ma vie, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Je vous présente ma pleine gratitude et mon profond respect, j'espère que Dieu vous donne la longue vie et la bonne santé, je vous aime énormément.*

*Mon cher frère (Amine habib) et ma chère sœur (Sakina), j'espère que Dieu vous garde et vous montre le droit chemin.*

*A ma chère grande mère qui vient de nous quitter, tu me manqueras. Ton amour et tes appels illuminaient nos vies. J'aurai tant voulu que tu sois avec moi mais la mort a précédé, inchaallah rattrapé au paradis (je t'aime Mema).*

*Mes chers grands parents pour leurs prières qui m'ont accompagné tout au long de ma vie.*

*Je dédie aussi cette réalisation :*

*A toute ma famille des deux coté (Ben zazouh et Benameur).*

*A notre promotrice Mme. BENTABET Nesrine, qui a été toujours avec nous.*

*A mon binôme, Bekfour Chahrazed .*

*A toute la promotion de biochimie «2018/2019».*

*A tous ceux qui ont été à mes côtés de près ou de loin.*

*A tous ceux qui aiment la nature.*

**Ben zazouh ikram**

## **Résumé :**

*Lawsonia inermis* est une plante médicinale, appartenant à la famille des Lythracées appelée communément par la population locale « Henné ». Elle est largement répandue en Afrique, particulièrement en Maghreb, et très utilisée en cosmétologie ainsi qu'en pharmacologie pour traiter diverses pathologies.

Notre travail porte sur l'analyse phytochimique quantitative et l'évaluation de l'activité cytotoxique des extraits et de l'huile fixe des feuilles de *Lawsonia inermis* récoltée dans la wilaya d'Adrar. Les broyats ont été soumis à une extraction et fractionnement pour obtenir quatre extraits: l'extrait brut aqueux (EBA), l'extrait brut eau-méthanol (EBEM), fraction acétate d'éthyle des tanins (FAC) et la fraction n-butanol des tanins(Fnb), ainsi qu'une huile fixe obtenue par extraction au soxhlet.

Les résultats des rendements obtenus ont révélé la richesse de *Lawsonia inermis* en composants phytochimiques. Ce résultat est confirmé par le dosage des polyphénols totaux qui a démontré une teneur de 225 mg EAG/g, et par le dosage des flavonoïdes qui a présenté une teneur de 5.78mg EC/g.

Les tests d'hémolyse réalisée par la méthode spectrophotométrique ont montré que les extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* sont très faiblement toxiques pour les concentrations de 30, 45 et 60mg/mL. Par contre un effet hémolytique élevé est enregistré avec les huiles fixes de Henné comparée au tube de l'hémolyse total.

De façon générale, Henné est une substance reconnue comme peu ou pas toxique, surtout lors d'application cutanée. L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* nous ont permis d'avoir une idée sur les activités biologiques de *Lawsonia inermis*, mais d'autres études plus poussées sont souhaitables.

**Mots clés :** *Lawsonia inermis*, Extraits végétaux, Huile fixe, Métabolites secondaire, Effet hémolytique.

## *Abstract:*

*Lawsonia inermis* is a medicinal plant, belonging to the family of *Lythraceae* commonly called by the local population "Henna". It is widespread in Africa, particularly in the Maghreb, and widely used in cosmetology and pharmacology to treat various pathologies.

Our work focuses on the quantitative phytochemical analysis and evaluation of the cytotoxic activity of the extracts and the fixed oil of the leaves of *Lawsonia inermis* harvested in the wilaya of Adrar. The ground materials were subjected to extraction and fractionation to obtain four extracts: the aqueous crude extract (EBA), the crude water-methanol extract (EBEM), the ethyl acetate fraction of the tannins (FAC) and the fraction n- butanol tannins (Fnb), as well as a fixed oil obtained by extraction with soxhlet.

The results of the yields obtained revealed the richness of *Lawsonia inermis* in phytochemical components. This is confirmed by the total polyphenol assay, which has a content of 225 mg EAG / g, and by the flavonoid assay, which has a content of 5.78 mg EC / g.

Spectrophotometric haemolysis tests showed that leaf extracts of this plant are very slightly toxic at concentrations of 30, 45 and 60 mg / mL. On the other hand, a high haemolytic effect is recorded with fixed oils of Henna compared to the tube of total haemolysis.

In general, Henna is a substance recognized as having little or no toxicity, especially when applied to the skin. All the results obtained *in vitro* have allowed us to have an idea about the biological activities of *Lawsonia inermis*, but further studies are desirable.

**Key words:** *Lawsonia inermis*, Plant extracts, Fixed oil, Secondary metabolites, Hemolytic effect.

## ملخص:

لاوسونيا إنيرميس هو نبات طبي ، ينتمي إلى العائلة الخثرية التي يطلق عليها السكان المحليون " الحناء" . ينتشر على نطاق واسع في إفريقيا ، ولا سيما في المنطقة المغاربية ، ويستخدم على نطاق واسع في مستحضرات التجميل والصيدلة لعلاج الأمراض المختلفة.

يركز عملنا على التحليل الكيميائي النباتي الكمي وتقييم النشاط السام للخلايا في المستخلصات والزيت الثابت لأوراق لاوسونيا إنيرميس التي يتم حصادها في ولاية أدرار. تعرضت المواد الأرضية لاستخراج وتفتيت للحصول على أربعة مستخلصات: المستخلص الخام المائي (EBA) ، استخراج الخام للميثانول المائي (EBEM) ، جزء خلايا الإيثيل من العفص (FAC) ، جزء خلايا الإيثيل من العفص (FAC) ، وكذلك زيت ثابت تم الحصول عليه عن طريق استخراج سوكليت.

كشفت نتائج العلة التي تم الحصول عليها ثراء لاوسونيا إنيرميس في المكونات الكيميائية النباتية. يتم تأكيد هذه النتيجة من خلال تحديد البوليفينول الكلي الذي يحتوي على محتوى 225 ملغ معادل حمض الغاليك / جم ، وبجرعة الفلافونويد الذي يحتوي على 5.78 ملغ معادل الكاتشين / جم.

اختبارات انحلال الدم التي أجرتها طريقة الطيفية أظهرت أن مقتطفات أوراق لاوسونيا إنيرميس لها سمية ضعيفة لتركيزات 30 و 45 و 60 ملغ / مل. من ناحية أخرى ، يتم تسجيل تأثير الانحلال العالي بالزيوت الثابتة من الحناء مقارنةً بأنبوب انحلال الدم الكلي.

بشكل عام ، الحناء مادة معترف بها على أن لها سمية قليلة أو معدومة ، خاصة أثناء التطبيق الجلدي. سمحت لنا النتائج التي تم الحصول عليها في المختبر أن يكون لدينا فكرة عن الأنشطة البيولوجية للاوسونيا إنيرميس ، ولكن إجراء المزيد من الدراسات مرغوب فيه.

**الكلمات المفتاحية:** لاوسونيا إنيرميس ، المستخلصات النباتية ، الزيوت الثابتة ، المستقبلات الثانوية ، التأثير الانحلالي.

# Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	1
<b><u>Première partie</u> :Synthèse bibliographique</b> .....	4
<b><u>Chapitre 01</u> la phytothérapie et les plantes médicinales</b> .....	5
1.1. La phytothérapie .....	5
1.1.1. Définition .....	5
1.1.2. La pharmacopée .....	6
1.1.3. Etat des recherches en phytothérapie .....	6
1.2. Les plantes médicinales .....	7
1.2.1. Définition .....	7
1.2.2. Parties utilisées.....	8
1.2.3. Les formes phytogaléniques générales.....	8
1.2.4. Les modes d'utilisation .....	9
a- Usage interne .....	9
b- Usage externe .....	9
c- Au niveau des muqueuses .....	10
1.2.5. Posologies .....	10
<b><u>Chapitre 02</u> Etude de la toxicité des plantes</b> .....	12
2.1. Plantes toxiques et phytothérapie .....	12
2.2. Causes de toxicité des plantes.....	12
2.3. Etude de la toxicité des plantes:.....	13
2.3.1. Etude <i>in vivo</i> .....	15
2.3.2. Etude <i>in vitro</i> .....	15
2.4. L'hémolyse .....	16
2.4.1. L'hémolyse intratissulaire .....	16
2.4.2. L'hémolyse intravasculaire .....	16
2.4.3. L'hémolyse pathologique .....	17
<b><u>Chapitre 03</u> Monographie de la plante étudiée</b> .....	18
3.1. Etude systématique .....	18
3.2. Etude botanique .....	18
3.2.1. Description.....	18
3.2.2. Utilisation traditionnelle de Henné.....	20



3.3. Aire de répartition de l'espèce <i>Lawsonia inermis</i> .....	20
3.4. Activité pharmacologiques et effets thérapeutiques de <i>Lawsonia inermis</i> .....	20
3.5. Etude chimique de l'espèce <i>Lawsonia inermis</i> .....	22
3.6. Toxicité de la plante.....	23
<b><u>Deuxième partie : Matériel et méthodes</u></b> .....	25
1. Matériel végétal .....	26
2. Matériel biologique.....	26
2.1. Globules rouges humains .....	26
<b>3. Méthodes</b> .....	26
3.1. Préparation des différents extraits et l'huile de <i>Lawsonia inermis</i> : .....	26
3.1.1. Extrait brut aqueux .....	26
3.1.2. Extrait brut eau/Méthanol .....	26
3.1.3. Extrait des tannins .....	27
3.1.4. Extraction des huiles fixes par soxhlet.....	27
3.1.5. Le rendement des extraits secs .....	28
3.2. Dosage des polyphenols et des flavonoïdes totaux : .....	28
3.2.1. Préparation de l'extrait pour les dosages.....	28
3.2.2. Dosage des polyphenols totaux.....	29
3.2.3. Dosage des flavonoïdes totaux.....	30
3.3. Evaluation de l'activité hémolytique des extraits des plantes étudiées vis-à-vis des globules rouges humains.....	30
3.3.1. Préparation du phosphate buffered saline (PBS) .....	30
3.3.2. Préparation de la suspension érythrocytaire .....	30
3.3.3. Préparation des extraits .....	31
3.3.4. Test d'effet hémolytique .....	31
<b><u>Troisième partie : Résultats et discussion</u></b> .....	33
1. Rendement en extraits secs .....	34
2. Rendements en huile fixe .....	36
3. Analyse phytochimique quantitative .....	37
3.1. Teneur en polyphenols totaux .....	37
3.2. Teneur en flavonoïdes .....	38
4. Analyse biologique .....	40
4.1. Evaluation de l'effet hémolytique des extraits de la plante étudiée :.....	40
4.2. L'effet hémolytique de l'huile fixe de <i>Lawsonia inermis</i> : .....	46

<b>Conclusion générale</b> .....	48
<b>Référence bibliographiques</b> .....	50
<b>Annexes</b> .....	61

## Liste des figures

<b><u>Figure N°01 :</u></b>	Description botanique de <i>Lawsonia inermis</i> .....	19
<b><u>Figure N°02 :</u></b>	La lawsone retrouvée dans <i>Lawsonia inermis</i> .....	22
<b><u>Figure N°03 :</u></b>	Rendements des extraits des feuilles de la plante <i>Lawsonia inermis</i> ....	35
<b><u>Figure N°04 :</u></b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	37
<b><u>Figure N°05 :</u></b>	Courbe d'étalonnage de la catéchine.....	39
<b><u>Figure N°06 :</u></b>	Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits bruts de la plante de Henné.....	39
<b><u>Figure N°07 :</u></b>	Evolution de l'absorbance dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations des extraits des feuilles de <i>Lawsonia inermis</i> , incubé à 37 °C durant 60 min, à 548nm.....	41
<b><u>Figure N°08 :</u></b>	Evolution du taux d'hémolyse (%) en fonction du temps en présence des différentes concentrations d'extraits de <i>Lawsonia inermis</i> .....	43
<b><u>Figure N°09:</u></b>	Evolution de l'absorbance dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations de l'huile fixe des feuilles de <i>Lawsonia inermis</i> , incubée à 37 °C durant 60 min, à 548nm.....	46
<b><u>Figure N°10:</u></b>	Evolution du taux d'hémolyse (%) en fonction du temps en présence des différentes concentrations de l'huile fixe de <i>Lawsonia inermis</i> .....	46

## Liste des tableaux

<b><u>Tableau N°01 :</u></b>	Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique.....	14
<b><u>Tableau N°02:</u></b>	Caractéristiques physiques et teneur en composés extractibles ou rendement d'extraction des feuilles de <i>Lawsonia inermis</i> .....	34
<b><u>Tableau N°03 :</u></b>	Teneur en polyphénols totaux (TPT) dans les différents extraits des feuilles de <i>Lawsonia inermis</i> L.....	37

## Liste des abréviations

<b>CAP</b>	: Centre Anti Poison
<b>DL50</b>	: Dose Létale 50%
<b>DL100</b>	: Dose Létale 100%
<b>DMT</b>	: Dose Maximale Tolérée
<b>Hgb</b>	: Hémoglobine
<b>IgE</b>	: Les immunoglobulines E
<b>PPD</b>	: Paraphénylendiamine
<b>G6PD</b>	: Le déficit en <i>glucose-6-phosphate déshydrogénase</i>
<b>V/V</b>	: Rapport volume par volume
<b>TPT</b>	: Teneurs en polyphénols totaux
<b>nm</b>	: Nanomètre
<b>D.O</b>	: Densité optique
<b>mg EAG/g</b>	: mg équivalent acide gallique par gramme de matière sèche.
<b>mg EC/g</b>	: mg équivalent catéchine par gramme de matière sèche.
<b>EBA</b>	: Extrait brut aqueux
<b>EBEM</b>	: Extrait brut eau-méthanol
<b>F<sub>AC</sub></b>	: Fraction acétate d'éthyle
<b>F<sub>nb</sub></b>	: Fraction n-butanol
<b>MVS</b>	: Matière végétale sèche.
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline. (Le tampon phosphate salin).
<b>HT</b>	: Hémolyse totale
<b>GRH</b>	: Globules rouges hémolysés
<b>RBC</b>	: Les Red Blood Cell ( <i>globules rouges</i> ).
<b>CCM</b>	: La Chromatographie sur une couche mince
<b>HPLC</b>	: La chromatographie en phase liquide à haute performance
<b>NaCl</b>	: Le chlorure de sodium
<b>Kcl</b>	: Le chlorure de potassium
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	: Dihydrogénophosphate de potassium

---

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

---

Il est bien admis que la vie humaine sur terre est étroitement liée à l'exploitation des plantes qui ont la capacité de produire des substances naturelles très diversifiées. A l'heure actuelle, les plantes médicinales restent encore le premier réservoir de nouveaux médicaments. Grace aux molécules bio-puissantes qu'elles contiennent. Ces molécules résultant de métabolites secondaires produits à partir de métabolisme des nutriments, sont très utilisées par l'homme dans les domaines médicaux, pharmacologiques, cosmétiques et alimentaires (**Chakou et Medjoudja, 2013**)

Les analyses phytochimiques sur les extraits des végétaux est une étape préliminaire et d'une grande importance, puisqu'elle révèle la présence des constituants connus par leurs activités physiologiques et possédant des vertus médicinales. Les recherches effectuées sur les différents extraits consistent à détecter et à doser certains principes actifs existants dans la plante (**Selles, 2012**).

En Algérie, les plantes médicinales n'ont jamais été totalement abandonnées et les gens n'ont jamais cessé de faire appel à la médecine traditionnelle, ce qui conduit à maintenir une tradition thérapeutique vivante malgré le développement spectaculaire de la médecine moderne. Des enquêtes ethnobotanique récentes effectuées dans le but de répertorier les plantes médicinales utilisées par la population dans l'Est et l'Ouest Algérien ont été réalisées [(**Azzi et al., 2012**) ; (**Allali et al., 2008**) ; (**Hamza, 2011**)]. Ils soulignent l'importance qu'occupe ce patrimoine végétal dans la pharmacopée traditionnelle et surtout dans le traitement de différentes maladies chroniques.

La phytothérapie utilise des produits biologiques ayant des propriétés pharmacodynamiques bien précises et pouvant induire des incidents toxiques très importants. Pour cela l'évaluation des activités biologiques des extraits naturels, nécessite une étude de leur activité hémolytique (**Elalaoui, 2015**).

Dans ce contexte s'inscrit le présent travail dont l'objectif essentiel consiste à réaliser une étude phytochimique et à évaluer l'effet hémolytique (cyto-toxicité) des extraits et de l'huile fixe des feuilles de *Lawsonia inermis* (*Lythraceae*) afin de valoriser *in vitro* les ressources de cette espèce. Le choix de cette plante est justifié, en partie, par son utilisation abondante en Algérie comme teinture cutanée (agent cosmétique) et par ses multiples usages comme astringente, antiseptique, antifongique, cicatrisante des plaies et des blessures et contre l'eczéma,

Les mycoses ; Tandis que ses propriétés toxicologiques restent encore peu étudiées [(Malekzadeh., 1968) ; (Sharma, 2013) ; (Gupta et *al.*, 1992)].

