

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche

Scientifique

Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physicochimie, synthèse et activité biologique

Département de Biologie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de

Master

En Sciences Biologiques

Option : Biochimie

Thème

Etude de l'activité antioxydante et l'effet hémolytique d'extraits des feuilles de *Lawsonia inermis*

Soutenu le : 25/06/2020

Préparé par : **ABOURA Fatima Zohra**

Président :	AZZI R.	MCA	Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen
Examinatrice :	MEZOUAR D.	MCB	Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen
Encadrant :	RAHMOUN M.N.	MCA	Univ. Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier celui qui m'a créé, protégé, aidé et qui m'a donné entre bien d'autres, la patience et le courage pour accomplir mon mémoire de Master dans les meilleures conditions en disant « **Dieu Merci** ».

Ce mémoire n'aurait jamais été entrepris ni achevé sans les savants conseils et orientations, les méticuleux contrôles et suivis, que m'a prodigué mon promoteur, Dr. RAHMOUN Mohammed Nadjib Maître de conférences à l'université de Tlemcen. Je lui témoigne ici, toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Je tiens à remercier Dr. AZZI Rachid Maître de conférences à l'université de Tlemcen, pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury de ce travail.

Je remercie aussi Dr. MEZOUAR Dounia Maître de conférences à l'université de Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes remerciements à tous mes enseignants durant mon cursus universitaire en particulier M^{me} BOUCHERIT Zahia, et M^{me} TABETI et M^{me} SAKER Meriem pour leurs aides, leurs conseils et pour le temps qu'ils ont bien voulu nous consacrer.

Je tiens à remercier le doctorant monsieur AISSAOUI Mohammed pour ses conseils, et pour tous les moments agréables, de joie et de rigolade, que nous avons passés ensemble au laboratoire. Je remercie aussi Mr ARBAOUI younes qui nous a fourni la plante et notre technicienne BENLEDGHEM Rachida pour tous ces efforts.

Je remercie très chaleureusement ma famille qui m'a soutenue, durant toutes mes années d'études. Je les remercie infiniment pour leur encouragement et leur confiance. Sachez que je serai éternellement reconnaissante.

Je remercie tous ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour.

Que dieu vous bénisse...

Dédicace

À mes parents

À mes sœurs et frères

À mes adorables neveux, nièce « Anis, Akram et
Lina »

A mes très cher(e)s ami(e)s de coeurs

À tous ceux et celles qui me sont chers

À toutes les mains qui m'ont été tendues

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de
bonheur, de santé et de réussite

Je vous adore ...

Liste des tableaux

Tableau 01	: Classification botanique de la plante <i>L. inermis</i>	12
Tableau 02	: Caractéristiques des extraits des feuilles de la plante <i>L. inermis</i>	30
Tableau 03	: Les taux des composées phénoliques des feuilles de la plantes <i>L. inermis</i>	34
Tableau 04	: CI_{50} du BHA et des deux extraits de <i>L. inermis</i>	36
Tableau 05	: Capacité antioxydante totale des deux extraits de la partie aérienne de la plante <i>L. inermis</i>	36
Tableau 06	: CI_{50} du BHA et des deux extraits de <i>L. inermis</i>	39
Tableau 07	: EC_{50} du BHA et des deux extraits de <i>L. inermis</i>	40

Liste des figures

Figure 01	: Origine extra / intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène	07
Figure 02	: la plante entière de <i>Lawsonia inermis</i>	13
Figure 03	: Les feuilles de <i>Lawsonia inermis</i>	13
Figure 04	: fleurs de <i>Lawsonia inermis</i>	14
Figure 05	: schéma de fleur <i>Lawsonia inermis</i>	14
Figure 06	: fruit de <i>Lawsonia inermis</i>	15
Figure 07	: quelques constituants chimiques du henné	16
Figure 08	: Les feuilles de la plante <i>L. inermis</i> : A sous formes séchées, B broyées	20
Figure 09	: Réduction du fer ferrique Fe ³⁺ en fer ferreux Fe ²⁺	24
Figure 10	: Schéma de la réaction du DPPH en présence d'un antioxydant	25
Figure 11	: formation du radical-cation ABTS ⁺ à partir de l'ABTS et en présence d'oxydant persulfate de potassium	26
Figure 12	: Rendements des deux extraits de la plante <i>L. inermis</i>	30
Figure 13	: La courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols	32
Figure 14	: La courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes	33
Figure 15	: La courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tannins condensés	33
Figure 16	: Evolution des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations de BHA et de l'acide ascorbique	35
Figure 17	: Evolution des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits de la plante <i>L. inermis</i>	35
Figure 18	: Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydant total de l'acide ascorbique	37
Figure 19	: Evolution des pourcentages d'inhibition de l'ABTS en fonction des concentrations de BHA et BHT	38
Figure 20	: Pourcentage d'inhibition du radical cationique ABTS en fonction des concentrations des extraits de la plante <i>L. inermis</i>	38
Figure 21	: Evolution du pouvoir réducteur du fer des antioxydants BHA et l'acide ascorbique	40
Figure 22	: Evolution des absorbances du fer réduit en fonction des concentrations des extraits de <i>L. inermis</i>	40
Figure 23	: Effet de différentes concentrations de l'extrait hydro-méthanol sur l'hémolyse des globules rouges	41
Figure 24	: Effet de différentes concentrations de l'extrait dichlorométhane sur l'hémolyse des globules rouges	42

Liste des abréviations

ABTS	: acide 2,2 azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
ADN	: Acide désoxyribonucléique
BHA	: Hydroxyanisolbutylé
BHT	: Hydroxytuluènebutylé
CUPRAC	: Capacité antioxydante par réduction du cuivre
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DPPH	: 2,2 DiPhenyl-1-Picryl-Hydrazyl
EC50	: Concentration efficace
ERN	: les espèces réactives d'azote
ERO	: les espèces réactives de l'oxygène
Fe²⁺	: fer ferreux
Fe³⁺	: fer ferrique
FRAP	: Ferric Reducing -Antioxidant Power
GR	: Globule rouge
GPx	: glutathion peroxydase
GSSG	: bisulfure de glutathion
Hb	: Hémoglobine
H₂O₂	: le peroxyde d'hydrogène
CI50	: concentration inhibitrice a 50%
NO·	: Monoxyde d'azote
NOS	: oxyde nitrique synthétase
O₂⁻	: Radical anion superoxyde
OH	: radicale hydroxyle
ONOO⁻	: Anion Peroxynitrite
ORAC	: Capacité d'Absorbance du Radical de l'Oxygène
ROOH	: peroxyde lipidique
SOD	: Superoxyde dismutase
TAC	: Capacité antioxydante totale
TRAP	: Paramètre du Piégeage du Radical Total

Table des matières

Introduction	02
Synthèse bibliographique	03
I- Phytothérapie et les métabolites secondaires	04
II- Les radicaux libres et stress oxydatif	06
III- Etude de la toxicité des plantes	09
IV- Plante d'étude <i>Lawsonia inermis</i>	11
Matériel et méthodes	19
1. Matériel	20
1.1. Matériel végétal	20
1.2. Globule Rouge	20
2. Méthodes	21
2.1. Préparation des extraits	21
2.2. Calcul des rendements	21
3. Analyse quantitative des composés phénoliques	21
3.1. Dosage des polyphénols totaux	21
3.2. Dosage des flavonoïdes totaux	22
3.3. Dosage des tanins condensés	23
4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits	23
4.1. Pouvoir réducteur du fer par FRAP	23
4.2. Piégeage du radical libre DPPH	24
4.3. Capacité antioxydante totale	26
4.4. Réduction du radical-cation ABTS	26
5. Evaluation de l'activité hémolytique	27
5.1. Test d'hémolyse	27
Résultat et interprétation	29
1.1. Les rendements	30
2. Les composés phénoliques	31
2.1. Dosage des polyphénols totaux	31
2.2. Dosage des flavonoïdes totaux	32
2.3. Dosage des tanins condensés	33
3. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits	34
3.1. Piégeage du radical libre DPPH	34
3.2. Capacité antioxydante totale	36
3.3. Réduction du radical-cation ABTS	37
3.4. Pouvoir réducteur du fer par FRAP	39
4. Evaluation de l'activité hémolytique	41
Discussion	43
Conclusion et perspectives	49
Référence bibliographique	

الملخص

(*Lawsonia inermis* (Lythraceae))، المعروفة باسم الحناء ، هي واحدة من أقدم النباتات المستخدمة لصنع أجزاء مختلفة من الجسم وشفاء العديد من الأمراض. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة والتأثير الانحلالي لمستخلصات الميثانول المائي وثنائي كلورو ميثان من أوراق *Lawsonia inermis*.

تم حساب كمية المركبات الفينولية بواسطة طريقة فولين سيوكالتيو، ثلاثي كلوريد الألومنيوم والفانيلين على التوالي. تم تحديد النشاط المضاد للأكسدة من خلال طريقة تثبيط ABTS، DPPH، إجمالي قدرة مضادات الأكسدة (CAT) والقدرة لإرجاع الحديد (FRAP). تم البحث عن دراسة التأثير الانحلالي باستعمال خلايا الدم الحمراء البشرية.

تم الحصول على أفضل مردود بواسطة مستخلص الميثانول المائي. أظهر هذا الأخير أعلى مستوى من البوليفينول $117,61 \pm 11,65$ مغ معادل لحمض الغاليك/ مع مستخلص. بينما يحتوي مستخلص ثنائي كلورو ميثان على مستوى أعلى من مركبات الفلافونويد $350,43 \pm 10,71$ ميكروغرام معادل للكارسيتين/ مغ المستخلص و التانين المكثف $67,23 \pm 27,43$

تم الحصول على أفضل الأنشطة المضادة للأكسدة مع مستخلص الميثانول المائي لإرجاع DPPH و ABTS. $0,27 \pm 0,025$ مغ / مل و $0,014 \pm 0,01$ مغ / مل، على التوالي. أظهر هذا المستخلص نفسه أعلى سعة المضادة للأكسدة، $20,06 \pm 0,96$ معادل حمض الاسكوربيك / غرام المستخلص ، وقوة إرجاع الحديد EC50 بالغة $1,29 \pm 0,04$ مغ / مل. تم الاستنتاج أنه يتأثر النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص الميثانول بقوة بمحتوى البوليفينول.

لم يظهر اختبار انحلال الدم للمستخلصين أي سمية انحلالية ملحوظة بعد 60 دقيقة من الحضنة.

الكلمات المفتاحية: *Lawsonia inermis*، المركبات الفينولية، النشاطات مضاد للأكسدة، التأثير الانحلالي

Résumé

Lawsonia inermis (Lythraceae) appelée communément le henné, est l'une des espèces les plus anciennement utilisées pour teindre les différentes parties du corps et pour guérir contre plusieurs affections. L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité antioxydante et de l'effet hémolytique des extraits hydro-méthanol et dichlorométhane des feuilles de *Lawsonia inermis*.

Le dosage des composés phénoliques a été réalisé par la méthode de follin-ciocalteu, le trichlorure d'aluminium et la vanilline respectivement. La détermination de l'activité antioxydante a été effectuée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH, ABTS, la capacité antioxydante totale (CAT) et le pouvoir réducteur du fer (FRAP). L'étude de l'effet hémolytique a été recherchée vis-à-vis des globules rouges humain.

Le meilleur rendement a été obtenu par l'extrait hydro-méthanol. Ce dernier a révélé le taux le plus élevé en polyphénols $117,61 \pm 11,65 \mu\text{g EAG/mg E}$ tandis que l'extrait dichlorométhane contenait un taux plus élevé en flavonoïdes $350,43 \pm 10,71 \mu\text{g EQ/mg E}$ et en tanins condensés $67,23 \pm 27,43 \mu\text{g EC/mg E}$.

Les meilleures activités antioxydantes ont été obtenues par l'extrait hydro-méthanol. Les CI_{50} pour le piégeage du DPPH et l'ABTS sont respectivement $0,27 \pm 0,025 \text{ mg/mL}$ et $0,014 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$. Ce même extrait a montré la capacité antioxydante totale, $20,06 \pm 0,96 \text{ EAA mg/g E}$, et le pouvoir réducteur du fer EC_{50} de $1,29 \pm 0,04 \text{ mg/mL}$ les plus élevés. L'activité antioxydante de l'extrait hydro-méthanol est fortement influencée par le contenu en polyphénols.

Le test d'hémolyse des deux extraits ne montre aucune toxicité hémolytique notable après 60 minutes d'incubation.

Mots clés : *Lawsonia inermis*, composés phénoliques, Activité antioxydante, effet hémolytique

Abstract

Lawsonia inermis, (Lythraceae) commonly known as henna, is one of the most ancient species to dye different parts of the body and to heal against several ailments. The objective of this study is to evaluate the antioxidant activity and the hemolytic effect of leaves extracts of *Lawsonia inermis*.

Phenolic compounds dosage was carried out by the follin-ciocalteu method, aluminum trichloride and vanillin respectively. The antioxidant activities were determined by the method of free radical DPPH scavenging, ABTs, the total antioxidant capacity (CAT) and the iron reducing power (FRAP). The study of the hemolytic effect was performed on human red blood cells. The hydro-methanol extract revealed the highest level of polyphenols $117,61 \pm 11,65 \mu\text{g AGE/ mg E}$ while the dichloromethane extract contained a higher level of flavonoids $350,43 \pm 10,71 \mu\text{g EQ / mg E}$ and in condensed tannins $67,23 \pm 27,43 \mu\text{g CE / mg E}$.

The best antioxidant activities have been obtained with the hydro-methanol extract. The CI50 for scavenging DPPH and ABTS are $0,27 \pm 0,025 \text{ mg / mL}$ and $0,014 \pm 0,01 \text{ mg / mL}$, respectively. This same extract showed the highest total antioxidant capacity $20,06 \pm 0,96 \text{ EAA mg/ g E}$, and the iron reducing power EC50 of $1,29 \pm 0,04 \text{ mg/ mL}$. The antioxidant activity of the hydro-methanol extract is strongly influenced by the polyphenol content.