Notre étude est divisée donc en trois parties :

- La première partie propose une mise au point bibliographique concernant les plantes médicinales et leurs activités biologiques suivies par une description botanique, classification systématique et l'utilisation traditionnelle de Henné, et finalement quelques notions sur l'hémolyse.
- La seconde comporte la partie expérimentale ou nous avons réalisé : l'extraction des extraits et de l'huile fixe, ainsi que le dosage des polyphénols et des flavonoïdes. Nous avons aussi évalué l'effet hémolytique de cette plante médicinale vis-à-vis des globules rouges.
- La troisième partie présentera les résultats obtenus qui seront suivis d'une discussion et d'une conclusion générale



---

# **SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

**Généralités :**

Depuis les temps les plus anciens, les grandes civilisations ont eu recours aux plantes médicinales pour leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et industrielles (**Lahsissene et al., 2009**). Aujourd'hui, ce savoir faire traditionnel constitue d'une part un trésor d'informations pour ceux et celles qui préfèrent les usages populaires pour aborder leurs maux quotidiens et d'autre part une ressource inestimable pour l'industrie pharmaceutique (**Benlamdini et al., 2014**)

L'utilisation de la médecine traditionnelle dans la plupart des pays en développement comme base normative pour le maintien d'une bonne santé a été largement observée. De plus, dans les sociétés actuelles, les remèdes à base de plantes sont devenus plus populaires dans le traitement des affections mineures, en raison des coûts croissants de la maintenance de la santé des personnes (**Uma et al., 2010**). L'intérêt des plantes médicinales connaît depuis une vingtaine d'années un essor significatif. Un grand nombre d'espèces sont couramment consommées sous forme de tisanes, d'extraits divers, de compléments alimentaires ou sous forme de préparations cosmétiques et leur utilisation moderne reste purement chimique sous forme de principe actif.

**1.1 La phytothérapie****1.1.1 Définition**

La phytothérapie peut se définir comme étant une discipline allopathique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes ou de préparations à base de plantes (**Chabrier, 2010**).

Les plantes médicinales renferment de nombreuses molécules actives qui ont des activités thérapeutiques complémentaires ou synergiques. Ces molécules sont étudiées et reproduites chimiquement pour être incorporés de nos jours dans de nombreux médicaments.

On peut la distinguer en trois (3) types de pratiques (**Clément, 2005**):

- Une pratique traditionnelle, parfois très ancienne basée sur l'utilisation des plantes selon les vertus découvertes empiriquement.
- Une pratique basée sur les avancées et les preuves scientifiques, qui recherchent des principes actifs extraits des plantes.
- Une pratique de prophylaxie, déjà utilisée dans l'antiquité. Nous sommes tous phytothérapeutes sans le savoir : c'est notamment le cas dans la cuisine, avec l'usage d'Ail, du

Thym, du Gingembre ou simplement du Thé vert. Une alimentation équilibrée et contenant certains éléments actifs étant une phytothérapie prophylactique.

### 1.1.3 La pharmacopée

La phytothérapie est présente dans tous les pays du globe. Elle est toujours très développée en Chine et en Inde où les traitements font encore majoritairement appel aux plantes. La pharmacopée est un recueil officiel et réglementaire des matières premières à usage thérapeutique et des médicaments autorisés dans un pays ou dans un ensemble de pays. Elle contient les normes officielles relatives au contrôle de qualité des processus de développement, de production et de commercialisation. C'est une base aussi bien juridique que scientifique (Ansm, 2014)

Les plantes médicinales sont inscrites à la pharmacopée à double titre : en tant que matières premières pour la fabrication de médicaments et en tant que substances à activité thérapeutique propre. Les progrès en matière de pharmacologie et de développement de la pharmacognosie ont permis de confirmer ou de réfuter les usages ancestraux.

La pharmacopée est l'ouvrage de référence pour l'exploitation des plantes médicinales. En phytothérapie, les produits sont commercialisés sous formes de plantes entières ou divisées, sous de nombreuses formes galéniques (à l'état de gélules, de comprimés, d'ampoules, de crèmes, ...) et appartiennent à des catégories variées en termes de statut juridique.

### 1.1.4 Etat des recherches en phytothérapie

Presque tous les pays du monde sont intéressés par l'étude des plantes médicinales selon le principe que le règne végétal constitue une source importante et indispensable de médicaments (Urombi, 2001). De nos jours encore, en Afrique comme partout ailleurs dans le monde, les plantes retrouvent une place de choix dans la thérapeutique après la vague des médicaments minéraux et d'antibiothérapie (Bulemfu, 1994).

Les travaux scientifiques reconnaissent la valeur thérapeutique des plantes médicinales. L'action curative des plantes médicinales est due principalement aux différents groupes phytochimiques bioactifs qui sont : les tanins, les saponines, les quinones, les flavonoïdes, les terpènes, les stérols et les alcaloïdes. Ces dernières substances forment le groupe les plus importants dus à leurs multiples activités physiologiques (Bulemfu, 1994). Ils constituent avec les antibiotiques les plus importants groupes des substances naturelles d'intérêt thérapeutique.

L'écueil principal rencontré dans les études phyto-thérapeutiques est le manque de standardisation entre les études d'efficacité réalisées *in vitro* et *in vivo*, chez l'homme comme chez l'animal. En phytothérapie, ce manque de standardisation concerne : les systèmes sur lesquels un extrait végétal est testé, la teneur précise de cet extrait végétal, sa provenance et sa fraîcheur. Ces éléments constituent autant de variations empêchant les études d'être complètement reproductibles et surtout comparables entre elles (Wyllie 2006).

En plus, ces 15 dernières années ont montré que la phytothérapie n'est pas sans risque. Les atteintes toxiques concernent la plupart des organes. On peut citer notamment l'insuffisance rénale liée aux plantes chinoises, les atteintes cardiaques par intoxication à l'aconit ou des atteintes pulmonaires liées à certaines menthes [(Larrey, 1997) ; (Peyrin-Biroulet et al., 2004)], mais ce sont certainement les atteintes hépatiques qui sont les plus marquantes (Larrey, 1997). La connaissance parfaite des constituants d'une plante et de leurs particularités est donc particulièrement nécessaire, comme pour tout médicament (Wyllie, 2006).

En effet, certaines propriétés pharmacologiques et médicinales d'une plante ne sont pas liées à un seul ou quelques substances mais parfois à plusieurs centaines de molécules qui agissent en synergie et qui sont à l'origine des effets sur lesquels repose l'usage traditionnel de la plante. Cette association complexe de molécules confère à la plante des propriétés médicinales parfois différentes de celles obtenues par seulement certains de ses composants issus d'une extraction sélective. Ces associations pourraient par ailleurs constituer une nouvelle génération de médicaments d'origine végétale. Cette pratique conduit donc aux phytomédicaments et selon la réglementation en vigueur dans le pays, la circulation de ces derniers est soumise à l'autorisation de mise sur le marché. On parle alors de pharmacognosie ou de biologie pharmaceutique.

## **I.2. Les plantes médicinales**

### **I.2.1. Définition**

Dans le code de la santé publique, il n'existe pas de définition légale d'une plante médicinale au sens juridique, mais en France « une plante » est dite médicinale lorsqu'elle est inscrite à la pharmacopée et que son usage est exclusivement médicinal. Il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux (Farnsworth et al., 1986). Ces plantes sont présentées pour leurs propriétés préventives ou curatives à l'égard des maladies humaines ou animales (Chabrier ,2010).

Leur action provient de leurs composés chimiques (métabolites primaires ou secondaires) ou de la synergie entre les différents composés présents (**Sanago, 2006**). Les plantes médicinales constituent un patrimoine précieux pour l'humanité ; elles sont des usines chimiques naturelles, produisant des substances actives biochimiques telles que : les alcaloïdes, les huiles essentielles, les flavonoïdes, les tanins... et les mettent à la disposition de l'homme qui peut en faire usage pour sa santé et satisfaire ses besoins vitaux (**Schauenberg et al., 1997**).

### **I.1.3.1 Parties utilisées**

Les différentes parties de la plante sont inégalement pourvues en molécules actives. Celles qu'on utilise sont dites : drogues végétales. Ces molécules présentent un intérêt thérapeutique curatif ou préventif pour l'homme ou l'animal. Elles sont issues de plantes fraîches ou séchées. Les principes actifs peuvent être situés dans différentes parties des plantes médicinales comme : les feuilles, les fleurs, les racines, les écorces, les fruits, les graines, ou les rhizomes. Dans la zone d'étude, les feuilles restent la partie la plus utilisée des plantes médicinales avec un taux de 46.30 %, suivies par les fruits et les graines avec un même pourcentage de 26.17 %, puis viennent les fleurs avec un taux d'utilisation de 21.13%. La fréquence d'utilisation élevée des feuilles peut être expliquée par l'aisance et la rapidité de la récolte (**Bitsindou, 1986**).

Ses différentes parties des plantes peuvent avoir des propriétés thérapeutiques distinctes. C'est le cas du Sureau dont la fleur est diurétique et le fruit possède une activité contre le rhume. Chez l'Ortie, la partie aérienne calme les douleurs rhumatismales et la racine soulage les problèmes de miction liés à l'hypertrophie bénigne de la prostate (**Sebai et Boudali, 2012**).

### **1.2.2. Les formes phytogaléniques générales**

Pendant longtemps, les plantes ont été utilisées uniquement en nature, sous forme de tisanes ou de poudres (**Bézanger-Beauquesne et al., 1986**). Maintenant, beaucoup sont présentées en gélules, mais il existe de nombreuses formes d'utilisations des plantes médicinales.

Parmi les différentes formes existantes, le principe actif peut se présenter sous différents aspects. Il est utilisé initialement sous forme de poudre, d'extrait ou de teinture et constitue ce que l'on appelle une forme galénique qui désigne une forme individuelle sous laquelle sont mis les principes actifs et les excipients (matières inactives). Elle correspond à l'aspect physique final du produit tel qu'il sera utilisé.

La matière première se présente sous trois formes potentielles :

- ✓ **les plantes fraîches** : elles servent de base à la préparation des teintures mères, qui permettent à leurs tours l'élaboration de médicaments homéopathiques.
- ✓ **les plantes sèches** : elles constituent la base des teintures officinales, des nébulisas, des extraits mais aussi des poudres.
- ✓ **les plantes stabilisées** : le potentiel enzymatique de la plante est détruit par l'action de l'alcool ou de la chaleur, permettant la conservation des constituants dans leur état original.

Les formes galéniques ont pour but de faciliter l'administration de l'ensemble des principes actifs des plantes médicinales. On préfère recourir moins fréquemment aux préparations alcoolisées et aux extraits classiques peu maniables dont les principes actifs sont parfois altérés. Maintenant de nombreuses formes plus pratiques existent. Seuls ou associés, ces extraits secs sont présentés en comprimés dragéifiés, et surtout en gélules parfois confondues avec les gélules de plantes en poudre sur lesquelles elles présentent l'avantage d'une plus grande concentration en principes actifs (**Chabrier, 2010**).

### 1.2.3 Les modes d'utilisation

#### a- Usage interne

Par injection qui nécessite une préparation stérile dans ce cas ou par voie orale sous forme de : (**Fort, 1976**).

- **Tisane** : qui est une boisson obtenue par macération, décoction ou infusion du matériel végétale (fleurs fraîches ou séchées, feuilles, tiges, racines), dans l'eau chaude ou froide (**Fort, 1976**).
- **Fumigation** : qui est très utile lors des laryngites pour humidifier les muqueuses. Elle apporte un bien-être immédiat et une résolution plus rapide de la pathologie. On fait bouillir ou brûler des plantes, de façon à bénéficier des vapeurs ou fumées produites. Ces vapeurs des plantes aromatiques ont un grand pouvoir désinfectant (**Jocelyne, 2011**).

**b- Usage externe**

Elle est appliquée sur l'épiderme (solution, crèmes, pâtes, poudre, compresses, savons) ou elle est introduite dans les orifices corporels (nez, oreille, cavité buccale, sac lacrymal, anus, tube urinaire) (Fort, 1976).

- **Cataplasmes :** C'est une préparation de la plante sous forme assez pâteuse et qui est appliquée sur la peau. La plante peut être broyée, hachée à chaud ou à froid ou mélangée à de la farine de lin pour obtenir la bonne consistance. Le cataplasme calme les douleurs musculaires et les névralgies, soulage les entorses et les fractures et permet d'extraire le pus des plaies infectées (Fort, 1976).
- **Lotions et compresses :** Les lotions sont des préparations à base d'eau et de plantes dont on tamponne l'épiderme aux endroits irrités ou enflammés. Les compresses contribuent à soulager les gonflements, les contusions et les douleurs, à calmer les inflammations et les maux de tête (Ghedabnia, 2008)

**c- Au niveau des muqueuses :**

- **Gargarisme :** La médication constituée d'un infusé ou d'un décocté aussi chaud que possible est utilisée pour rincer l'arrière-bouche, la gorge, le pharynx, les amygdales et les muqueuses. Il sert à désinfecter ou à calmer. Le gargarisme ne doit jamais être avalé (Strang, 2006).
- **Bain de bouche :** C'est l'infusion, le décocté ou le macéra qui sont utilisés dans les infections buccales tels que les aphtes (Strang, 2006).
- **Bain des yeux :** se pratique à l'aide d'une œillère remplie d'une infusé ou d'un décocté; il est indispensable de filtrer la solution avant usage (Strang, 2006).

**1.2.4 Posologies**

La posologie et la durée de la prise des remèdes est variable, mais généralement elle n'excède pas quelques jours et se révèle être le plus souvent de l'ordre d'une journée. Certains remèdes sont cependant à prendre selon l'état de santé du malade. De plus, les remèdes comme les infusions notamment, sont à prendre soit tout au long de la journée, soit trois fois par jour. Mais comme pour la durée de la prise, la posologie se révèle être variable selon les remèdes. Concernant les gélules et les capsules, les posologies sont données en nombre de gélules ou de capsules par jour selon l'intensité des symptômes.

Il est aussi très important de respecter la posologie recommandée. Certaines plantes médicinales peuvent être ingérées plusieurs fois par jour sans effets secondaires tandis que pour d'autres l'effet combiné de plusieurs prises en peu de temps peut présenter des dangers. Enfin, les consommateurs croient souvent que le naturel est le synonyme d'inoffensif. Or une plante peut à la fois être utile et toxique. C'est une question de dose : "Potion et poison ont la même racine latine" (Mohamed, 2008).

### 1.2.5. Utilisations thérapeutiques

L'utilisation des plantes, à des fins thérapeutiques, est rapportée dans les littératures antiques arabe, chinoise, égyptienne, hindou, grecque et romaine. En Afrique, le pouvoir thérapeutique des plantes était connu par nos ancêtres et nos parents de façon empirique (Koffi et al., 2009). La plupart des espèces végétales qui poussent dans le monde entier possèdent des vertus thérapeutiques, car elles contiennent des principes actifs qui agissent directement sur l'organisme.

Le ou les principes actifs d'une plante médicinale lui confèrent des activités thérapeutiques (Sebai et Boudali, 2012.). De plus en plus d'études indiquent que les polyphénols présents dans la plante pourraient diminuer le risque de survenue d'un certain nombre de pathologies, en particulier celles liées au vieillissement et aux lésions oxydatives (cancers, maladies cardiovasculaires ou neurodégénératives) (Hennebelle et al., 2004)

En phytothérapie, même si certaines indications sont communes à plusieurs classes, chaque classe chimique semble être utilisée pour des bénéfices spécifiques tels que : les flavonoïdes provenant du ginkgo (*Ginkgo biloba L.*), participent à la lutte contre la sénescence cérébrale et ses conséquences (altération de la mémoire, confusion) ; Les tanins sont dotés d'un certain pouvoir astringent, par lequel on explique leurs propriétés vasculoprotectrices (*ratanhia* du Pérou), cicatrisantes (*Hamamelis virginiana L.*) et antidiarrhéiques (chêne, *Quercus spp.*) ; Les coumarines sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices (*Melilotus officinalis L.*), neurosédatives (*Galium odoratum L.*) ou diurétiques (*Hieracium pilosella L.*) (Hennebelle et al., 2004).



## 2.1. Plantes toxiques et phytothérapie

La phytothérapie est souvent présentée comme une médecine naturelle. Toutefois, la phytothérapie n'a pas que des effets bénéfiques. Comme tout produit actif, elle peut avoir des effets indésirables, toxiques et allergiques.