The hemolytic test of the two extracts did not show any remarkable hemolytic toxicity after 60 minutes of incubation.

Keywords: *Lawsonia inermis*, phenolic compounds, antioxidant activity, hemolytic effect

INTRODUCTION

Malgré les progrès réalisés en médecine, l'homme continu à avoir recours aux plantes pour se soigner et il est actuellement clair que le bon usage de la phytothérapie offre de nouvelles perspectives et des avantages dont les médicaments de synthèse sont parfois dépourvus **(Maqtar, 2014)**.

D'après l'OMS 80% de la population du monde ont recours à l'usage des plantes médicinales, parce qu'elles contiennent des substances chimiques (alcaloïdes, composés phénoliques et les terpénoïdes...) qui ont montré des activités remarquables telles que l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoires, antioxydants, anticancéreuses ...etc. **(OMS., 2008)**.

La flore de l'Algérie est riche et variée en plantes médicinales, mais elle demeure très peu exploitée scientifiquement. Le henné est une plante qui fait partie de la flore algérienne. Connue sous le nom scientifique *Lawsonia inermis* (L.), le henné est une espèce monotypique du genre *Lawsonia* (famille : Lythraceae) qui a été largement utilisée pour embellir la peau, les cheveux, les ongles, le cuir, la soie et la laine dans toutes les régions du monde lors des fêtes et de célébrations traditionnelles et religieuses **(Ashnagar, 2011)**.

Outre les usages cosmétiques, les fleurs et les feuilles du henné ont été utilisées depuis très longtemps pour leurs différentes applications thérapeutiques dans le traitement des convulsions, de la jaunisse et des ulcères malins **(Jeyaseelan et al., 2012)**. Selon plusieurs auteurs, le henné s'est révélé être un antibactérien à large spectre puissant ainsi qu'un agent antifongique très efficace **(Jeyaseelan et al., 2012 ; Rahmoun et al., 2013a, b)**. En plus, des activités analgésique, anthelminthique, antiparasitaire, anti-inflammatoire, anticancéreuse, hépato protectrice, tuberculostatique, et antivirale ont été rapportées pour cette même plante **(Mohsin ; et al., 1989 ; Okpekon et al., 2004 ; Sarojini et al., 2012 ; Maqtar, 2014)**.

La présence des métabolites secondaires de différentes natures soutient ses diverses activités biologiques et les informations disponibles sur les investigations chimiques indiquent qu'elle est riche en composés phénoliques et en naphthoquinones tels que la LAWSONE, p-coumaricacid et Luteolin-7-glucosides **(Ashnagar, 2011)**.

Cependant, comme toute culture, des variations des composants chimiques sont possibles en raison de l'influence des facteurs environnementaux et géographiques. À l'heure actuelle, il n'y a pas de d'étude bien approfondi sur la composition chimique exacte du henné de notre flore. Encore plus certains rapports indiquent que l'usage du henné peut provoquer des allergies et des hémolyses **(Kumar et al., 2014)**,

Dans ce contexte, le présent travail se focalise sur l'étude de l'activité antioxydante et l'effet hémolytique d'extraits des feuilles de *Lawsonia inermis* de la région de d'Adrar (Algérie).

Synthèse bibliographique

I- Phytothérapie et métabolites secondaires

La phytothérapie est un mot grec composé de « Phyton » qui signifie plante, et « Therapeia » qui signifie traitement. C'est la plus ancienne médecine du monde basée sur des anciennes connaissances des plantes et leurs vertus. Elle se définit par l'utilisation des plantes dites médicinales, dont une ou plusieurs parties contiennent des substances agissant sur une ou plusieurs pathologies ou symptômes dans un objectif de traiter ou de soulager certaines maladies et/ou troubles (**Bellamine, 2017 ; Derbré, 2019**).

Actuellement deux types de phytothérapies sont à distinguer : la première est une pratique traditionnelle basée sur l'utilisation des plantes médicinales selon les vertus découvertes empiriquement ; celle-ci est encore employée massivement dans certains pays du monde, surtout ceux en voie de développement où c'est parfois le seul recours thérapeutique accessible (**Mady, 2016**). La deuxième est la pharmacognosie, une pratique basée sur les avancées et les preuves scientifiques recherchant les extraits actifs des plantes qui, une fois identifiés sont standardisés (**Philibert et al., 2005**).

Les plantes médicinales sont composées de plusieurs substances dits « métabolites secondaire ». Ces métabolites secondaires appartiennent à différents groupes de structures chimiques variés (**Macheix et al., 2005 ; Edeas, 2007 ; Djeridane, 2008**). Ils ne sont pas synthétisés directement lors de la photosynthèse mais via des réactions chimiques faisant parties du métabolisme secondaire (**Kechida et Meghiche, 2019**).

Ces métabolites sont classés en trois grandes catégories : les composés phénoliques, les composés azotés et les terpènes (**Hartmann., 2007 ; Benhamama, 2015**).

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui constituent la classe la plus importante chez les végétaux. Ils sont présents dans toutes les parties de la plante (tiges, fleurs, feuilles racines). Ils se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs cycle(s) benzénique(s) et un ou plusieurs fonction(s) hydroxyle(s) (**Macheix et al., 2005 ; Yusuf, 2006**). Ces composés phénoliques sont impliqués dans plusieurs processus physiologiques tel que l'organogénèse, rhizogénèse, croissance cellulaire, maturations des fruits ou la germination des grains, tubérisation... (**Crozier et al., 2006 ; Hamhami, 2013**).

Les sous classes des composés phénoliques sont les phénols simples (C_6), acides hydroxybenzoïques (C_6-C_1), acides hydroxy-cinnamiques (C_6-C_3), coumarines (C_6-C_3), naphthoquinones (C_6-C_4), stilbénoides ($C_6-C_2-C_6$), flavonoïdes, isoflavonoïdes, anthocyanes ($C_6-C_3-C_6$), lignanes (C_6-C_3)₂, lignines (C_6-C_3)_n et tanins ($C_6-C_3-C_6$)_n. Ces structures peuvent

également être acylés ou glycolyses, ce qui donne une grande variété de structures (**Lugasi et al., 2003; Bruneton, 2009**).

Les acides phénoliques sont caractérisés par la présence d'un groupement carboxylique fonctionnel. Ils se divisent en 2 classes : l'acide hydroxy-cinnamique, et l'acide hydroxybenzoïque (**Bruneton, 2009**). Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, cyringiques, salicyliques, o-hydroxybenzoïques et gentisiques (**Chouikh et al., 2018**). Ces acides possèdent une structure du type C6-C3. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide fertarique et l'acide sinapique.

Les flavonoïdes constituent les pigments qui sont responsables de la coloration des différents organes (Feuilles, fleurs et fruits) (**Havasteen, 2002**). Ainsi qu'ils sont divisés en plusieurs classes : flavone, flaval-3-ols, flavonol, isoflavones, anthocyanidins, flavonones (les flavones et les flavonols sont les plus répandus) (**Sarmi et Cheymer., 2006**). Les flavonoïdes se trouvent généralement dans les légumes, les fleurs, les noix, le miel, les fruits... (**Ahmed et al., 2015**). Les tanins par contre, sont des structures complexes formées d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation. Ils peuvent être divisés en deux groupes : tanins hydrosolubles, et tanins condensés (non hydrosoluble) (**Merghem, 2009 ; Sahpaz, 2013**).

La deuxième classe des métabolites secondaires représente les alcaloïdes. Ce sont des substances naturelles azotées et basiques, le plus souvent végétales. Ils sont dotés des différentes propriétés biologiques : anticancéreuse, anesthésique locaux, antimicrobienne, antioxydante (**Charpentier et al., 2008 ; Bruneton, 2009 ; Roué, 2011**). Les alcaloïdes se subdivisent en 3 classes : les alcaloïdes vrais, les proto-alcaloïdes, et les pseudo-alcaloïdes (**Badiaga, 2011**).

La troisième classe des métabolites secondaires sont les terpènes. Ce sont les principaux constituants des huiles essentielles, des résines et des cires de nombreuses plantes. C'est une classe de composés naturels composée de motifs d'isoprène, une unité à 5 carbones. Les terpènes sont en outre classés en fonction du nombre d'atomes de carbone ou le nombre d'unités isoprène dans leurs structures chimiques. Les composés terpénoïdes constituent une classe importante des métabolites secondaires aromatiques, non cycliques, qui sont responsables de l'odeur de plusieurs fleurs, grain, fruits, bois, feuilles, et racines (**Ronald et Jackson, 2014**). Ce sont des hydrocarbures naturels à chaîne ouverte ou à structure cyclique (**Hellal, 2011 ; Soualeh et soulimani, 2016**).

II- Les radicaux libres et stress oxydatif

Les radicaux libres sont des composés présents dans notre organisme sous forme ubiquitaire et sont obtenus à partir des processus physiologiques telles que les réponses inflammatoires. Les radicaux libres sont des molécules ou atomes (espèces chimiques) instables, qui possèdent un (ou plusieurs) électron célibataire (sur la couche périphérique), non apparié (**Carriere *et al.*, 2006 ; Mac Laren, 2007**). Cette caractéristique les confère une grande réactivité (demi vie courte), et une capacité à participer dans des phénomènes de réaction en chaîne soit par oxydation (perte un électron), soit par réduction (gain un autre électron) (**Koechlin-Ramonatx, 2006**). Ils sont des entités chimiques qui regroupent les espèces réactives de l'oxygène ERO (issues de l'oxygène moléculaire) et les espèces réactives d'azote ERN (regroupent le monoxyde d'azote ($\text{NO}\cdot$), peroxynitrite ($\text{ONOO}\cdot$), et le dioxyde d'azote ($\text{NO}_2\cdot$) ... (**Halliwell et Whiteman, 2004 ; Goyindarjin *et al.*, 2005 ; Merabet, 2018**).

Chez les êtres vivants, la balance entre la production des oxydants et les antioxydants (anti/pro-oxydant) est dans un état normal et équilibrée (**Davies., 2000 ; Finkel and Holbrook, 2000**). Cependant, cette balance peut subir un déséquilibre et nous parlons alors de stress oxydatif et conduit à une agression des cellules par le surplus en radicaux libres (**Ratnam *et al.*, 2006 ; Reuter *et al.*, 2010**).

Selon, **Sies, (1991)**, le stress oxydatif (SO) est défini comme l'incapacité de l'organisme à se défendre contre l'agression des espèces réactives d'oxygène (ERO), suite à une perturbation liée : soit à une diminution des capacités de défense antioxydante, soit à une production accrue d'espèce réactif d'oxygène ERO (**Sies, 1991 ; Barger, 2006 ; Haleng *et al.*, 2007**).

Le stress oxydatif n'est pas une maladie mais plutôt un mécanisme physiopathologie, à diverses origines parmi l'inflammation, ou l'exposition environnementale a des facteurs pro-oxydants (médicaments, pollution, rayons ultraviolets, alcool, tabac ...) (**figure : 01**) (**Favier, 2003 ; Magder, 2006**).

C'est la principale cause de l'apparition de nombreuses maladies plurifactorielles telles que rhumatisme, le diabète, le cancer, l'Alzheimer, l'arthrose, le syndrome de détresse respiratoire aigüe, les maladies cardiovasculaires, l'œdème pulmonaire, le vieillissement accéléré... (**Favier., 2003 ; Afonso *et al.*, 2007 ; Valko *et al.*, 2007**).

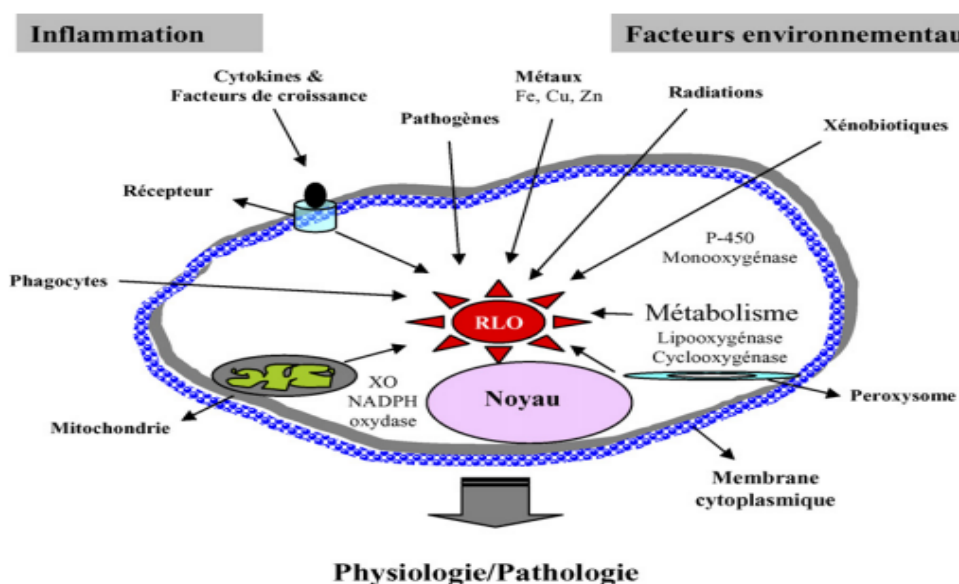


Figure 01 : Origine extra / intracellulaire des radicaux libres dérivés de l'oxygène (Afons *et al.*, 2007)

Une production élevée des EROs provoque des dommages cellulaires. Ceci a conduit certains auteurs comme **Favier, (2006)** ; **Valko *et al.*, (2007)** ou encore **Tissier, (2011)** à faire un lien entre la dose du stress oxydatif et les dommages cellulaires causés :

- Un stress oxydatif léger induit une prolifération cellulaire
- Un stress oxydatif moyen induit une apoptose cellulaire
- Un stress oxydatif fort entraîne une nécrose cellulaire
- Enfin un stress oxydatif majeur induit des modifications membranaires sont à l'origine de la lyse cellulaire telle que l'oxydation de l'ADN, protéine, et peroxydation des lipides.