En effet, la toxicologie est l'étude des substances toxiques et plus précisément, l'identification et l'évaluation quantitative des conséquences néfastes liées à l'exposition à des agents physiques, chimiques ou de toute autre nature. Comme telle, elle fait appel, tant pour ses connaissances que pour sa démarche de recherche ou ses méthodes, à la plupart des sciences biologiques fondamentales, aux disciplines médicales, à l'épidémiologie et à divers domaines de la chimie et de la physique (Silbergeld, 2000).

Une plante est considérée toxique lorsqu'elle contient une ou plusieurs substances nuisibles pour l'homme ou pour les animaux et dont l'utilisation provoque des troubles variés plus ou moins graves voire mortels (Fournier, 2001). Les plantes sont à l'origine de 5% des intoxications signalées au CAP (Centre Anti Poison) de Strasbourg et 3,2% des intoxications selon l'Association Américaine des Centres Anti Poison [(Patrick, 2003) ; (Flesch, 2005)]. Parmi l'ensemble des plantes réputées toxiques, certaines présentent un danger réel en cas d'ingestion alors que d'autres ne provoquent que des troubles mineurs, principalement digestifs. Tous les organes de la plante contiennent des principes toxiques, mais surtout les racines et les graines, renferment des alcaloïdes diterpéniques dont le principal est l'aconitine qui a une toxicité principalement neurologique et cardiaque (Flesch, 2005).

## 2.2. Causes de toxicité des plantes

Les plantes médicinales sont des mélanges complexes de molécules diverses. Leur composition, souvent mal définie, est formée de molécules pourvues d'une activité biologique notoire, entre autres des hétérosides, des alcaloïdes, des anthocyanes, des tannins et des stéroïdes. Comme toutes les molécules bioactives, ces constituants peuvent, à un certain degré de concentration, présenter une toxicité intrinsèque. L'exemple des saponosides (ou saponines) présents dans les extraits d'écorces de tiges et de racines de *Mitragyna inermis* qui possèdent d'une part, des propriétés physiques caractérisées par un pouvoir aphrogène ou pouvoir moussant (indice de mousse), d'autre part par des propriétés physiologiques s'exprimant par un indice hémolytique. Ces composés chimiques pouvant conférer à la plante des propriétés toxiques à fortes doses ou par voie générale, il apparaît indispensable de procéder à la détermination de leur pouvoir hémolytique pour une adaptation rationnelle à la tradithérapie, surtout pour les modes

d'administration et les précautions à observer en cas de non intégrité au niveau des muqueuses digestives (bouche, estomac, intestin, etc.) (**Ouedraogo et al., 2001**).

Classiquement, en présence d'une substance inconnue la première étape dans la recherche d'une activité pharmacologique débute par l'étude de la toxicité et en particulier par l'évaluation de la dose létale 50 (**DL50**) (**Rolland, 1988**). Cette technique, apporte néanmoins des renseignements de qualité :

- Elle détermine en premier lieu la toxicité de la substance ainsi que la marge thérapeutique, c'est-à-dire le rapport entre la dose active et la dose toxique pour l'espèce animale testée ; c'est une étape indispensable à l'utilisation de toutes substances à des fins thérapeutiques.
- L'observation des premiers symptômes de la toxicité des organes cibles, c'est-à-dire ceux qui sont préférentiellement atteints par la toxine ; la toxicité est d'ailleurs un excellent critère d'orientation de la recherche d'activité pharmacologique (**Rolland, 1988**).

### 2.3. Etude de la toxicité des plantes :

La toxicité se définit comme l'ensemble des effets néfastes qui peuvent être des lésions morphologiques et fonctionnelles dans un organisme vivant, provoquées par une substance introduite à dose unique relativement élevée ou à des petites doses longtemps répétées (**Etame et al., 2017**). La toxicité d'une substance au niveau de l'organisme dépend aussi de la nature de la substance, et de la durée d'exposition, des différents facteurs liés à l'individu (sexe, âge, état nutritionnel et hormonal), des facteurs environnementaux et de l'exposition simultanée ou antérieure à d'autres produits chimiques. Les facteurs propres à chaque individu peuvent modifier l'absorption, la distribution, l'excrétion, les transformations métaboliques et la sensibilité du récepteur dans l'organe cible (**Tron et al., 2002**).

L'étude de la toxicité d'une substance est l'ensemble des essais pharmacologiques, qui déterminent le degré ou le caractère nocif de cette dernière afin de réglementer son utilisation (**Tableau N°01**) (**Etame et al., 2017**).

**Tableau N°01** : Quelques exemples de plantes médicinales douées d'activité anti-hémolytique

Matrice végétale	Tests utilisés	Effets	Références
Fleur de <i>Albutinus indicum</i>	Hémolyse induite par Na Cl	Activité Anti-hémolytique :70,24% à 1mg/mL d'extrait	<b>Shobana et Vidhya, 2016</b>
Feuilles, tige, fleur de <i>Gymnemas ylvestre</i>	Hémolyse induite par le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Activité anti hémolytique : IC50=29,83 g/mL	<b>(James et Alewo 2014)</b>
Fleur de <i>Cassia auriculata</i>	Hémolyse induite par le Na Cl	Activité Anti-hémolytique :64% à 500µg/mL d'extrait	<b>(Rani et al., 2014)</b>
Extrait de <i>Annona muricata</i>	Hémolyse par TritonX100	Activité Anti-hémolytique :85,7% à500 µg/mL d'extrait	<b>(Muthu et Duraira, 2015)</b>
Extraits de <i>Oryza sativa</i>	Hémolyse induite par le Na Cl	Effet Anti-hémolytique :63,77% à 500µg/mL	<b>(Rahman, Eswaraiah et al., 2015)</b>
Fruit de <i>Persea americana</i>	Hémolyse induite par le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Effet anti-hémolytique IC50=0,0422mg/mL	<b>( Nabavi et al., 2013)</b>
Feuilles de <i>Piber betel</i>	Hémolyse induite par le H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Activité Anti-hémolytique : 40.6% pour une concentration de 5mg/mL	<b>(Chakraborty et Shah , 2011)</b>

Les effets toxiques peuvent être classés de diverses façons selon :

- **La durée** : aigue, chronique
- **Le type d'action** : locale, systémique
- **Le mécanisme d'action** : stimulant, inhibiteur
- **La voie de pénétration** : respiratoire, cutanée, digestive
- **Le tissu ou l'organe affecté** : sang (hématotoxique), foie (hépatotoxique), rein (néphrotoxique), le système nerveux (neurotoxique)

- **La nature de l'effet** : irritant, sensibilisant, asphyxiant, cancérigène
- **L'utilisation** : pesticides, savons, solvants, (Ababsa, 2009)

Selon la durée, la fréquence et la quantité de produits toxiques auxquelles un individu est exposé, on observe plusieurs types de toxicités (Alain, 2002). L'homme est constamment exposé à une toxicité soit aiguë soit subaiguë ou encore chronique (Bismuth et al., 1987).

### 2.3.1. : Etude *In vivo* :

Cette étude s'adresse à un animal entier vivant, particulièrement adaptée pour la mise en évidence d'un effet global. L'inconvénient majeur de ces techniques est l'utilisation d'un grand nombre d'animaux vivants qui ne servent que pour une seule expérimentation. Pour cela, chaque extrait est expérimenté à plusieurs doses et chaque dose représente un lot de 10 à 20 animaux. De plus, il est nécessaire d'y adjoindre un lot témoin recevant un produit de référence (Rolland, 1988).

L'étude de la toxicité est évaluée dans le but de déterminer les paramètres toxicologiques qui sont la dose létale qui tue 50 % des animaux d'expérience (DL50) ainsi que la dose létale 100 % (DL100) et la dose maximale tolérée (DMT) qui représente la dose maximale qui ne tue aucun animal lorsque l'extrait est administré. C'est l'étude qualitative et quantitative des phénomènes toxiques qu'il est possible de rencontrer après administration unique de la ou des substances actives contenus dans le médicament. Cette étude décrit les symptômes observés et fournit pour autant que cela soit possible l'indication de la dose létale 50 (DL50) (Ruckebusch, 1981). Cette dose sert souvent de point de départ des études de toxicité, car elle fournit un minimum de connaissances (CSST, 2004).

### 2.2.2. Etude *in vitro* :

Cette étude appelée aussi de substitution, qui représente un premier avantage, celui de diminuer fortement la consommation d'animaux vivants mais posent un problème de fond qui est la confrontation entre un mélange complexe. D'autre part la réponse biologique diffère d'une cellule artificiellement isolée de son environnement normal par rapport à une cellule au sein d'un organe dans lequel elle maintient des interactions constantes avec les cellules voisines ou avec tout l'organisme (Rolland, 1988).

## 2.4. L'hémolyse

L'hémolyse est un phénomène physiologique irréversible due à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouges après une durée de vie de 120 jours qui est un laps de temps normal (Thomas, 2013).

### 2.4.1. L'hémolyse intratissulaire :

Chez l'homme, la durée de vie des globules rouges est limitée à 120 jours et les érythrocytes sénescents circulants sont phagocytés par les macrophages de la rate, de la moelle osseuse et du foie (cellules de Küpffer). La pulpe rouge de la rate semble être le site le plus actif dans la dégradation des globules rouges (Beamount 2005). Chez le sujet normal, la majorité des globules rouges sont détruites dans les macrophages de la moelle osseuse (minimum 50%).

Le reste de l'hémolyse se répartit dans l'organisme, en particulier dans la rate et le foie. (Aguilar et Martinez, 2007).

Cette phagocytose portée sur les globules rouges dont le vieillissement s'est traduit par :

- **des modifications biochimiques** : dont la diminution du contenu enzymatique, ralentissement métabolique, perte des lipides membranaires et phénomènes oxydatifs.
- **des modifications morphologiques** : qui ont tendance à la sphéricité par réduction de la surface membranaire et/ou hyperhydratation.
- **des modifications de la plasticité** : qui se traduit par une diminution de la déformabilité des globules rouges entraînant une stagnation dans les capillaires (Aguilar et Martinez, 2007).

### 2.4.2. L'hémolyse intravasculaire :

L'hémolyse intravasculaire n'intervient que pour 5 à 10%. Elle se passe à l'intérieur des vaisseaux et libère de l'hémoglobine directement dans le plasma. Elle résulte de l'activation du complément à la surface des hématies ce qui aboutit à la formation d'un complexe d'attaque membranaire d'où une hémolyse intravasculaire aigue (Barker, 2000). La libération des divers constituants de l'hématie notamment l'hémoglobine dans la circulation sanguine forme un complexe avec l'haptoglobine synthétisée par le foie (Festus et al., 2006). Ce complexe est capté par l'hépatocyte au niveau duquel l'hémoglobine est dégradée (Aguilar et Martinez, 2007).

Une hémolyse intravasculaire peut aussi affecter 10 à 20 % des globules rouges, voire plus dans le cas des culots globulaires. Les complications de la transfusion liées au métabolisme du fer peuvent aussi survenir dans ce cas (**Beamount, 2005**).

### 2.4.3. L'hémolyse pathologique :

Si la destruction des érythrocytes est un phénomène normal qui a lieu dans la rate lorsque les globules rouges sont en fin de vie, l'hémolyse anormale du sang peut avoir différentes causes. Il peut s'agir d'une pathologie qui aboutit à la destruction des globules rouges dans les vaisseaux sanguins, cas de certaines anémies, des accidents transfusionnels ou du paludisme. Des parasites sanguins, des infections bactériennes et virales, des agents chimiques, des plantes toxiques peuvent entraîner une hémolyse. Par définition l'hémolyse pathologique est la destruction précoce et exagérée des GR circulants sous l'effet d'un processus hémolytique qui peut être intrinsèque (Hémolyse corpusculaire) ou extrinsèque (Hémolyse extra-corpusculaire). Ce processus peut être congénital ou acquis. Il affecte toujours un des constituants vitaux du globules rouges : membrane, enzyme, hémoglobine (Hgb) (**Beaumont et Hergaux , 2005**).

Elle peut être due à deux mécanismes principaux qui sont :

- a- **Soit une anomalie du globule rouge** : hémolyses corpusculaires ou globulaires.
- b- **Soit à une agression extrinsèque des hématies** : hémolyse extra-corpusculaires (**Aguilar et Martinez, 2007**).

### 3.1. Etude systématique

*Lawsonia inermis* nommé Henné, est la plante la plus connue de la famille des Lythracées. Cette famille est connue pour sa possession d'un potentiel colorant important (Joy, 2001).

✚ La plante *L. inermis* est classée comme suit (Ghédira et al., 2017) :

- Règne : Plantae
- Division : Tracheophyta (plantes vasculaires)
- Subdivision : Spermatophytina (spermatophytes, phanérogames)
- Classe : Magnoliopsida
- Super-ordre : Rosanae
- Ordre : Myrtales
- Famille : Lythraceae
- Genre : *Lawsonia*
- Espèce : *inermis* L.
- Synonymes : *L.abla* Lam  
: *L .spinosa*  
: *Rotantha combretioides*
- Noms communs **Français** : Henné  
**Anglais** : Henna, hina, henna tree, mignonette tree.  
**Arabe** : لحناء (Al-ḥinnā')
- Nom scientifique : *Lawsonia inermis* L.

### 3.2. Etude botanique

#### 3.2.1. Description

*Lawsonia inermis* est un arbuste fortement ramifié, glabre, atteignant 6 m de haut, à écorce marron-grise. Ses feuilles sont petites, entières, opposées, ovales, à environ 1,5 à 5 cm de long et 0,5 à 2 cm de large de couleur verte (Bezanger et al, 1986). Les fleurs sont odoriférantes de couleur blanche ou rose pâle, comprenant 4 sépales, 4 pétales, 8 étamines et 4 carpelles soudés en un ovaire à 4 loges pluri ovulées. Son fruit est une capsule globuleuse de 4-8 mm de diamètre, de couleur violet-vert, contenant de nombreuses graines longues de 2 à 3 mm, à tégument épais [(Aweke et Tapapul, 2005) ; (Chauhan et Pillai, 2007)] (Figure N°01).



[A] : Arbuste de *L. inermis*



[B] : Partie aérienne avec fruit



[C] : Fleurs



[D] : Fruit



[E] : Feuilles



[F] : Poudre des feuilles séchées

**Figure N°01:**

**Description botanique de *Lawsonia inermis***



### 3.2.2. Utilisation traditionnelle de Henné

Henné est l'un des plus anciens produits de beauté du monde. Son utilisation est ancienne et a été trouvée dans les récits des voyageurs ou explorateurs de siècles écoulés. Cette plante est utilisée très longtemps dans les pays du Moyen-Orient et du Maghreb, lors de mariages ou autres cérémonies familiales, par des dessins sur les mains et sur les pieds notamment. L'utilisation des dessins peut être plus généralisée utilisant des motifs colorés sur le corps entier (**Cartwright et Jones, 2006**).

Les parties utilisées sont les feuilles séchées réduites en poudre fine. Les propriétés tinctoriales sont dues à la fixation énergétique de la lawsone sur les cheveux et la peau sans doute par réaction avec les groupements thiols de la kératine. Ce principe est exploité dans les shampooings et les lotions capillaires. Le Henné confère ainsi à la peau et aux cheveux une couleur brun-acajou (**Bruneton 1993**).

### 3.3. Aire de répartition de l'espèce *Lawsonia inermis*

Henné est une poudre brune ou verte finement broyée provenant de feuilles séchées de la plante *Lawsonia inermis*, qui est cultivée dans les zones tropicales et subtropicales sèches, notamment en Afrique du Nord, en Inde, au Sri Lanka et au Moyen-Orient (**Amit S. Borade et al., 2011**). Cette plante présente les meilleures qualités tinctoriales quand elle est cultivée dans les températures comprises entre 35°C et 45°C et elle ne prospère pas lorsque les températures minimales sont inférieures à 11°C. Pendant la saison humide, la plante croît rapidement en émettant de nouvelles pousses, puis croît ensuite plus lentement. Les feuilles deviennent petit à petit jaunes et tombent pendant les périodes sèches.

*L. inermis* a été largement diffusée en Europe depuis 1890 (**El Babili et al., 2013**). Elle est l'objet d'un commerce intense entre l'Afrique du nord, le sous-continent indien et l'Europe (**Dalal 1986 ; Botineau 2010**). Actuellement, la région de Pali au Rajasthan est la plus grande zone de production en Inde, avec plus de 100 producteurs dans la ville de Sojat.