Dans l'organisme la neutralisation des radicaux libres se fait par des composés appelés les antioxydants. Ce sont des substances qui inhibent ou préviennent l'oxydation d'un substrat, en empêchant ou éliminant la formation des radicaux libres et atténuant le stress oxydatif pour une protection efficace (**Kim et Lee, 2004**). Parmi les nombreuses stratégies antioxydantes utilisées par les cellules pour contrôler les niveaux des ERO, il y a les défenses enzymatiques et les défenses non enzymatiques

Le système de défense enzymatique représente une barrière d'antioxydants endogènes produits par l'organisme. Ces enzymes, qui jouent un rôle important dans le maintien de la santé, et la protection des dommages, sont la superoxyde dismutase SOD, glutathion

peroxydase GPx, catalase, hème oxygénase, le couple thiorédoxine/thiorédoxine réductase, acide urique, ubiquinone, les polyphénols ...) (**Baba et Mcgrath, 2008**).

Les antioxydants non enzymatiques sont des antioxydants exogènes fournis par l'alimentation dont nous citons la vitamines E (tocophérol), C (ascorbate), Q (ubiquinone) et les caroténoïdes, bilirubine, acide urique, Ces antioxydants agissent en piégeant les radicaux et en captant l'électron célibataire, les transformant en molécules ou ions stables (**Kinsky, 1989**). Les vitamines piégeuses vont devenir des radicaux, puis seront soit détruites, soit régénérées par un autre système. Ainsi, la vitamine E est régénérée par la vitamine C qui est elle-même régénérée par des enzymes, les ascorbates réductases (**Kumar et al., 2010**).

D'autres composés alimentaires peuvent aussi avoir ce comportement : polyphénols, alcaloïdes, phytates (composés phosphorés). En plus, les cellules peuvent synthétiser des composés jouant le même rôle, le plus important est le glutathion réduit qui protège non seulement contre les radicaux oxygénés, mais aussi contre les peroxydes ou le NO•. D'autres composés endogènes jouent un rôle sans doute important mais encore mal évalué : les théodoriens, les glucagonomes, les métallothionéines, l'acide lipoïque ou les polyamines (**Stahl et Sies, 2002 ; Ahame, 2003**).

Maîtriser l'oxydation est indispensable pour gérer l'évolution des systèmes biologiques dans leur complexité, en particulier dans le cas des aliments dont la dégradation peut avoir des conséquences en sécurité alimentaire. Les différentes méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante sont présentées après examen du contexte et des mécanismes d'oxydation. L'activité antioxydante est évaluée soit par le dosage des produits formés (en particulier des hydroperoxydes) par des techniques photométriques plus ou moins directes, soit par la mesure de l'efficacité du composé à piéger des radicaux libres. Les méthodes comparant le piégeage d'un additif avec celui d'un antioxydant de référence, par exemple le Trolox®, sont applicables à des produits variés quelle que soit l'hydrophilie ou l'hydrophobie du milieu (**Francoise, 2004**).

Il existe plusieurs méthodes in vitro qui sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante d'un extrait ou d'une substance. Parmi ces méthodes nous citons le : Follin-Ciocalteu (basée sur le transfert d'électron) (**Huage et al., 2005 ; Prior et al., 2005**), capacité antioxydante totale (basée sur la réduction de molybdène Mo⁶⁺) (**Prieto et al., 1999**), pouvoir Réducteur du fer par FRAP (basé sur le transfert d'un électron), capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) (basée sur le transfert d'électron), réduction du radical-cation (ABTS) (basée sur le transfert d'électron et d'un proton (**Prior et al., 2005**), test de blanchissement du bêta carotène (basée sur la neutralisation des radicaux libres dérivées de l'acide linoléique en

présence d'un antioxydant (**kubola et Siriamornpun, 2008**), Capacité d'Absorbance du Radical de l'Oxygène (basée sur transfert d'un proton) (**Crichton et al., 2002**), paramètre du Piégeage du Radical Total (basée sur la protection fournis par les antioxydants sur la diminution de la fluorescence de la R-PE (R-phycoérythrine) au cours de la réaction de la peroxydation contrôlée (**Nur Alam et al., 2013**).

III- Etude de la toxicité des plantes

Les plantes contiennent une multitude de composés qui peuvent agir comme toxique et peuvent être nuisibles et dangereuses pour la santé de l'organisme vivant. La pénétration de ces composés dans l'organisme peut provoquer des troubles plus au moins graves et parfois mortels (**Viala, 2005 ; Estelle, 2009**). C'est pour cette raison, l'intérêt de l'usage des plantes exige qu'une approche de sa toxicité puisse être entreprise en vue de son adaptation en tradithérapie.

La pénétration d'une substance dans l'organisme peut être bénéfique comme les médicaments ou néfaste comme un toxique. La réponse de l'organisme à un toxique dépend de la quantité de cette substance toxique présente dans une cellule ou tissu ou organe qui se fixe sur le site d'action. Et dépend aussi de son affinité pour ce site. Plusieurs facteurs interviennent dans le processus d'action toxique (**Baynes et Hodgson., 2010**).

Selon l'administration ou la durée d'exposition du toxique on peut distinguer divers types de toxicité (**Alain., 2002**) : Toxicité aiguë et Toxicité à terme (subaiguë et zchronique) (**Bismuth et al., 1987**).

La toxicité aiguë se définit comme la toxicité qui provoque des troubles graves ou la mort après un court délai de son exposition de l'organisme (immédiatement ou dans les premiers jours après l'exposition) (**Leblanc, 2010**). Elle se détermine généralement en mesurant la dose létale DL50/ DL100, qui représentent les doses létales d'un composé qui provoquent la mort de 50/ 100% de la population d'animaux d'essai. Ces deux valeurs permettent la détermination du degré de toxicité (**Bonvalot, 2002 ; Wallace et Hayes, 2008**).

La toxicité des plantes médicinales peut être expliquée par la toxicité intrinsèque des constituants, l'identification imprécise des composants, les altérations avec d'autres composants chimiques ou les contaminants toxiques (tels les pesticides et les métaux lourds, ainsi que des pollens, des champignons microscopiques ...)

Les plantes sont malheureusement pourvues de composés souvent mal définis, est sont formées de molécules dotées d'une activité biologique notoire, entre autres des hétérosides, des alcaloïdes, des anthocyanes, des tannins et des stéroïdes. C'est pour cette raison la

recherche de la toxicité des plantes médicinales est une étape importante dans le processus la valorisation **(Leblanc, 2010)**.

En considérant l'utilisation de ces extraits de plantes en médecine humaine, il apparaît indispensable de procéder à la détermination de leur pouvoir hémolytique et néphrotoxique et les précautions à observer de l'usage d'une plante médicinale pour une adaptation rationnelle de la tradithérapie surtout pour les modes d'administration en cas de non intégrité au niveau des muqueuses digestives (bouche, estomac, intestin, etc.) **(Ouedraogo, 2001)**.