### 3.4. Activité pharmacologiques et effets thérapeutiques de *Lawsonia inermis*

Historiquement, les propriétés médicinales de la plante ont été connues et appliquées pendant longtemps. Ces vertus médicinales merveilleuses sont aujourd'hui incontestables (**Badri et Burkinshaw, 1993**). En médecine populaire, le Henné est utilisé comme une plante médicinale parce qu'elle est créditée d'un fort pouvoir fongicide, anti-inflammatoire, antalgique, antibiotique bactéricide, parasiticide, antiamibien, astringent antihémorragique et présente

Des effets de sédation, d'hypotension et d'anti-cancer ainsi que de propriétés d'anti-transpiration [(Hosein et Zinab, 2007) ; (Oladele et Adewunmi, 2008)].

Parmi les recommandations thérapeutiques de Henné, on note son utilisation dans le traitement de certaines lésions cutanées comme : la dermite irritative, les mycoses, l'acné et la dermatite séborrhéique, et aussi pour traiter les ongles cassants. Les médecines traditionnelles d'arabes et d'Inde utilisent l'infusé des feuilles et des racines pour déclencher l'accouchement et en décoction contre certaines diarrhées. **Hanke et Talaat (1961) et Galal et al., (1965)**, ont démontré pour la première fois l'utilisation de *L. inermis* comme remède contre l'amibiase intestinale.

**Dhananjay Kumar Singh et ses collaborateurs en 2014**, ont réalisé une enquête ethnobotanique au Nigéria, et ils ont trouvé que *L. inermis* est l'une des herbes les plus utilisées dans le traitement du paludisme dans les communautés de l'État d'Ogun. En Algérie, des travaux publiés par **Hamdi et Benazzouz (1998)**, ont mis en évidence un effet probable de *Lawsonia inermis* comme cicatrisant sur les brûlures du 3<sup>ème</sup> degré chez le lapin.

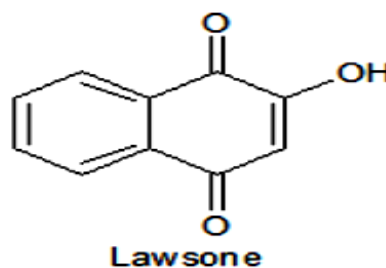
Dans une étude récente, il a été révélé que l'extrait brut et éthanolique des feuilles de *L. inermis* montrent à dose dépendante un effet analgésique, antipyrétique et anti inflammatoire chez les rats (**Bhuvaneswari et al., 2002**). Il a été rapporté aussi que l'extrait aqueux des feuilles de Henné a montré une action hépato-protectrice significative contre les dommages hépatiques induits par le tétrachlorure de carbone chez les rats albinos Wistar, comme en témoignent les taux réduits du sérum bilirubine, du sérum glutamate pyruvate transaminase, et du sérum alpha-acétone phosphatant (**Singh et al., 2014**).

En plus, il a été montré que les feuilles de *L. inermis* exhibent une activité antioxydante comparable à celle de l'acide ascorbique (**Botros et al., 2004**). Beaucoup d'études ont montré l'activité antibactérienne d'extraits de feuilles de Henné contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium sp*, et beaucoup d'autres. Ce pouvoir antibactérien a été attribué à la Lawsonie et aux tanins (**Ghosh et al., 2008**).

Henné a aussi été proposé comme traitement dans d'autres pathologies (rhumatismes, trouble digestifs, maladies vénérienne, céphalées, morsures d'insectes, etc.). Outre ses utilisations cosmétiques et thérapeutiques, ce produit a aussi été utilisé comme aide au diagnostic ou au repérage chirurgical.

### 3.5. Etude chimique de l'espèce *Lawsonia inermis*

Les composants responsables des propriétés colorantes dans la plante *L.inermis* appartiennent à la famille des quinones (**Shivananda et al., 2007**). Les principaux composants sont de type 1,4-naphtoquinone, représentés principalement par la 2-hydroxy-1 naphtoquinone appelé couramment la lawsone (**Figure N°02**) (**Wichtl, 1999**). La lawsone est le principal composant bioactif qui a pu entraîner des effets toxiques, reliés à son potentiel oxydant ou à ses propriétés allergisantes.



**Figure N°02 :** La lawsone retrouvée dans *Lawsonia inermis*

**Berthollet** est le premier à avoir fait, en **1800** une analyse sommaire des feuilles de *Lawsonia inermis* L. A leur tour, les fleurs donnent une huile essentielle (0,01-0,02%) de couleur marron ou marron foncé, au parfum prononcé et composée principalement d'ionones  $\alpha$  et  $\beta$ , d'un composé azoté et d'une résine (**Gagandeep Chaudhary et al, 2010**).

Les tiges de la plante renferment différentes substances complexes. Il a été rapporté que l'écorce de la plante contient des dérivés naphtoquinoniques tel que : la 2-méthyl- - 8-hydroxy- 1,4-naphtoquinone (**Gupta, 1993**). En plus, deux triterpènes pentacycliques ont été isolés à partir de l'écorce et identifiés comme étant le 13,30- dihydroxylup-20(29)-ène (hennadiol) et le 313,30- dihydroxylupane (**Chakrabartty et al, 1982**).

Les graines aussi contiennent des protéines (5,0%), des glucides (33,62%), des fibres (33,5%), des huiles grasses (10-11%), des composées d'acide béhénique, d'acide arachidique, d'acide stéarique, d'acide palmitique, d'acide oléique et d'acide linoléique. La fraction insaponifiable contient des cires et des matières colorantes (**Gagandeep et al., 2010**).

Des études phytochimiques basées **sur** des analyses spectrales et des réactions chimiques effectuées sur les racines de la plante *L.inermis* ont permis de mettre en évidence un stérol. Ce dernier, nommé lawsaritol, fut isolé à partir de l'extrait alcoolique (**Gupta et al., 1992**).

### 3.6. Toxicité de la plante

De façon générale, le Henné est une substance reconnue comme peu ou pas toxique, surtout lors d'application cutanée. Compte tenu de son usage cosmétique important, de par le monde et de par les siècles, et du peu de réactions allergiques rapportées dans la littérature, on peut donc estimer que le Henné n'est qu'un faible agent sensibilisant.

Cette plante ingérée contient des composés cytotoxiques *in vitro* et se montre toxique, mais elle n'est pas réputée toxique pour l'adulte en bonne santé, en usage externe et sur une peau saine.

En 2009, à Mayotte dans l'Océan Indien, une jeune femme enceinte de 17 ans suit une recette locale et se prépare une décoction de feuilles fraîches de henné dont elle ingère environ 500mL. Elle n'observe aucun signe d'avortement, mais présente par contre une intense asthénie perdurant plusieurs jours. A l'hôpital, le bilan biologique met en évidence une anémie normochrome normocytaire hémolytique (hémoglobine à 4 g/dL de sang, réticulocytose, plaquettes et leucocytes normaux) imposant un recours à plusieurs transfusions sanguines bien tolérées pour obtenir une stabilisation des taux d'hémoglobine autour de 6g/dL (**Perinet I et al ,2011**).

Récemment, **Mosaid et Alferah (2012)** ont étudié les effets toxiques de l'extrait aqueux de feuille de *L. inermis* en surveillant les changements histologiques dans les tissus du foie, des reins et de la rate de rats. Le traitement à une dose de 200 mg / kg / jour pendant 42 jours n'a entraîné aucun changement histologique par rapport au groupe témoin. Cependant, des anomalies significatives sont apparues dans la préparation histologique à une dose de 1000 mg / kg / jour.

Le mécanisme d'allergie, dans le cas du Henné pur, est probablement médié par les IgE, et cette hypersensibilité réaginique a d'ailleurs pu être objectivée par le dosage dans le sérum des patients symptomatiques, d'anticorps sériques IgE spécifiques au Henné (**Bolhaar et al., 2001**).

Certains cas isolés de réactions allergiques de type immédiat ont été signalés lors de l'utilisation de teinture de la préparation de Henné mélangé avec d'autres composants à base de paraphenylenediamine (PPD) qui donne à la préparation cosmétique une couleur plus foncée (**Frosch et Hausen, 1986**). Lorsque le PPD pénètre dans la peau, via le tatouage, il se fixe sur les cellules cutanées. C'est finalement cette fixation qui est à l'origine des réactions allergiques causées par les préparations du Henné. En revanche, la poudre de Henné pur sans additif ne donnait pas de réactions, infirmant la sensibilisation à *L.inermis* (**Le Coz, 2001**).

Plusieurs cas d'intoxications sévères écrits au Koweït, sont liés à la pratique bédouine consistant à appliquer sur le corps des premiers nouveau-nés mâles, pour célébrer leur arrivée, un mélange fait de feuilles de Henné, d'eau et de sel. Ce mélange étant supposé agir aussi comme antiseptique (**Kandil et al., 1996**). **Raupp et ses collaborateurs (2001)**, apporte sur une période d'un an, quatre cas dont un décès, chez des enfants déficients en G6PD, ayant eu soit sur le corps entier, soit sur les mains et/ou les pieds, une solution de Henné.

Outre l'atteinte par hémolyse, la toxicité peut progresser vers une défaillance aiguë rénale avec augmentation du volume rénal, des taux plasmatiques élevés d'urée et de créatinine ont été démontrées expérimentalement, chez l'animal, par administration de la lawsone. (**Munday et al., 1991**). Dans cette même étude, a été mis en évidence le fait que l'action hémolytique de la lawsone était liée à la dose. Cette augmentation du volume rénal a été aussi observée chez l'humain (**Hashim et al., 1992**).

---

# **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

---

Ce travail est réalisé dans le laboratoire pédagogique de la Faculté des Sciences, département de biologie de l'université Belhadj Bouchaib d'Ain Temouchent.

### **1. Matériel végétal :**

Notre travail a porté sur les feuilles de *Lawsonia inermis*, récoltées 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. Après séchage, les feuilles sont broyées et conservées dans des bocaux hermétiques, à sec et à l'abri de l'humidité.

### **2. Matériel biologique**

#### **2.1. Globules rouges humains**

Pour l'évaluation de l'activité hémolytique, nous avons utilisé un modèle universel de cellules animales, le globule rouge humain provenant d'un donneur unique sain.

### **3. Méthodes :**

#### **3.1. Préparation des différents extraits et l'huile de *Lawsonia inermis* :**

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

##### **3.1.1. Extrait brut aqueux**

40 g des matières végétales sont mis en contact avec 500mL d'eau distillée froide. L'ensemble est laissé macérer durant 24 h sous agitation continue. L'opération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant toutes les 24 heures. Les trois fractions sont réunies et filtrées puis évaporées à sec dans une étuve à une température de 45°C. Le produit est récupéré sous forme de solide de couleur marron.

##### **3.1.2. Extrait brut eau/Méthanol :**

Selon la méthode de **Upson et al. (2000)**, 5 g de la matière végétale séchée sont placés dans un récipient en verre couvert de 100 mL de méthanol aqueux 70% ; le tout est chauffé à 70°C pendant 5 minutes (ce procédé tue le tissu végétal et empêche l'oxydation ou l'hydrolyse

enzymatique). L'échantillon est laissé macérer durant 24h, et l'opération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant.

Après filtration des fractions sur du papier filtre, elles sont réunies et évaporées à sec en utilisant un rotavapeur à température 45-50°C

### **3.1.3. Extrait des tannins :**

L'extraction des tannins des feuilles de la plante *Lawsonia inermis*, est réalisée selon la méthode de **Zhang et al., 2008**. Les broyats de la matière végétal (5 g) ont été extraites par 100 mL du mélange acétone/eau distillée (70/30 : V/V) durant trois jours à une T° ambiante. La solution obtenue est filtrée et évaporée à 40°C par un rotavapeur type bouché R-200 pour éliminer l'acétone, puis la phase aqueuse est lavée par le dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides.

Après élimination de la phase organique, la phase aqueuse a été traitée deux fois avec l'acétate d'éthyle (V/V). Les 2 phases organiques obtenues sont réunies et évaporées à sec à 40°C par un rotavapeur. La phase aqueuse restante est traitée deux fois par le 1-butanol. Les phases 1-butanol sont évaporées à sec, afin de récupérer l'extrait sous forme de poudre.

### **3.1.4. Extraction des huiles fixes par soxhlet :**

L'extraction des huiles fixes est réalisée à l'aide d'un soxhlet en utilisant l'hexane comme solvant et selon la procédure décrite par **Abitogun et al. (2009)**. Ainsi 100 g de chaque échantillon ont été placés dans une cartouche qui sera ensuite insérée au centre de chaque extracteur. Lorsque le solvant atteint le degré d'ébullition, la vapeur monte à travers un circuit d'évaporation, se condense au niveau du condensateur et après son contact direct avec le réfrigérant, il retombe sur l'extracteur faisant macérer l'échantillon dans le solvant. Ce dernier s'enrichit progressivement de composés solubles. Enfin, les mélanges obtenus sont placés dans un évaporateur rotatif afin de récupérer l'huile résiduelle qui va être conservée au frais (+4°C) dans de petits flacons en verre et utilisée pour le reste du travail analytique.



### 3.1.5. Le rendement des extraits secs :

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

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

**P1** : poids du ballon après évaporation ;

**P2** : poids du ballon avant évaporation ;

**P3** : poids de la matière végétale initial.

### 3.1.6. Le rendement de l'huile fixe :

Le calcul du rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile fixe obtenue et la masse de la matière végétale à traiter (**Belyagoubi, 2014**) :

$$\text{R H} = \text{MH} / \text{Mvs} \cdot 100$$

**R H**: Rendement en huile fixe.

**MH** : Masse d'huile récupérée en g.

**Mvs** : Masse de la matière végétale utilisée pour l'extraction exprimée en g.

## 3.2. Dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux :

### 3.2.1. Préparation de l'extrait pour les dosages

Les trois extraits bruts : aqueux, hydrométhanoliques et hydroactéoniques de la plante *Lawsonia inermis* sont solubilisés dans le méthanol à une concentration de 10 g/L pour le dosage des flavonoïdes totaux et des polyphénols totaux.

### 3.2.2. Dosage des polyphenols totaux

#### a- Principe

La méthode est celle utilisant le réactif de Folin Ciocalteu. Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite dont l'absorption maximum est comprise entre 700 et 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphenols présentes dans les extraits végétaux (**Boizot et Charpentier, 2006**).

#### b- Mode opératoire :

Le dosage des polyphenols est réalisé selon la méthode décrite par **Wang et al., (2006)** :

- 0.1 mL de l'échantillon est mélangé avec 2.5 mL d'une solution de Folin ciocalteu (10 fois dilué).
- Agitation au vortex
- Laisser reposer 5 minutes
- Addition de 2.5 mL d'une solution de  $Na_2CO_3$  à 2%
- Laisser reposer pendant 30 minutes à la température ambiante
- La lecture est faite à 725 nm contre un blanc

Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de matière végétale sèche. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif à différentes concentrations (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL).

Les résultats ont été exprimés en mg équivalent d'acide gallique /g de matière végétale sèche et calculés selon la formule suivante :

$$\text{Quantité de polyphenols} = a. f/b$$

**a** : Concentration en polyphenols en mg/mL déterminée à partir de la courbe d'étalon

**f** : Facteur de dilution (x50)

**b** : Concentration initiale de l'extrait (10 mg/mL)

### 3.1.3. Dosage des flavonoïdes totaux

#### a- Principe

Les flavonoïdes sont dosés par la méthode colorimétrique au trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et la soude ( $\text{NaOH}$ ). Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes et la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le visible à 510 nm.

#### b- Mode opératoire

- 500  $\mu\text{L}$  de l'échantillon sont mélangés avec 2 mL d'eau distillée
- Addition de 150  $\mu\text{L}$  d'une solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 15 %
- Laisser reposer pendant 6 minutes
- Addition de 150  $\mu\text{L}$  de chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3, 6 \text{H}_2\text{O}$ ) à 10%
- Laisser reposer pendant 6 autres minutes
- Addition de 2 mL d'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ) à 4%
- Le volume total est complété à 5 mL d'eau distillée
- Agiter et laisser reposer pendant 15 minutes

La lecture est faite à 510 nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mg/mL).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent de catéchine par gramme de matière végétale sèche. Selon la formule suivante :

$$\text{Quantité de flavonoïdes} = a \cdot f / b$$

**a** : Concentration des flavonoïdes en mg/mL déterminée à partir de la courbe étalon

**f** : Facteur de dilution ( $\times 10$ )

**b** : Concentration initiale de l'extrait (10mg/mL).

### 3.3. Evaluation de l'activité hémolytique des extraits des plantes étudiées vis-à-vis des globules rouges humains

Les tests de l'effet hémolytique des extraits et de l'huile de Henné ont été réalisés sur une suspension érythrocytaire du sang humain, incubée dans un tampon phosphate salin à PH=7,4

#### 3.3.1. Préparation du phosphate buffered saline (PBS) :

Pour préparer la solution tampon de PBS à pH=7,4, on a utilisé les composés suivants avec les concentrations qui leurs correspondent :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (8Mm) ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2Mm) ; KCl (2,7Mm) ; NaCl (137mM) (Mohan, 2006).

#### 3.3.2. Préparation de la suspension érythrocytaire :



En vue de sa facilité d'isolement, le globule rouge a été choisi comme modèle en biologie cellulaire et moléculaire. Le sang utilisé, provenant d'un donneur unique sain, a été prélevé sur un tube hépariné et centrifugé à 2400 tours /minutes durant 10 min. Le surnageant résultant (plasma) a été éliminé et le culot a été lavé 2 fois par PBS, puis resuspendu à nouveau par ce dernier avec le même volume de plasma éliminé. La suspension érythrocytaire ainsi obtenue été diluée 20 fois par PBS (1mL de culot est dilué dans 19mL de solution tampon).

#### 3.3.3. Préparation des extraits et de l'huile fixe :

Différentes concentrations d'extraits de la plante (30mg/mL, 45mg/mL ,60mg/mL, 90mg/mL, 120mg/mL) et de l'huile fixe ont été solubilisé dans le PBS.

#### 3.3.4. Test d'effet hémolytique :

Le test d'effet hémolytique de la plante étudiée a été réalisé selon la méthode décrite par [(Singh et kaur, 2008) ; (Kumar et al., 2015)]. Dans des tubes à hémolyse :

-  On mélange 2950µL de la suspension érythrocytaire préparée avec 50µL de l'extrait à différentes concentrations initiales. Les concentrations finales obtenues après ajout du PBS sont de l'ordre de 0,5mg/mL, 0,75mg/mL ,1mg/mL, 1,5mg/mL et 2mg/mL.
-  Les tubes sont incubés dans un incubateur agitateur à 37°C durant une heure.

- ☐ Après, 500 µL sont prélevés des différents tubes et cela chaque 15min (15min, 30min, 45min, 60min) ;
- ☐ Ajouter 1,5 mL de PBS dans tous les tubes ;
- ☐ Mélanger les tubes délicatement ;
- ☐ Centrifuger les tubes à 2400 tours/ min durant 10 min ;
- ☐ Lire l'absorbance de chaque tube (la fuite d'hémoglobines) à 548 nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc contenant du PBS.

Un tube témoin négatif est préparé dans les mêmes conditions expérimentales. Il est composé de 2950µL de suspension érythrocytaire et 50µL de solution tampon de PBS, en absence d'extrait. Les tests d'hémolyse sont répétés 3 fois.

Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, nous avons préparé un tube d'hémolyse totale qui contient 250µL de la suspension érythrocytaire et 4750µL d'eau distillé en absence d'extrait. Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse total après une heure d'incubation, selon la formule suivante (Lee, 2003) :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = \frac{100\% \times (A_{548 \text{ nm de l'échantillon}} - A_{548 \text{ nm du témoin négatif}})}{(A_{548 \text{ nm test hémolyse totale}} - A_{548 \text{ nm du témoin négatif}})}$$

---

# RÉSULTATS ET DISCUSSION

---

### 1- Rendement en extraits secs :

La préparation des extraits à partir des feuilles de *Lawsonia inermis*, a été effectuée en deux grandes étapes. La première est une extraction brute soit en utilisant un mélange hydro alcoolique (Eau/Méthanol) ou aqueux. La deuxième étape d'extraction est celle du fractionnement de l'extrait brut eau/acétone. Pour cela, nous avons utilisé deux solvants de polarité croissante (Acétate d'éthyle et 1-butanol) permettant ainsi de séparer les composés tanniques de cet extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et selon leur degré de glycosylation (Markham, 1982).

De ce fait, quatre différents extraits ont été obtenus successivement à savoir : l'extrait brut aqueux (EBA), l'extrait brute eau/Méthanol (EBEM), la fraction acétate d'éthyle des tanins (FAC), et la fraction 1-butanol des tanins (Fnb). La couleur, l'aspect ainsi que le rendement sont déterminés par rapport à 40 g de la matière végétale sèche et broyée, et exprimé en pourcentage. Les caractéristiques physiques de chaque extrait sec obtenu sont mentionnées dans le tableau N°02 et l'histogramme de la figure N°03.

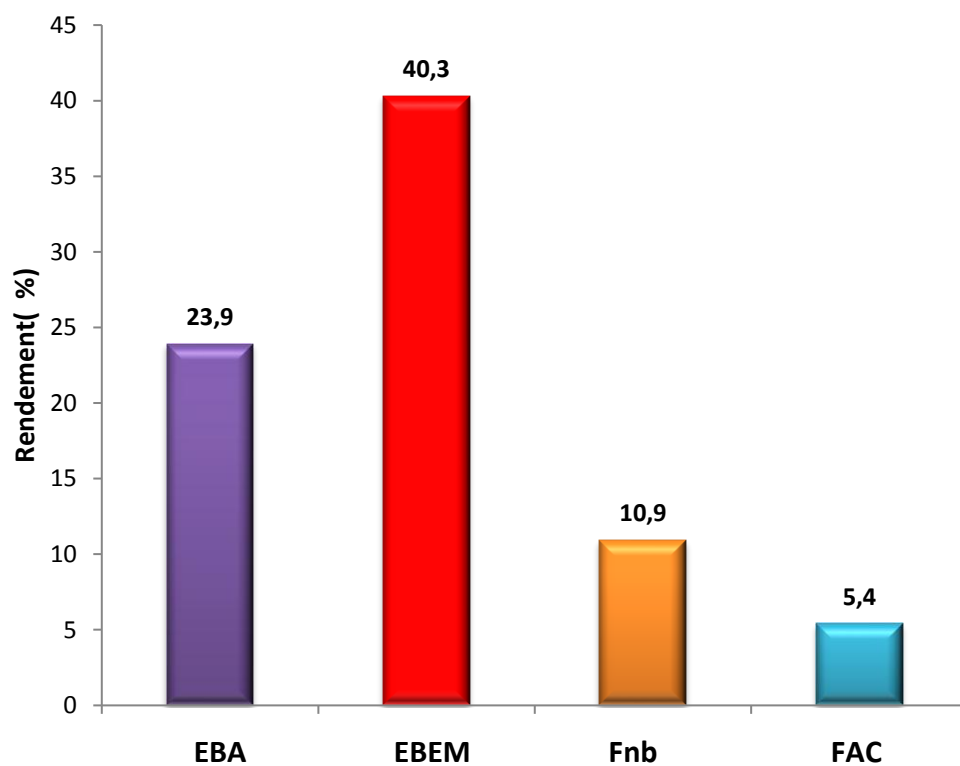
**Tableau N°02 : Caractéristiques physiques et teneurs en composés extractibles ou rendement d'extraction des feuilles de *Lawsonia inermis*.**

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement(%)
<b>EBA</b>	Pâteux	Marron foncé	23,9
<b>EBEM</b>	Pâteux	Vert foncé	40,3
<b>FAC</b>	Poudre	Vert foncé	5,4
<b>Fnb</b>	Visqueux	Marron	10,9

Selon les résultats enregistrés dans le **tableau N°02**, nous remarquons que les extraits obtenus présentent généralement un aspect pâteux et parfois visqueux, de couleur vert foncé ou marron. Les résultats de **la figure N°03** montrent aussi que le rendement le plus élevé est enregistré dans les extraits bruts avec un pourcentage de 40,3% pour l'extrait eau/méthanol et de 23.9% pour l'extrait brut aqueux. Concernant l'extrait des tanins, des teneurs importantes sont enregistrées. Le rendement le plus élevé est obtenu dans la fraction 1-butanol avec un taux de 10.9%, suivi de la fraction acétate d'éthyle avec un taux de 5.4%.

Ces différences dans le rendement varient d'une espèce végétale à une autre et en fonction des solvants utilisés, des facteurs extrinsèques, des conditions environnementales, de la période de récolte, de l'âge du matériel végétal et de la partie utilisée (**Smallfield, 2001**).

Pour chaque espèce végétale et au sein de la même espèce, la nature des composants phytochimiques est à l'origine des activités biologiques de chaque extrait ou fraction. Ces activités dépendent aussi de la teneur de la substance ou l'ensemble des substances biologiquement actives (**Kahlouche, 2013**). Nous pouvons conclure donc que l'extrait brut des feuilles de Henné présente une teneur importante en métabolite secondaire.



**Figure N °03**

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



### **2. Rendements en huile fixe :**

Dans cette étude, le rendement a été déterminé par rapport à 100 g de la matière végétale. Le poids de l'huile fixe est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation).

D'après les résultats obtenus, nous pouvons déduire que les feuilles de la plante étudiée *L. inermis* possède un faible rendement en huile fixe avec une valeur de (1,16 %).

Cependant, les résultats des rendements enregistrés sont différents de ceux obtenus dans d'autres études. En effet, le rendement en huile fixe des feuilles de *L.inermis* est inférieur à celui obtenu par **Fagbohoun et ses collaborateurs (2014)** qui ont travaillé sur la même espèce mais le solvant utilisé était différent. Le taux obtenu était égale à 6,66%.

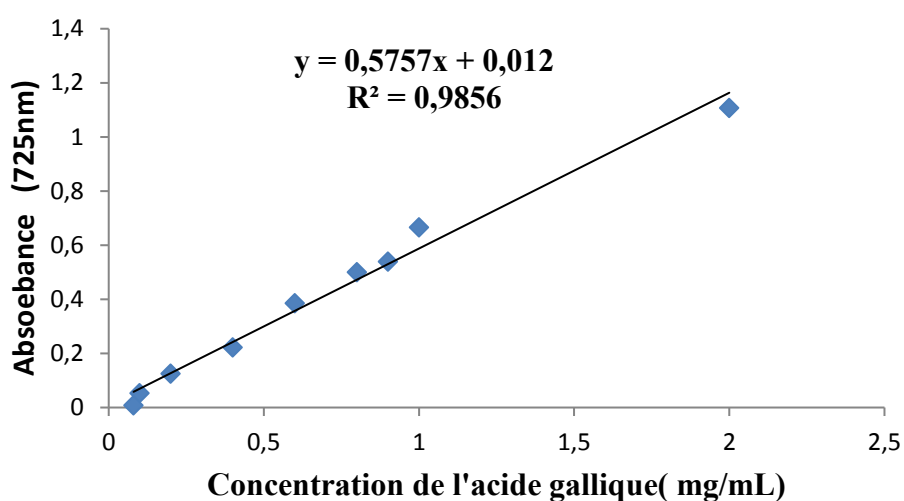
La méthode d'extraction est une opération importante qu'il faut mener avec soin. La récolte, le séchage, et le stockage influencent largement sur le rendement ainsi que la qualité organoleptique des huiles (**Benjilali., 2005**).

### 3. Analyse phytochimique quantitative :

#### 3.1. Teneur en polyphenols totaux :

La spectrophotométrie permet de quantifier la teneur des différents extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* en polyphenols, en utilisant la méthode du Folin-Ciocalteu.

La courbe d'étalonnage est effectuée par l'acide gallique à différentes concentrations. Les résultats obtenus sont exprimés en mg EAG/g de matière végétale sèche en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique (Figure N°04). Les résultats sont regroupés dans le tableau N°03.



**Figure N°04:**

Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

**Tableau N°03 :** Teneur en polyphenols totaux (TPT) dans les différents extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* L

Extrait brut	Teneur en polyphenols en mg EAG/g de la matière végétale sèche
Aqueux	82.25 ± 0.32
Eau/Méthanol	138.75 ± 0.55
Eau/Acétone	225 ± 0.898

Les valeurs représentent la moyenne de trois essais ± SD.

D'après le **tableau N°03**, la teneur en polyphénols des différents extraits obtenus à partir des feuilles de Henné varie de 82.25 à 225 mg EAG/g. Il est clair que l'extrait eau/acétone est la fraction la plus riche en polyphénols (225 EAG/g de MVS) suivie par l'extrait eau/Méthanol et l'extrait aqueux.

Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les composés phénoliques n'ont pas été entièrement révélés par le réactif du Folin-Ciocalteu dans l'extrait brut aqueux car il y aurait un encombrement stérique engendré par les macromolécules (lipide et protéine).

Les travaux d'**Enneb et al., (2015)** montrent que les feuilles de *L. inermis* sont caractérisées par des teneurs élevées en composés phénoliques.

La différence des résultats est due à la nature des composés phénoliques et à leurs solubilités qui sont gouvernées par le degré de polarisation, leurs interactions avec d'autres substances et le type de solvant utilisé (**Falleh et al., 2008**). Les polyphénols sont une classe de molécules caractérisées par la présence de plusieurs groupes phénoliques associés en structures plus au moins complexes. Ils sont solubles dans les solvants organiques polaires et peu solubles dans les solvant moins polaires (**Macheix et al., 2005**). Les conditions biotiques (espèce, organe et l'étape physiologique) et abiotiques (facteurs édaphiques), la nature du sol et le type du microclimat où poussent ces plantes influencent de manière significative la teneur en polyphénols (**Atmani et al., 2009**).

### 3.2. Teneur en flavonoïdes

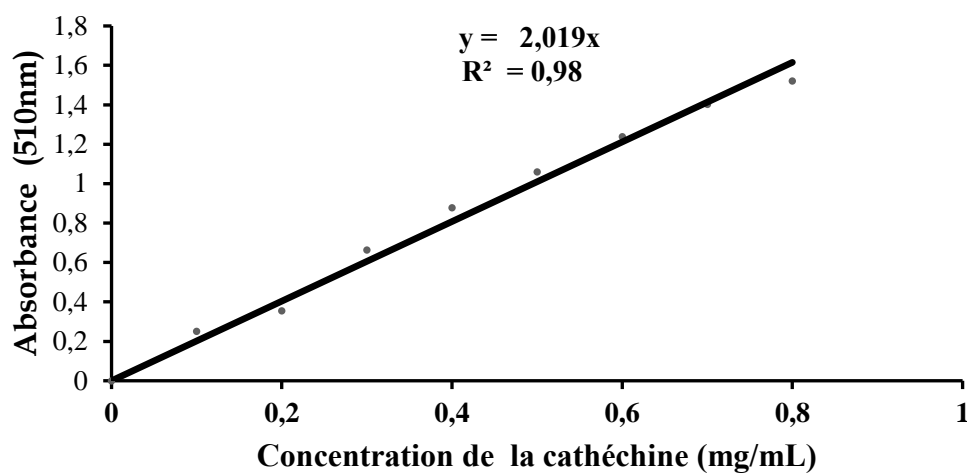
La teneur en flavonoïdes est quantifiée par la méthode au trichlorure d'aluminium et les résultats, obtenus à partir de l'équation de la droite de régression de la courbe d'étalonnage de la catéchine (mg EC/g) (**Figure N°05**), sont représentés dans **la figure N°06**.

La raison principale pour la quelle on a choisi le dosage de cette classe de polyphénols, réside dans le fait que les flavonoïdes constituent la classe polyphénolique la plus importante, avec plus de 5000 composés déjà décrits (**Gomez-Caravaca et al., 2006**).

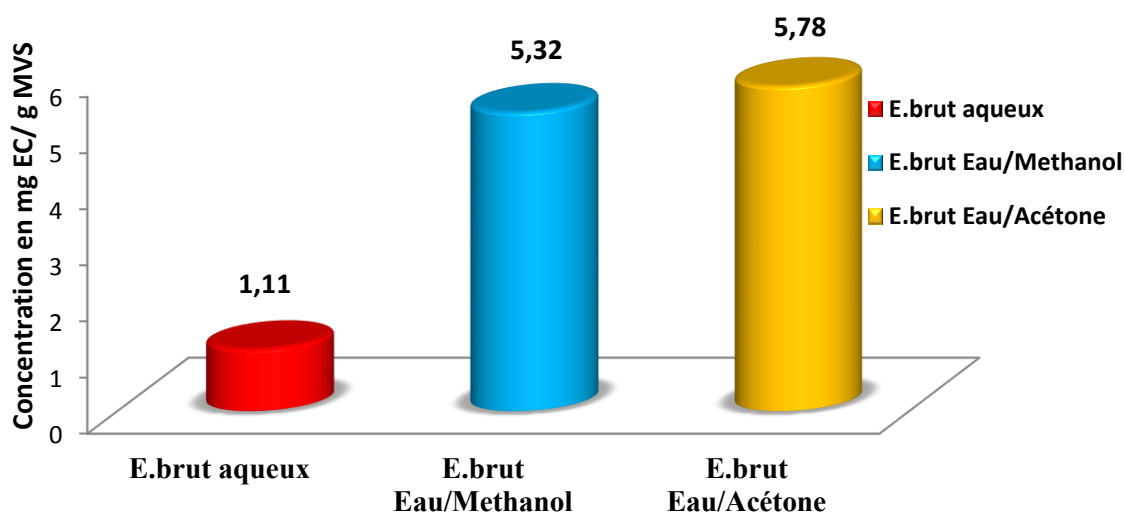
Le dosage des flavonoïdes a révélé que les extraits hydro-méthanolique et hydro-acétonique sont les fractions les plus riches en flavonoïdes (5.78mg EC/g et 5.32mg EC/g respectivement) par rapport à l'extrait aqueux. Tel résultat est comparable à celui du dosage des polyphénols. Ceci peut être expliqué par la diversité structurale et les propriétés physico-chimiques des flavonoïdes (**Verykokidou et Voyo, 1986**).