Le sang est un fluide qui a un rôle important dans le transport de l'oxygène et les nutriments vers les tissus biologiques. Ces principales cellules sont les globules rouges (ou les érythrocytes, qui occupent environ 99% des cellules du sang), les plaquettes (ou les thrombocytes, occupent entre 0,6 à 1% des cellules du sang), et les globules blancs (ou les leucocytes, occupent environ 0,2% des cellules du sang) **(Hoffman, 2008)**.

L'hémolyse est un mot qui signifie la perturbation des globules rouges (Hémo : sang, Lyse : perturbation). C'est un phénomène physiologique de toxicité irréversible au cours duquel les érythrocytes sont détruits en libérant leur hémoglobine dans le milieu extérieur **(Aguilar, 2007 ; Thomas, 2013)**. L'hémolyse peut être physiologique (intra-tissulaire et intra-vasculaire) **(Aguilar, 2007)**, pathologique (d'origine corpusculaire (intrinsèque) ou extra-corpusculaire (extrinsèque).

Les pathologies liées à l'hémolyse: Drépanocyte, Paludisme, Coagulopathie, Maladies auto-immunes, Thalassémie... **(Horde, 2014)**

IV- La plante d'étude : *Lawsonia inermis*

Le henné est l'une des espèces les plus anciennement cultivées dans le monde. Il est utilisé et apprécié depuis très longtemps par différentes civilisations, qui lui ont attribué plusieurs vertus.

Le henné est une plante qui possède plusieurs noms vernaculaires EL Hanna, d'alkanna ou réséda (**Ben M'Rad et al, 2004**) henné (en français) ou alcana d'orient, henna (en anglais), hena ou mhindi (en hindi), alhenné ou hinna (en arabe) (**Yadav et al. 2013 ; Gozubuyuk et al. 2014, Agarwal et al. 2014**).

C'est est plante vivace originaire d'Afrique du Nord et du Sud-ouest d'Asie. Elle est cultivée dans les régions présaharienne et saharienne. Les feuilles de henné représentent les colorants naturels les plus populaires et les plus utilisées pour teindre les mains, les ongles, les doigts et les cheveux. Le principal colorant responsable des propriétés colorante du henné est la LAWSONE. Sa concentration varie entre 0,4 à 1,5% de matière sèche (**Agarwal et al. 2014**).

La plante du henné est originaire de la savane tropicale et des zones arides tropicales (**Malekzadeh, 1968**) puis sa culture s'est étendue au reste du monde (**Chaudhary et al., 2010**). Elle est actuellement cultivée dans les zones tropicales et subtropicales de l'Asie, de l'Australie, et de l'Afrique, très rarement dans les régions tempérées (**Chaudhary et al., 2010 ; Philippe, 2013**) en particulier en Inde, Iran, Afghanistan, Yémen, Arabie saoudite, Soudain, Algérie, Egypte, Tunisie et au Maroc (**Lekouche et al., 2001**). Elle produit une forte teneur en colorant à une $35^{\circ}\text{C} \leq T^{\circ} \leq 45^{\circ}\text{C}$.

Le henné porte le nom scientifique *Lawsonia inermis* Linn. C'est est une plante qui appartient de la famille des Lythracées. Cette famille est connue par le nombre important des espèces à potentiel thérapeutiques (**Yadave et al., 2013, Ajitha, 2016**).

La classification botanique du henné est donnée dans le tableau ci-dessous (**tableau 01**) : (**Yadave et al., 2013, Ajitha, 2016**)

Tableau 01 : Classification botanique de la plante *L. inermis*

Règne	Plantae
Embranchement	Phanérogames
S / embranchement	Angiospermes
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Lythraceae
Genre	Lawsonia
Espèce	<i>L. inermis</i> .L
Nom binominale	<i>Lawsonia inermis</i>
Synonyme	<i>L. alba</i> Lam <i>L. spinosa</i>

Botaniquement, il existe trois différentes plantes qui n'appartiennent pas à la même famille botanique (Solabia, 2000):

- ✓ Le henné naturel : *Lawsonia inermis* de la famille des Lythracées (Joy, 2001)
- ✓ Le henné neutre : *Cassia obovata* de la famille des crucifères (Solabia, 2000)
- ✓ Le henné noir : *Indigo feretinctonia* de la famille des papillonacées (Solabia, 2000 ; Laval, 2008).

D'un point de vu morphologique, la plante du henné est un arbuste gracieux à feuille persistante (Kothe, 2007) dont la hauteur varie de 2 à 6m lorsqu'il est cultivé (figure 02). A l'état sauvage, il est un arborescent atteignant jusqu'à 7m (Paris et Moyse, 1967), qui possède plusieurs branches proches de la base, très ramifiées avec une écorce blanchâtre (Bezanger et al., 1986).

Les feuilles du henné sont courtes et lisses, opposée, simple et entières, glabre, elliptiques, avec des nervures pennées sur la surface dorsale. Le limbe est ovale, largement lancéolées terminé par une petite pointe. La taille des feuilles est généralement variable, le plus souvent de 2 à 3 cm de long et d'une largeur de 1 à 1,5cm (figure 03) (Rahmoun, 2009, Argwal et al., 2014).



Figure 02 : La plante entière de *Lawsonia inermis* (Kothe, 2007)



Figure 03: Les feuilles de *Lawsonia inermis* (Olivier, 2005).

Les fleurs du henné sont de petites tailles, parfumées, hermaphrodites, nombreuses réunies en grappes et peuvent être blanches ou roses (**figure 04**) (**Paul, 2001**). La fleur du henné possède un diagramme floral constitué d'un long calice persistant constitué de 4 sépales, une corolle avec 4 pétales et environ 8 étamines, qui sont insérés 2 à 2 dans le tube calice, et enfin un gynécée formé d'un ovaire (**figure 05**) (**Arun et al., 2010, Borade et al., 2011., Yadavs et al., 2013., Agrawal et al., 2014**)



Figure 04: fleurs de *Lawsonia inermis* (**olivier, 2005**)

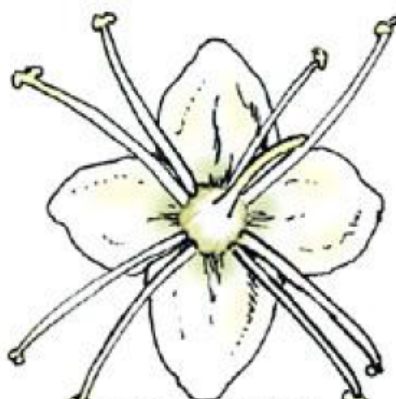


Figure 05 : schéma de la fleur de *Lawsonia inermis* (**olivier, 2005**)

Une fois les fleurs du henné sont fécondées, elles vont donner des fruits qui sont de petites capsules globuleuses brunâtres de 4 à 8 mm de diamètre renfermant de nombreuses graines. (**Agarwal et al., 2014**)

Les graines sont angulaires avec des téguments épais (**figure 07**)



Figure 06 : Fruit de *Lawsonia inermis* (olivier, 2005)

Les études phytochimiques sur la plante du henné ont montré la présence de nombreux constituants tels que les flavonoïdes, les quinoïdes, les coumarines, et les dérivés du naphthalène... **(Figure 07) (Singh et al., 2015 ; Adedeji et al., 2017)**

Les feuilles de la plante *Lawsonia inermis* sont la partie la plus utilisée. Elles contiennent : la lawsone (2-hydroxy-1,4-naphtoquinone) qui est le principal composé des quinones (environ 0,4 à 1,5 %). C'est le composant responsable de la fixation de la couleur.