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature par les travaux d'**Enneb et ses collaborateurs (2015)** qui confirme la présence des tanins et des flavonoïdes dans les feuilles de Henné. L'équipe de **Rahmoun (2008)** a montré la richesse de cette plante en naphthoquinoniques.

Nous remarquons aussi que la concentration des flavonoïdes est plus faible que celle des polyphenols totaux, ceci nous permet de penser que les tanins sont la famille la plus représentatif des polyphenols totaux. D'après les résultats obtenus de l'examen quantitatif : *L.inermis* est riche en molécules bioactives ce qui lui assure une importante place en médecine et en cosmétologie.



**Figure N°05:**  
Courbe d'étalonnage de la catéchine.



**Figure N°06:**  
Teneur en flavonoïdes dans les différents extraits bruts de la plante de Henné

### 4. Analyse biologique

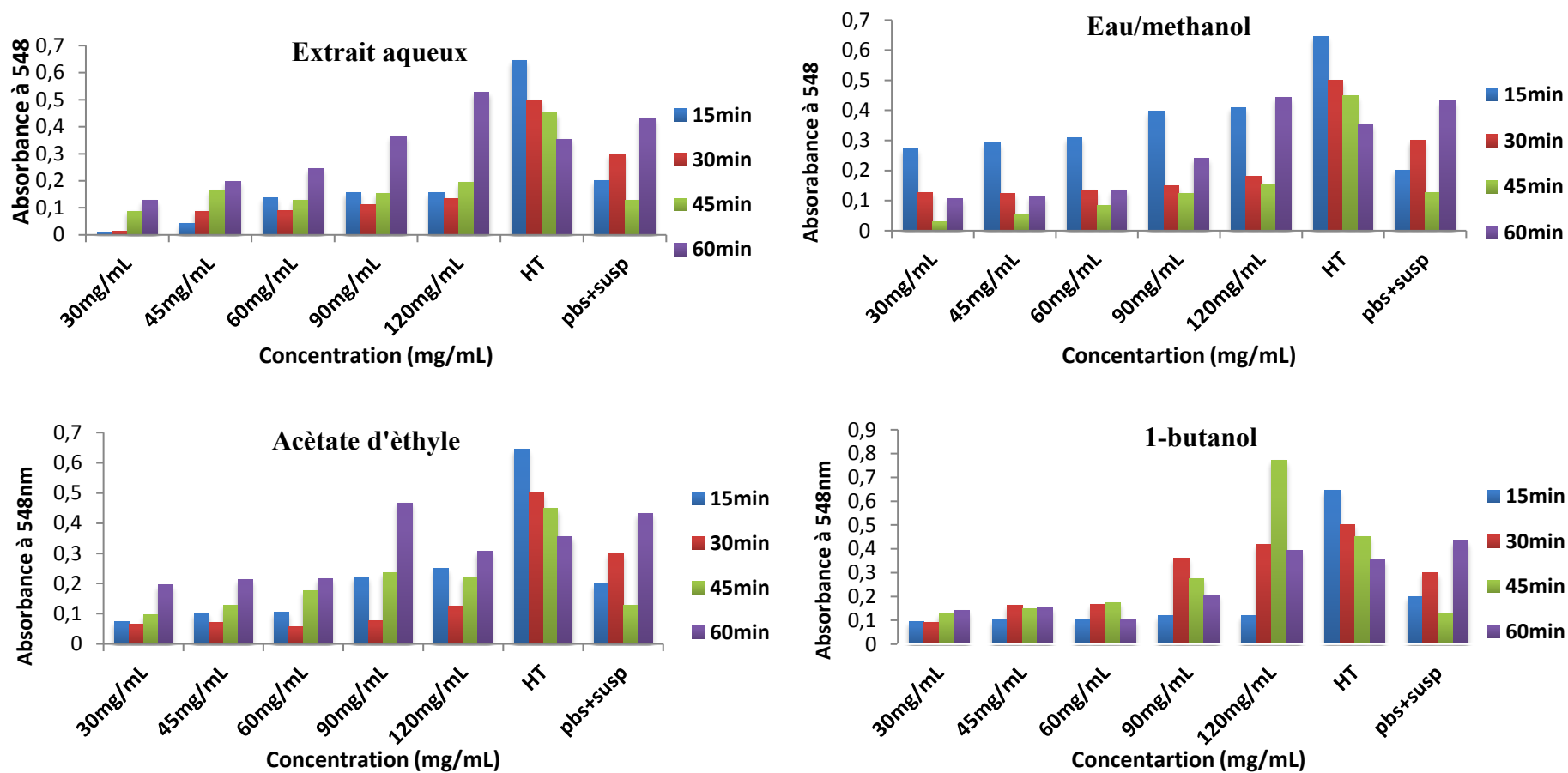
#### 4.1. Evaluation de l'effet hémolytique des extraits de la plante étudiée :

Plusieurs études ont montré que certains des métabolites secondaires notamment les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins et les saponosides possèderaient des propriétés antioxydante et antimicrobienne [(Sparg *et al.*, 2004) ; (Fiot *et al.*, 2006)].

Afin d'étudier la cytotoxicité des extraits de *Lawsonia inermis* sur les globules rouges, nous avons réalisé un test de l'effet hémolytique *in vitro* dans lequel les GRH sont mises en contact avec les extraits des feuilles de Henné à différentes concentrations comparées à un contrôle positif et à un contrôle négatif pendant 60min dans un milieu isotonique (PBS à PH7.4) en mesurant les pourcentages d'hémolyse à partir des absorbances obtenus par spectrophotomètre.

L'évolution de l'effet hémolytique est évaluée par rapport à un témoin négatif (tube contenant que le PBS et la suspension érythrocytaire), et un tube d'hémolyse total provoqué par l'eau distillée. Les résultats obtenus de cette étape sont présentés dans **la figure N°07**.

Les globules rouges sont parmi les cellules les plus utilisées dans l'évaluation de la toxicité à cause de leur disponibilité, et la facilité de leur surveillance au cours de la lyse cellulaire grâce à la libération de l'hémoglobine (Situ *et Bobek*, 2000).



PBS+ susp : témoin négatif ;

HT : hémolyse total (Eau distillée),

**Figure N°07:** Evolution de l'absorbance dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations des extraits des feuilles de *Lawsonia inermis*, incubé à 37 °C durant 60 min, à 548nm.

D'après les résultats enregistrés dans **la figure N°07**, nous remarquons une augmentation des absorbances durant le temps (15, 30, 45, 60 min). Plus la concentration d'extrait augmente, plus l'absorbance marque une augmentation considérable, donc les pourcentages d'effet hémolytique sont directement proportionnels à l'augmentation des concentrations des extraits en fonction du temps.

A des concentrations de 30, 45 et 60 mg/mL, nous avons enregistré un taux très faible d'absorbance ne dépassant pas une DO de 0,3 pour l'extrait brut aqueux et les deux fractions d'acétate d'éthyle et de 1-butanol durant toute la période d'incubation. De même, nous avons marqué une diminution d'absorbance significatif à 15min pour l'extrait brut hydrométhanolique en présence des trois concentrations testées.

Par contre, à des concentrations de 90 et 120mg/mL, nous avons enregistré un effet hémolytique plus élevé des différents extraits de *Lawsonia inermis*, atteignant une absorbance maximale égale à 0.773 pour la fraction butanolique.

Pour la fraction acétate d'éthyle, à une concentration de 90mg/mL et plus exactement au temps de 60min une augmentation très significative d'absorbance est notée (0.46). Par contre, à une concentration de 120 mg/mL une diminution de la DO est observée (0.3) et cela à 60min d'incubation.

En revanche pour la fraction butanolique des tanins, nous avons enregistré une augmentation hautement significative d'absorbance passant de 0.12 à 15min jusqu'à 0.36 à 30min pour une concentration de 90mg/mL puis une légère diminution d'absorbance jusqu'à 0.2 à la fin d'incubation (60min). Cette absorbance reste inférieure par rapport au tube d'hémolyse totale.

Par contre, à une concentration de 120mg/mL, nous avons enregistré une très forte augmentation de l'absorbance de 0.77 à 45min par rapport au temps 15 et 30 minutes ensuite une diminution très significative d'absorbance été observé atteignant un taux de 0.39 à 60 min et qui est comparable par rapport au tube d'hémolyse totale.

**La figure N°08**, présente les taux d'hémolyse des globules rouges par pourcentage (%) en fonction de temps dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire, incubée à 37°C, en présence des différentes concentrations en extraits bruts aqueux et hydrométhanolique ainsi que les deux fraction d'acétate d'éthyle et de 1-butanol des feuilles de *L.inermis* par rapport au tube d'hémolyse total contenant la suspension érythrocytaire dans un milieu hypotonique provoqué par l'eau distillée.

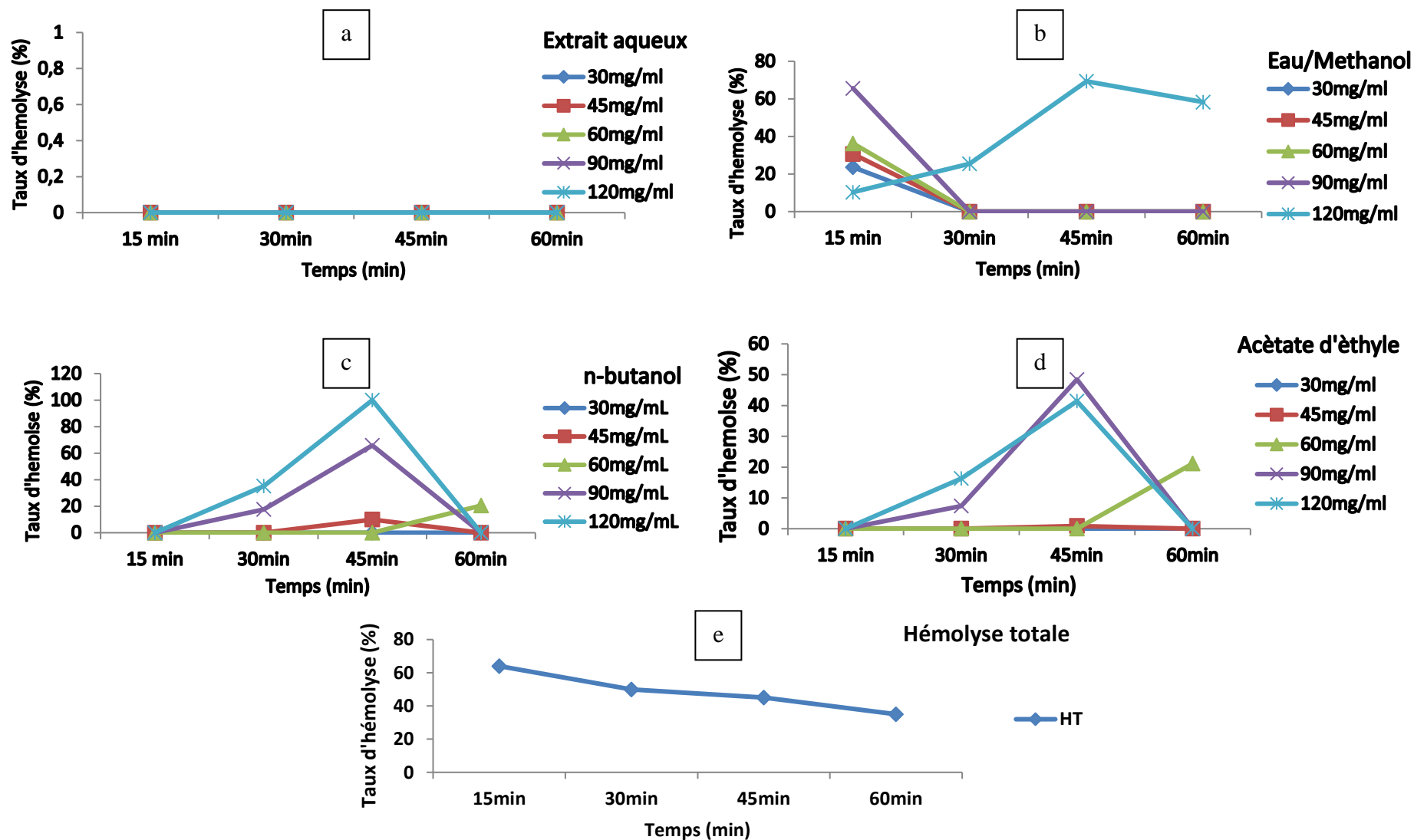


Figure N°08 : Evolution du taux d'hémolyse (%) en fonction du temps en présence des différentes concentrations d'extraits de *Lawsonia inermis*.



Les résultats relatifs aux taux d'hémolyse induit par les différentes concentrations de l'extrait brut aqueux de *L.inermis* allant de 30 à 120mg /mL vis-vis des globules rouges sont représentés sur la **figure N°08 (a)**.

Nous n'avons observé aucune activité hémolytique et aucune lyse des érythrocytes pour toutes les concentrations testées de l'extrait brut aqueux durant les 60min d'incubation.

En ce qui concerne l'effet de l'extrait hydrométhanolique de Henné sur la fuite de l'hémoglobine des globules rouges, les résultats sont présentés sur **la figure N°08 (b)**.

Nous remarquons que cet extrait est plus moins toxique comparé à l'extrait aqueux. Cet extrait a montré des niveaux d'activité hémolytique variant entre 10.33% à une concentration finale de 120mg/mL au temps 15 min et 69.33% mesuré à la même concertation mais au temps 45 min et qui correspond à une hémolyse maximale de l'extrait hydrométhanolique de *Lawsonia inermis*. En revanche, nous avons noté une augmentation significative de l'effet hémolytique en fonction de l'augmentation de la concentration en extrait au temps 15min puis une forte diminution été obtenue à la fin d'incubation (60min). Aucune lyse des globules rouges n'a été observée au temps 30, 45et 60min respectivement à des concentrations de 30, 45, 60, 90 mg/mL respectivement.

Nous avons testé également le taux d'hémolyse des deux fractions 1-butanol et acétate d'éthyle des tanins. Les résultats obtenus sont représentés sur **la figure N°08 (c et d)**.

La fraction acétate d'éthyle a montré une hémolyse maximale de 48.45 % à une concentration de 90mg/mL au temps 45 min mais qui reste moins toxique que l'hémolyse obtenue par l'extrait hydrométhanolique. À 15 min d'incubation, aucun effet d'hémolyse significatif vis-à-vis des globules rouges n'a été observé avec les différentes concertations testées. Par contre, à 45 min d'incubation, une légère activité hémolytique est notée avec des pourcentages qui restent inférieur à 20% à des concentrations de 90 et 120mg/ mL.

Pour la fraction butanolique, la concentration de 120mg/mL est considérée comme étant la plus toxique vis-à-vis des globules rouges avec une valeur d'hémolyse maximale de 100%. Par contre à 15min d'incubation et en présence des différentes concentrations testées, cette fraction ne présente aucun effet toxique vis-à-vis des érythrocytes humains. De même, nous avons observé une légère augmentation de l'effet hémolytique de cet extrait aux concentrations 90 et 120 mg/mL avec des pourcentages qui ne dépasse pas les 40% au temps 45min. A la fin d'incubation, le taux d'hémolyse reste largement inférieur à celle obtenue à 45 min et ceci vis-à-vis de toutes les concentrations testées.

Pour comparer nos résultats, une courbe de témoin positif (hémolyse totale) en fonction de temps est tracée sur **la figure N°08 (e)**. Nous remarquons une diminution proportionnelle de l'effet hémolytique au cours de l'incubation qui diminue de 64% à 35%.

Finalement, on peut classer l'effet hémolytique des différents extraits testés à la concentration de 120mg/mL après 60 min de mise en contact avec les érythrocytes humain, comme suit :  
La fraction 1-butanol > l'extrait hydromethanolique > la fraction acétate d'éthyle > l'extrait aqueux.