Les feuilles contiennent aussi les coumarines et xanthones, et 2% de pigment flavonoïque et de résines **(Sarita, 1991)**. D'autres composés sont retrouvés comme l'acide p-coumarique, cosomosiine, apiine, 2-methoxy-3-methyl-4-naphtoquinone, luteoline et ces acacetin-7-o-glucoside, 7-o-glucoside, apigenin, isoplumbagin (2-methyl-8-hydroxy-1,4-naphtoquinone), Mucilage, de petite quantité de xanthone, stérol, et de mannitol **(Scpp, 2005 ; Khare, 2007 ; Nayak et al., 2007 ; babili et al., 2013)**.

Le taux des flavonoïdes oscille entre 7 et 8 %, alors que celui des lipides change au tour de 6%. Contenant des coumarines et xanthones, et 2% de pigment flavonoïque et de résines. **(Sarita, 1991)**.

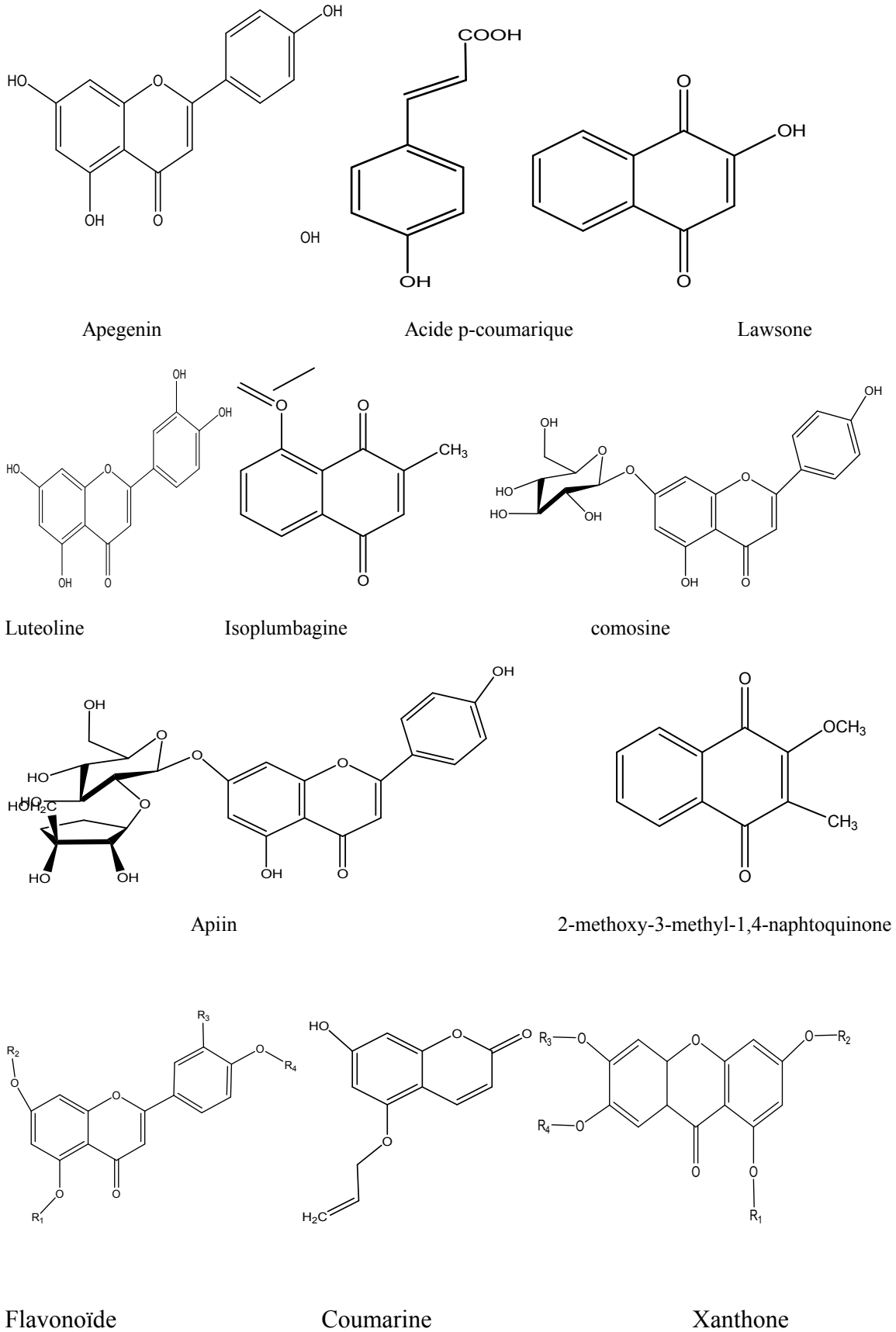


Figure 07 : Quelques constituants chimiques du henné

De plus d'autres études ont mis en évidence la présence d'autres composants tel que : L'acide gallique, vitamine K, et la mannite en grande quantité (**Moyes, 1965 ; Kerharo et Gadam, 1981**).

Les fleurs du henné contiennent une huile essentielle appelée l'ionone (0,01-0,02%) qui est responsable de l'odeur parfumée. Ainsi que d'autres métabolites secondaires tel que le linalol, le (Z)-2-hexenol, β -ionone et ses dérivés (**Chaudhary et al, 2010**).

Les graines du henné renferment de 10-11% l'huile fixe renfermant d'acide oléique, linoléique, stéarique, de l'acide arachidonique, et de l'acide palmitique, et de l'acide béhénique. En plus de l'huile essentielle composée principalement d'ionone. D'autres études ont montré la présence d'une faible quantité de protéine 5%, fibres 33,5%, et 33,6% de glucides (**Chaudhary et al., 2010**).

L'écorce de la plante du henné contient 2 triterpènes pentacycliques qui ont été isolés et identifiés comme étant le 3β , 30 dihydroxylup-20(29) -ène (hennadiol) et le (20S) 3 bêta, 3-dihydroxylupane (**Chakrabarty et al., 1982**). En plus elle contient des dérivés naphtoquinonique comme la 2-méthyl 8 -hydroxy -1,4-naphtoquinonique. (**Gupta, 1993**)

La racine de la plante du henné contient un stérol nommé Lawsaritol (24 β -éthycholest-4-en-3 β -ol), Stigmastérol et β -sitostérol (**Gupta et al., 1992**).

La richesse du henné par les différents composés chimiques a fait de lui le cosmétique le plus employé dans le monde. Son utilisation revient à des millénaires (plus de 4000 ans) par les musulmans, les chinois, les hébreux, les perses, les assyriens ... (**Kirkland et Marzin, 2003 ; Nohynek et al., 2004**).