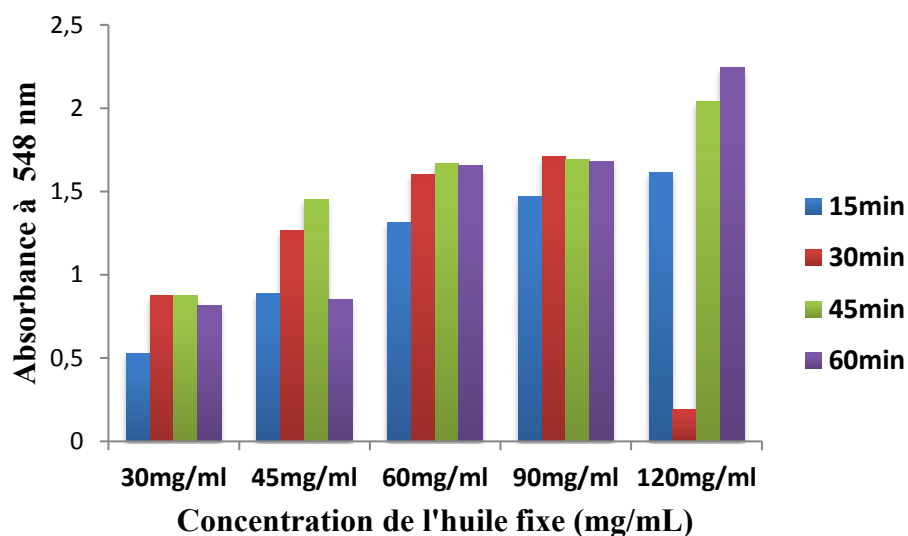
La toxicité d'une substance au niveau de l'organisme dépend de la nature de la substance, de la dose et de la durée d'exposition. Les plantes sont aussi reconnues par leurs effets toxiques, ce qui nous a mené à étudier l'effet hémolytique, *in vitro*, de cette plante par l'utilisation de modèle érythrocytaire. Ce dernier est facile à isoler du sang et sa membrane à des similitudes avec d'autres membranes cellulaires (**Shobana et Vidhya, 2016**).

Lorsque les globules rouges (RBC) sont exposés à des substances nuisibles telles que le milieu hypotonique alors la rupture de sa membrane se produira, provoquant la libération de l'hémoglobine et d'autres composants internes dans le fluide environnant. L'effet hémolytique d'une solution hypotonique est lié à une accumulation excessive de liquide dans la cellule [(**Habibur Rahman et al, 2015**) ; (**Labuet et al., 2015**)]. Les propriétés hémolytiques d'un agent hypotonique sont attribuées à son interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire. Cela induit à une augmentation de la perméabilité membranaire et un mouvement des ions (entrée de Na<sup>+</sup> et H<sub>2</sub>O, et sortie de K<sup>+</sup>), ce qui provoque l'éclatement de la membrane, permettant ainsi la sortie de l'hémoglobine (**Majester-Savornin, 1991**).

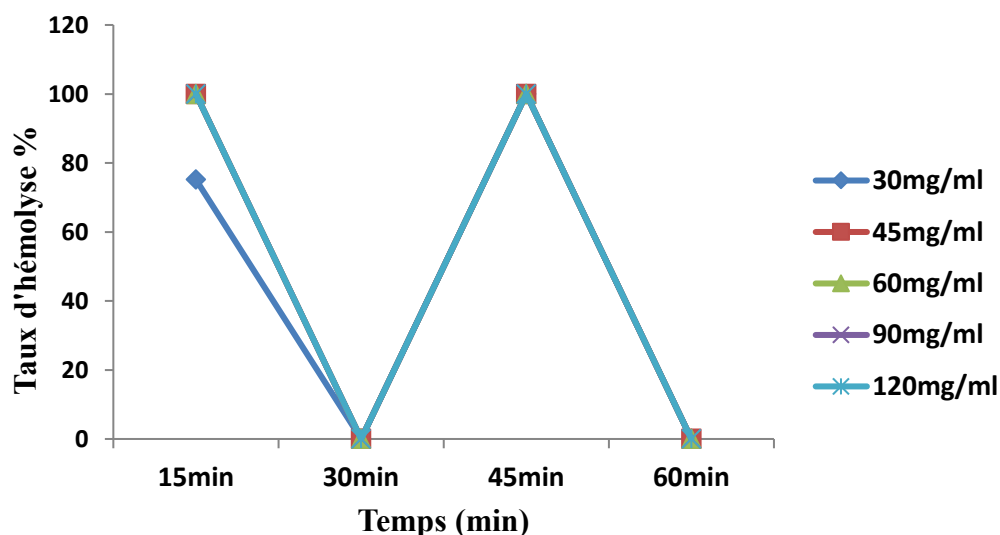
Toute substance biologiquement active est susceptible, à fortes ou à faibles doses et pour une administration prolongée, de produire des effets indésirables, voire nocifs. La cytotoxicité des feuilles de *L inermis* à une concentration très élevée sur les globules rouges est probablement due à la richesse de cette plante en tanins et la présence de certaines saponines dans les extraits bruts. Vu que les saponines sont des composants terpéniques, ils ont la capacité d'induire la formation des pores à travers les membranes cellulaires, entraînant ainsi l'hémolyse et la libération de l'hémoglobine dans le plasma, (**Makkar et Becker., 1997**).

4.2. L'effet hémolytique de l'huile fixe de *Lawsonia inermis* :

Les figures N°09 et N°10 présentent l'évolution de l'effet hémolytique par absorbance ou en pourcentage en fonction du temps, durant 60 minutes, dans un milieu tampon PBS (pH 7.4) contenant une suspension érythrocytaire et en présence des différentes concentrations de l'huile fixe de Henné préparée par extraction au soxhlet.



**Figure N°09:** Evolution de l'absorbance dans les tubes contenant une suspension érythrocytaire en fonction des différentes concentrations de l'huile fixe des feuilles de *Lawsonia inermis*, incubée à 37 °C durant 60 min, à 548nm.



**Figure N°10:** Evolution du taux d'hémolyse (%) en fonction du temps en présence des différentes concentrations de l'huile fixe de *Lawsonia inermis*.

D'après les résultats enregistrés dans **la figure N°09**, nous remarquons une augmentation des absorbances durant toute la durée de l'incubation. A la concentration en huile fixe de 30mg/mL, nous avons enregistré une augmentation de l'absorbance qui passe de 0.52 à 15min à 0.81 à 60min. Par contre à une concentration de 45mg/mL, une diminution de la DO (0.88 à 0.65) est observée à 60min. Ces absorbances restent supérieures par rapport à ceux obtenues dans le test d'hémolyse totale.

En ce qui concerne l'effet de l'huile fixe de Henné sur le taux d'hémolyse sur la fuite de l'hémoglobine des globules rouges, les résultats sont présentés sur **la figure N°10**.

Nous remarquons que cette huile est plus toxique comparée aux autres extraits de Henné où l'hémolyse maximale est estimée à 100% pour toutes les concentrations testées à 45min d'incubation. En revanche, aucune lyse de globule rouge n'est observée à 30 min en présence de toutes les concentrations testées. Par contre une forte augmentation d'activité hémolytique été enregistrée à 15min et 45min pour toutes les concentrations testées.

Les huiles sont utilisées par l'homme depuis les temps anciens et leurs utilisations ont évolué au cours des siècles (**Debruyme, 2001**). L'extraction de l'huile fixe des feuilles de *Lawsonia inermis* par soxhlet est une méthode simple et convenable permettant de répéter infiniment le cycle d'extraction avec du solvant frais (hexane) jusqu'à l'épuisement complet du soluté dans la matière première (**Penchev, 2010**).

---

# **CONCLUSION GÉNÉRALE**

---

## Conclusion générale

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain. Leur importance dans le domaine de la santé publique est très accentuée durant ces dernières années grâce aux thérapeutiques qu'elles procurent. Cette diversité en propriétés biologiques est liée certainement aux vertus thérapeutiques attribuées à une gamme extraordinaire de molécules bioactives synthétisées. L'utilisation d'une plante en toute sécurité nécessite une connaissance non seulement de ces effets bénéfiques mais aussi des complications graves que peut engendrer son utilisation non contrôlée. Notre étude est basée sur l'étude des feuilles de la plante *Lawsonia inermis*. *L* largement utilisées en cosmétique ainsi qu'en médecine traditionnelle.

Dans ce présent travail, les extraits et l'huile fixe des feuilles de *Lawsonia inermis* ont fait l'objet d'une étude phytochimique et d'une évaluation de leur effet hémolytique (cyto-toxicité). L'analyse quantitative de l'extrait aqueux, hydro-méthanolique et hydro-acétonique, est représentée par le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes révélant une forte concentration estimée à 225 mg EAG/g en polyphénols totaux et à 5.78mg EC/g en flavonoïdes dans l'extrait hydro-acétonique.

L'accomplissement d'une étude toxicologique est une étape importante afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et mieux identifier les sites d'action des substances actives. Les tests d'hémolyse sont réalisés par la méthode spectrophotométrique, *in vitro*, sur des érythrocytes isolés du sang humain et incubés dans un milieu tampon PBS (pH 7,4), en présence des différentes concentrations des extraits et l'huile fixe des feuilles de *L inermis*. Les résultats obtenus montrent que toutes les concentrations testées de l'extrait aqueux ne présentent aucune toxicité vis-à-vis des érythrocytes. Nous avons constaté aussi que cette plante est très faiblement toxique pour les concentrations de 30, 45 et 60mg/mL. Par contre un effet hémolytique élevé est enregistré avec les huiles fixes de Henné comparée au tube de l'hémolyse total.

De façon générale, le Henné est une substance reconnue comme peu ou pas toxique, surtout lors d'application cutanée. L'ensemble des résultats obtenus *in vitro* nous ont permis d'avoir une idée sur les activités biologiques de *Lawsonia inermis*, mais d'autres études plus poussées sont souhaitables.

En perspectives, nous dirons que nos travaux sont une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant :

- ✓ des travaux supplémentaires pour identifier et isoler les composés bioactifs en utilisant plusieurs techniques plus fines (CCM, HPLC...);
- ✓ des études de la cytotoxicité et de la fuite cellulaire, par l'étude de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ,
- ✓ des expériences ultérieures utilisant des extraits purifiés pour identifier et caractériser les composés actifs responsables des activités biologiques ;
- ✓ des études de la toxicité aigüe et chronique, *in vivo*, sur un modèle animal, afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et de mieux identifier les sites d'action des substances actives ;
- ✓ enfin, des études pharmacologiques et toxicologiques à grande échelle sont nécessaires pour la production des molécules naturelles actives et pour une modération de sécurité dans l'utilisation de cette plante.

---

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



- ✓ **Ababsa Z., (2009).** "Caracterisation Pharmacotoxicologique et Etude Phytochimique De Centaurea Dimorpha." Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine **81**: 82..
- ✓ **Abitogun, A., Alademeyin, O., Oleye, D., (2009).** Extraction and characterization of castor seed oil. *Internet J. Nutr. Wellness.*, 8 (2).
- ✓ **Aguilar M., (2007).** H2- Erythrocytes-MB7 : Hématologie H2 – Faculté de Médecine Montpellier- Nimes.
- ✓ **Alain D., (2002).** Guide du traitement des déchets.3 édition. Dunod. Paris
- ✓ **Allali H., Benmehdi H., Dib M.A., Tabti B., Ghalem S., and Benabadji N., (2008):** Phytotherapy of Diabetes in West Algeria. *Asian J Chem*; 20 (04): 2701- 2710.
- ✓ **Ansm., (2014).** Agence Nationale de la Santé et du Médicament. Disponible sur : [ansm.sante.fr](http://ansm.sante.fr), *American-Eurasian J. Agric. & Environ*, 15 (1): 115-121.
- ✓ **Athamena, S., (2010).** "Activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum L.*" *Lebanese science journal* **11**(1): 69-81.
- ✓ **Atmani D., Chaher N., Berboucha M., Ayouni K., Lounis H., Boudaoud H., Debbache N., (2009).** Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chem* 112: 303-309
- ✓ **Aweke G., and Tapapul Lekoyiet S., (2005).** *Lawsonia inermis L.* In: Jansen, P.C.M. & Cardon, D. (Editeurs). PROTA 3: Dyes and tannins/Colorants et tanins. [CD-Rom]. PROTA, Wageningen, Pays Bas.
- ✓ **Azzi R., Djaziri R., Lahfa F., Sekkal F.Z., Benmehdi H., Belkacem N., (2012) .** Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*; 6(10): 2041- 2050.11
- ✓ **Badri B., and Burkinshaw S., (1993).** "Dyeing of wool and nylon 6.6 with henna and lawsone." *Dyes and pigments* **22**(1): 15-25.
- ✓ **Barker R.B., (2000).** Associated with Immune Réponses .In: Schalm's Veterinary Hematology,5 th Edition.
- ✓ **Beaumont C., and Canonne-Hergaux F., (2005).** "Erythrophagocytose et recyclage du fer héminique dans les conditions normales et pathologiques; régulation par l'hepcidine." *Transfusion clinique et biologique* **12**(2): 123-130.
- ✓ **Belyagoubi-Benhamou N., Belyagoubi, L., Bekkara, F., (2014).** Phenolic contents and antioxidant activities *in vitro* of some selected Algerian plants. *Journal of medical plant research*, 8(40), 1198-1207.

## Références bibliographiques

- ✓ **Benjilali B. , (2004).** Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. 17-59.
- ✓ **Benlamdini, N., (2014).** "Étude floristique et ethnobotanique de la flore médicinale du Haut Atlas oriental (Haute Moulouya)." *Journal of Applied Biosciences* **78**(1): 6771-6787.
- ✓ **Bezanger - Beau Quesne L., et Pinkas. M., (1986)** Les plantes dans la thérapeutique moderne 2ème édition MALOINE –Paris. Pp 68-262-268.
- ✓ **Bézanger-Beauquesne L., Pinkas M., Torck M., (1986).** *Les plantes dans la thérapeutique moderne*, 2ème édition révisée, Ed. Maloine éditeur.
- ✓ **Bhuvanewari, K., (2002).** "Inhibitory concentrations of Lawsonia innermis dry powder for urinary pathogens." *Indian journal of pharmacology* **34**(4): 260-263.
- ✓ **Bismuth C., Baud F., Fréjaville P.P., Garnier R., (1987).** Toxicologie clinique. Flammarion Médecine Sciences, Paris, p 956. 1
- ✓ **Bitsindou, M., (1986).** Enquête sur la phytothérapie traditionnelle à Kindamba et Odzala (Congo) et analyse de convergence d'usage des plantes médicinale en Afrique centrale-Mem. Doc (inéd.). Univ. Libre de Bruxelles. 482 pp
- ✓ **Boizot, N., Charpentier, J.P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier *.Le Cahier des Techniques de l'Inra.* pp: 79-82
- ✓ **Bolhaar ST, Mulder M, van Ginkel CJ. (2001).** IgE-mediated allergy to henna. *Allergy*; 56(3): 248.
- ✓ **Borade, A. S., (2011).** "A phytopharmacological review on Lawsonia innermis (Linn.)." *Int J Pharm Life Sci* **2**(1): 536-541.
- ✓ **Botineau. N., (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.
- ✓ **Bruneton J., (1993).** Pharmacognosie – Phytochimie et plantes médicinales. 2ème édition Lavoisier–Paris. pp 363-364-467-474
- ✓ **Cartwright-Jones, C., (2006).** Developing Guidelines on Henna: A Geographical Approach (Masters' dissertation). Masters of Liberal Studies. Kent State University, Kent, Ohio, USA.
- ✓ **Chakou F., Medjoudja K. (2013).** Etude bibliographique sur la phytochimie (mèmoire de licence). Université kasdi merbah, Ouargla.

- ✓ **Chakraborty, D., et Shah B., (2011).** "Antimicrobial, antioxidative and antihemolytic activity of Piper betel leaf extracts." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3(3): 192-199
- ✓ **Chakraborty, T., Poddar, G., Pyrek, J.S., (1982).** Isolation of dihydroxylupene and dihydroxylupane from the bark of *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry* 21, 1814
- ✓ **Chaudhary G., (2010).** "*Lawsonia inermis* Linnaeus: a phytopharmacological review." *Int J Pharm Sci Drug Res* 2(2): 91-98.
- ✓ **Chauhan, H.V., (2011).** *In-vivo* antidiabetic, lipid lowering and antioxidant activities of methanolic extract of *Lawsonia inermis* leaves. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 4,764–767.
- ✓ **Chevallier, A., (2001).** *Encyclopedia des plantes médicinales*. Edit .La rousse, Paris, pp16, 293, 295.
- ✓ **Clément, R. P., (2005).** Aux racines de la phytothérapie: entre tradition et modernité (1ère partie), *Phytothérapie*, 3.
- ✓ **CSST (Commission de la santé et de la sécurité du travail du Québec) (2004).** Notions de toxicologie. Bibliothèque nationale du Québec ; 2ème édition, ISBN.
- ✓ **Debruyne I., (2001).** SOJA: transformation et aspects industriels techniques de l'ingénieur, F6030: P1-12.
- ✓ **Elalaoui R., (2015).** Contribution à la Recherche d'effet hémolytique à partir d'extraits de *Berberis Vulgaris* L. (mémoire de master). Université abou bekr belkaid, Tlemcen.
- ✓ **Enneb H., (2015).** "Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis* L.)." *Journal of New Sciences* 20.
- ✓ **Fagbohoun, L., (2014).** Etude chimique de colorants naturels et matériaux résineux traditionnels au Bénin dans le domaine artisanal. Avignon.
- ✓ **Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 372-379.
- ✓ **Farnsworth N. R., Akerele O., Bingel A. S., Soejarto D. D., Guo Z., 1986-** Places des plantes médicinales dans la thérapeutique. *Bulletin de l'organisation mondiale de la santé*, 64
- ✓ **Festus B., A., V., (2006).** Contribution à l'étude de l'Allo immunisation posttransfusionnelle chez les patients transfusés à Cotonou Bénin Université d'Abomey- Calavi (Bénin) .
- ✓ **Flesch F., (2005).** Intoxications d'origine végétale Plant poisoning F. Flesch (Praticien hospitalier) *Centre antipoison, hôpitaux universitaires de Strasbourg*.
- ✓ **Fort, R. C., (1976).** Adamantane: the chemistry of diamond molecules, Marcel Dekker.

- ✓ **Fournier P., (2001).** Les quatre flores de France. Lachevalier. Paris. Vol II.2.
- ✓ **Frosch, P. et Hausen, B., (1986).** "Allergische Reaktionen vom Soforttyp auf das Haarfarbmittel Henna." *Allergologie* **9**(8): 351.
- ✓ **Ghabrier J. Y., (2010).** Plantes médicinales et formes d'utilisation en phytothérapie. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Henri Poincaré-Nancy1 (France): 165.
- ✓ **Ghédira, K. and Goetz, P., (2017).** "Le henné *Lawsonia inermis* L.(Lythraceae)." *Phytothérapie*, **15**(2): 85.
- ✓ **Gupta A., Saifi A.Q., Modi N.T., and Mishra N., (1986).** Anti-inflammatory activity of some active principles of *Lawsonia inermis* leaves. *Indian Journal of Pharmacology*; **18**(2): 113- 114.
- ✓ **Gupta S., A., M., Alam M., Niwa M. et Sakai T., (1992).** 24,0 ethylcholest-4-en-33-oI from the roots of *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*; **31**: 2558 -2560.
- ✓ **Gupta S., Ali M. et Alamo M.S., (1993).** A naphthoquinone from *lawsonia inermis* stem bark. *Phytochemistry*, **33**: 723-724.
- ✓ **Habibur Rahman, M., Eswaraiah, C. et Dutta, A.M., (2015).** *In-vitro* anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *Oryza sativa*. Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam), *American-Eurasian J. Agric. & Environ*, **15** (1): 115-121
- ✓ **Hamdi, Y., (1997).** "Healing effect of *Lawsonia inermis* L.(henna) as exemplified by the third degree burns." *Revue de Medecines et Pharmacopees Africaines* **11**(12): 151-156.
- ✓ **Hamza N., (2011).** Effets préventif et curatif de trois plantes médicinales utilisées dans la Wilaya de Constantine pour le traitement du diabète de type 2 expérimental induit par le régime « high fat » chez la souris C57BL/6J. Thèse Doctorat en science alimentaire option : Nutrition. Univ. Mentouri Constantine, Institut de Nutrition de l'alimentation et des Technologies agroalimentaires : 32-61.
- ✓ **Hanke, M.E., Talaat, S.M., (1961).** The biochemistry and physiology of henna (*Lawsonia alba*) : its use as a remedy for intestinal amoebiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **55**, 56–62.
- ✓ **Hashim M., Hamza Y.O., Yahia B., Khogali F.M., Sulieman, G.I., (1992).** Poisoning from henna dye and para-phenylenediamine mixtures in children in Khartoum. *Ann Trop Paediat*; **12**(1) : 3-6.
- ✓ **Hennebelle, T., (2004).** "Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif." *Phytothérapie* **2**(1): 3-6.
- ✓ **Hosein, H.K. M., and Zinab D., (2007).** Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Henna Leaves Extracts (*Lawsonia inermis*). *World J Dairy & Food Sci* ; **2**(1): 38-41.

- ✓ **James, O., et Alewo I, M., (2014).** "In vitro antihemolytic activity of *Gymnema sylvestre* extracts against hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induced haemolysis in human erythrocytes." *Am. J. Phytomed. Clin. Ther* **2**: 861-869.
- ✓ **Jocelyne B., 2011-** Les remèdes naturels en complément d'ordonnances allopathiques dans les pathologies ORL et broncho-pulmonaires. *Pharmacien*. p12.
- ✓ **Joy P.P., Thomas J., Mathew S., et Skaria B.P., (2001).** Medicinal Plants. Tropical Horticulture Vol. 2, (eds. Bose, T.K., Kabir, J., Das, P. and Joy, P.P.). *Naya Prokash, Calcutta*, pp. 449-632.
- ✓ **Kahlouche R., (2013).** Evaluation chimique et activite antibacterienne de quelques plantes medicinales d'Algerie.( thèse de doctorat). Universite de constantine 1.
- ✓ **Kandil H.H., Al-Ghanem M.M., Sarwart M.A., al-Thallab F.S., (1996).** Henna (*Lawsonia inermis* Linn.) inducing haemolysis among G6PD-deficient newborns. A new clinical observation. *Ann Trop Paediatr*. 16(4): 287-291.
- ✓ **Kumar, M., Kaur, P., Kumar, S., & Kaur, S. (2015).** Antiproliferative and apoptosisinducingeffects of non-polar fractions from*Lawsoniainermis* L. in cervical (HeLa) cancer cells. *Physiology and MolecularBiology of Plants*, 21(2), 249-260.
- ✓ **Lahsissene, H., (2009).** "Catalogue des plantes medicinales utilisees dans la region de Zaër (Maroc Occidental)." *Lejeunia, Revue de Botanique*.
- ✓ **Larrey D., (1997).** Hepatotoxicity of herbal remedies. *J Hepatol* ; 26 [suppl. 1] : 47-51.
- ✓ **Le Coz CJ., (2001).** Risque des peintures cutanées ou tatouages labiles au « henné noir ». *Rev Fr Allergol Immunol Clin*. 41(5): 504-509.
- ✓ **Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J. et Lee C.Y., (2003).** Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*, 51: 7292-7295.
- ✓ **Loe, G. E., (2017).** "Étude de la toxicité aigue et subaigüe de l'extrait au vin des graines de *Carica papaya* Linn." *Journal of Applied Biosciences* **120**(1): 12077-12085.
- ✓ **Macheix, J.J., Fleuriet, A. et Jay-Allemand, C., (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Ed Presses polytechnologiques et universitaires romandes, 4-5.
- ✓ **Majester-Savornin, B., (1991).** Saponines of the plant. *Hedera helix* and their leishmanicidic activity. *Planta Med*.p 260-262.
- ✓ **Makkar H., Becker K., (1997).** Degradation of quillaja saponins by mixed culture of rumen microbes. *Letters in Applied Microbiology*, 25(4), 243-245.

## Références bibliographiques

- ✓ **Malekzadeh F., (1968).** Activité antimicrobienne de *Lawsonia inermis L.* American Society for Microbiology : 16 (4): 663-634.
- ✓ **Markham K.R., (1982).** Techniques of flavonoid identification. Academic Press, (London): 133.
- ✓ **Mohamed Z., (2008).** Les risques de la phytothérapie, Monographies des plantes toxiques les plus usuelles au Maroc. (Thèse de doctorat). Université Mohamed V-Souissi Rabat.
- ✓ **Mohan C., (2006).** Buffers. A guide for the preparation and use of buffers in biological systems .EMD, San Diego, California, Calbiochem:22.
- ✓ **Mosaid, A.Z., Alferah, A., (2012).** Toxicity induced histological changes in selected organs of male (Wistar) rats by *Lawsonia inermis* leaf extract. Eur. J. Med. Plants 2,151–158.
- ✓ **Munday R, Smith BL, Fowke EA., (1991).** Haemolytic activity and nephrotoxicity of 2-hydro-1,4-naphthoquinone in rats. J Appl Toxicol.11(2): 85-90
- ✓ **Muthu, S., et Duraira B., (2015).** "Inhibitory effect of hydroethanolic extracts of *Annona muricata* on human platelet aggregation and hemolysis *in vitro*." Int J Pharm Pharm Res 2: 207-213.
- ✓ **N'Guessan, K., (2009).** "Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire)." Sciences & Nature 6(1).
- ✓ **Nabavi, S, F., S, M, Nabavi., W, Setzer., S, A, Nabavi., S, A, Nabavi., Ebrahimzadeh M, A., (2013).** "Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits." Fruits 68(3): 185-193.
- ✓ **Oladele A. T., and Adewunmi C.O., (2008).** Medicinal plants used in the management of malaria among the traditional medicine practitioners (T&P'S) in south western Nigeria. Afr J Infect Dis; 2(1): 51-59.
- ✓ **Ouedraogo, Y., (2001).** "Evaluation *in vivo* et *in vitro* de la toxicité des extraits aqueux d'écorces de tige et de racines de *Mitragyna inermis* (Willd.) O." Pharma. Med. Trad. Afr 11: 13-29.
- ✓ **Patrick N S.A.S., (2003).** Intoxications par les végétaux : plantes baies. Éditions Scientifiques et Médicales.
- ✓ **Penchev P.I., (2010).** Etude des procédés d'extraction et de purification des produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de doctorat. Université de Toulouse (France).
- ✓ **Peyrin-Biroulet L., Barraud H., Petit-Laurent F., Ancel D., Watelel J., Chone L., Hudziak H., Bigard M.A, Bronowicki J.P., (2004).** Hépatotoxicité de la phytothérapie :

données cliniques, biologiques, histologiques et mécanismes en cause pour quelques exemples caractéristiques. *Gastroenterol Clin Biol* 28: 540-50.

- ✓ **Rahman, H., M, C, Eswaraiah., Dutta A.M ., (2015).** "In-vitro anti-inflammatory and anti-arthritis activity of *Oryza sativa* var. joha rice (an aromatic indigenous rice of assam)." *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* **15**(1): 115-121.
- ✓ **Rahmoun, N., (2013).** "Antifungal activity of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna)." *Pharmaceutical biology* **51**(1): 131-135.
- ✓ **Rani, A, A., S, M, J, Punitha., Rema M., (2014).** "Anti-inflammatory activity of flower extract of *Cassia auriculata*-an in vitro study." *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.* **4**: 57-60.
- ✓ **Raupp P., Ali Hassan J., Varughese M., Kristiansson B., (2001).** Henna causes life threatening haemolysis in glucose-6- phosphate dehydrogenase deficiency. *Arch Dis Child.* **85**(5): 411-412.
- ✓ **Rolland A., (1988).** Etude pharmacologique et contribution à l'étude botanique et chimique d'*Eschscholtzia californica*, Doctorat de l'université de M et z, mention pharmacognosie, p 441.
- ✓ **Ruckebusch Yves., (1981).** Physiologie, pharmacologie, thérapeutique animales. 2e Edit.
- ✓ **Sanago. R., ( 2006).** Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53
- ✓ **Schauenberg, P et Paris, F., (1997) .** Guide des plantes médicinales : Ed. Delachaux et Niestlé, Paris (396 P).
- ✓ **Sebai, M. and Boudali M., (2012).** "La phytothérapie entre la confiance et méfiance." Mémoire professionnel.
- ✓ **Sellec N., (2012).** Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrethrum L.* Application de l'extrait aqueux à l'inhibition de corrosion d'un acier doux dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5M (thèse de Doctorat). Université abou bekr belkaid. Tlemcen.
- ✓ **Sharma., T.K., Absar, M., (2013).** Toxic effect of neem (*Azadirachta indica*) extracts against the eggs and adults of *Dysderus koenigii* (*Fabricius*).
- ✓ **Shivananda N. B., Isitor. G., Davis. E. M. et Pillai. G. K., (2007).** The Evidence based Wound Healing Activity of *Lawsonia inermis* Linn. *Phytotherapy Research*; **21**, 827— 831.
- ✓ **Shobana, S., et Vidhya R., (2016).** "Evaluation of In Vitro Hemolytic Activity Of Different Parts of *Abutilon indicum* (Linn.)." *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **5**(5): 1182-1196.
- ✓ **Shobana, S., et Vidhya, R., (2016).** Evaluation of *in vitro* hemolytic activity of different parts of *abutilon indicum* (Linn.). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **5**(5): 1182–1196.

- ✓ **Silbergeld, E. K., (2000).** La Toxicologie : Introduction. In *Encyclopédie de Sécurité et de Santé au Travail*. Vol 1 (edited by J. M. Stellman). Organisation Internationale du Travail, Genève. pp 33.2-33.3.
- ✓ **Singh R.P & Kaur G., (2008).** Hemolytic activity of aqueous of *Livistona chinensis* fruits. *Food and chemical Toxicology* ; 46:553-556.
- ✓ **Singh, D. K., (2015).** "Lawsonia inermis L.–A commercially important primaeval dying and medicinal plant with diverse pharmacological activity: A review." *Industrial crops and products* **65**: 269-286.
- ✓ **Situ H., Bobek L.A., (2000).** *In vitro* assessment of antifungal therapeutic potential of salivary histatin-5, two variants of histatin -5, and salivary mucin (MUC7) domain1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(6), p1485-1493.
- ✓ **Smallfield B., (2001).** Introduction to growing herbs for essential oils, medicinal and culinary purposes. *Crop & Food Research* (45): p1-4.
- ✓ **Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J., (2004).** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. **94**: 219-243.
- ✓ **Strang, A., and Wessells M. G., (2006).** A world turned upside down: Social ecological approaches to children in war zones, Kumarian Press.
- ✓ **Strang, H., (2006).** "Victim evaluations of face-to-face restorative justice conferences: A quasi-experimental analysis." *Journal of Social Issues* **62**(2): 281-306. Tfc\_melemekia 20\_09\_2014 Correction.pdf
- ✓ **Thomas L., (2013).** Haemolysis as influence and interference factor. *eJIFCC* vol 13 no 4.
- ✓ **Tron I., Piquet O., Baert A., (2002).** Toxon : manuel de toxicologie, Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie : 32-34 ; 26-27.
- ✓ **Trop, M., (2011).** "Ingestion volontaire de décoction de henné (*Lawsonia inermis*) à l'origine d'une anémie hémolytique chez une patiente atteinte d'un déficit en G6PD." *Médecine Tropicale* **71**(3): 292-294.
- ✓ **Uma, D., (2010).** "Optimization of extraction parameters of total phenolic compounds from henna (*Lawsonia inermis*) leaves." *Sains Malaysiana* **39**(1): 119-128.
- ✓ **Upton T.M., Grayer R.J., Greenham J.R., Williams C.A., Al-ghamdi F., Chen F- II., (2000).** Leaf flavonoides as systematic characters in the *Genera lavandula* and *Sabaudia*. *Biochemical systematic and ecology*; 28,99 1-1007.
- ✓ **Verykokidou Vand Voyo, E.C., (1986).** Methylated flavones from *teucriumplolium*. *Plantamedica*, 5,343-432



- ✓ -Wang L., and Weller C.L., (2006). Recent advances in extraction of *nutraceuticals* from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6) : 300-312.
- ✓ Wichtl M., (1999). Plantes thérapeutiques: Tradition, pratique officinale. Science et thérapeutique 3ème édition. Edition française par Robert Anton. *Technique et documentation*.p: 262-264.
- ✓ Wyllie M.G., (2006). A groundswell for phytotherapy. *BJU International*, 97, pp.1345-1346.
- ✓ Zhang M., Wang A., Xia T., He P., (2008). Effects of fluoride on DNA damageS-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-KB in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett.* ; 179:1-5.

---

# **ANNEXE**

---

- **Le phosphate de tampon Salin**

Souvent abrégé en PBS, qui signifie une solution saline tamponnée au phosphate. C'est un tampon couramment utilisé en biochimie.

Il s'agit d'un soluté physiologique qui contient du chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium.

**Préparation :**

1 litre de PBS (pH=7.4) est préparé de la manière suivante :

1. A 800 mL d'eau distillée.
2. Ajouter 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, puis 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0,24 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
3. Ajuster le pH à 7,4 avec du HCl.
4. Ajouter de l'eau distillée pour avoir un volume final de 1 litre.
5. Répartir la solution en aliquotes et stériliser à l'autoclave durant 20 min à 121°C et les conserver à température ambiante.