Le henné servait à teindre les mains, ongles, doigts, pieds, cheveux et le corps particulièrement lors des occasions et des fêtes (**Paul, 2001**). A nos jours l'utilisation du henné dans les tatouages provisoires qui sont devenus populaires chez les occidentaux (**Matulich et Sullivan, 2005**). Ainsi l'utilisation des fleurs de henné pour produire des parfums de qualité peut être dans quelques secteurs bien plus communs que l'utilisation de la feuille en tant que colorant (**Kazandjieva et al., 2007**). Ainsi, actuellement, le henné est utilisé comme ingrédient dans certains produits de shampoings, crèmes et masques de protection (**Ernst, 2000**).

Le henné a été utilisé traditionnellement depuis des siècles en Afrique du Nord et en Asie. Il a joué un rôle historiquement important dans la vie quotidienne des anciennes cultures (**Khare, 2007**). Il a été décrit par le Prophète Mohammed (paix et prière sur lui) comme étant une plante du paradis. Il est la première personne qui l'a utilisé pour colorer sa barbe, ce qui a

donné à leur utilisation un aspect religieux (**Demello, 2007**). Il se caractérise par plusieurs vertus, dont la principale est de protéger les individus, former un rempart entre le corps enduit par le henné et les éléments extérieurs nuisibles (**Olivier, 2005**).

Les femmes utilisaient le henné pour teindre leurs cheveux et masquer les cheveux gris et pour lutter contre les poux et les pellicules, aussi colorer les ongles, et décorer la paume des mains et la plante des pieds afin de se protéger des champignons pathogènes (**Cartwright-Jone, 2006 ; Badonisemwal et al., 2014**). Et chez les Orientaux, le henné est souvent utilisé au hammam pour adoucir la peau (**Lavai, 2008**).

De plus en plus il a été inscrit tant que médicaments traditionnels à côté de la chimiothérapie modernes (**Gull et al., 2013**). Il est utilisé sous 3 formes différentes : en pâte, en décoction des feuilles, en infusion des racines et a été utilisé pour traiter l'ictère, l'épilepsie, et contre les ulcères malins (**Olivier, 2005**).

La pharmacopée ayurvédique de l'Inde a indiqué l'utilisation des feuilles dans la dysurie, le prurigo, les troubles de la coagulation, et d'autres maladies cutanées obstinées. Donc, il est utilisé comme plante médicinale en raison de son effet antifongiques, antibactériens, anti-amibiases, astringents, antihémorragiques, hypotenseurs et sédatifs (**Abdulmoneim, 2007 ; Khare, 2007**).

Les feuilles du henné sont utilisées dans le traitement des furoncles, vulnérables, plaies, maladies diurétiques, gale et rate, maux de tête, ophtalmie, lumbago, hémicrânes, syphilite, bronchites, aménorrhée, et favorise la croissance des cheveux. L'écorce est donnée dans les affections calcaires également dans la jaunisse et l'élargissement de la rate, et comme alternative dans la lèpre et les maladies cutanées obstinées (**Abdulmoneim, 2007 ; Khare, 2007**).

Plusieurs études ont montré l'action de LAWSONE en usage interne sur le système cardiovasculaire et le rythme cardiaque, sur la pression artérielle, ainsi que la diminution du temps de coagulation, et augmentation de la fixation de l'oxygène par les GR (**Khare, 2007**).

Et autres études ont mis en évidence l'utilisation des feuilles et des fleurs contre les tumeurs inflammatoires et les racines contre les cancers cutanés (**Kirkland et Marzin, 2003**).

Matériel et Méthodes

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de recherche antibiotiques antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique « Lapsab » Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen.

Au cours de notre travail, nous sommes intéressés à étudier l'activité antioxydante et de l'effet hémolytique d'extraits naturels obtenus par macération par deux solvants des feuilles de la plante *Lawsonia inermis*

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Notre étude a été effectuée sur les feuilles de la plante *Lawsonia inermis*. La plante a été récoltée au cours du mois d'octobre 2019, dans la région de Timimoun, wilaya d'Adrar. Par la suite, les feuilles de cette plante ont été séchées puis conservées à une T° ambiante et à l'abri de lumière jusqu'au jour de leurs utilisation (**figure 08**).



Figure 08 : Les feuilles de la plante *L. inermis* : **A** sous formes séchées, **B** broyées

1.2. Globule Rouge (GR)

L'étude de l'activité hémolytique a été réalisée sur un modèle universel de cellules des globules rouges humains provenant d'un donneur unique et sain.

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits

Les extractions des feuilles de la plante *Lawsonia inermis* ont été effectuées en mode solide-liquide. Dans un erlenmeyer, 10g de la matière végétale finement broyée ont été macérés par 100 mL de deux solvants : méthanol/eau (80/20, V/V) et dichlorométhane. Les mélanges ont été agités pendant 24h à T° ambiante.

Les macérâtes obtenus ont été filtrés à l'aide du papier Wattman, puis les filtrats ont été évaporés à sec avec un rotavapor à 60°C. Une fois les extraits sont bien secs, ils ont été solubilisés dans le DMSO et conservés à 4°C.

2.2. Calcul des rendements

Les rendements des extraits obtenus ont été calculés par l'équation suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = [M_0 / M_1] \times 100$$

Où :

M_0 : masse de l'extrait brut évaporé

M_1 : masse de la poudre de la matière végétale

3. Analyse quantitative des composés phénoliques

3.1. Dosages des polyphénols totaux

a. Principe

Ce dosage repose sur l'utilisation d'un réactif de folin-Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$). Lors de l'oxydation des polyphénols, le réactif de folin-ciocalteu est réduit en un mélange d'oxyde bleu de Molybdène (Mo_8O_{23}) et Tungstène (W_8O_{23}). La coloration produite est proportionnelle à la quantité des polyphénols présents dans les extraits, dont l'absorption maximale est comprise entre 725 nm et 750 nm (**Boizot et Charpentier, 2006 ; Bonnaillie et al., 2012**).

b. Mode opératoire :

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon le protocole décrit par **Vermerris et Nicholson, (2006)**.

Dans un tube à essai, 2 mL d'une solution de carbonate de sodium à 2% (Na_2CO_3 à 2%) ont été mélangés avec 0,1 mL de chaque extrait. Le mélange a été soumis à une incubation de 5 min. Puis nous avons ajouté 0,1 mL du réactif Folin-Ciocalteu (0,2 N). Le mélange a été incubé pendant 30 min à T° ambiante. L'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 725 nm contre un blanc.

La gamme d'étalonnage a été préparée dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0 à 1 mg/mL) comme contrôle positif

Les concentrations des composées phénoliques ont été exprimées en microgramme équivalent acide gallique par milligramme de l'extrait ($\mu\text{g EAG} / \text{mg E}$).

3.2. Dosages des flavonoïdes totaux

a. Principe

Cette méthode repose sur l'utilisation du réactif spécifique le trichlorure d'aluminium (AlCl_3). Ce dernier va former un complexe chromogène jaunâtre avec les flavonoïdes, et un complexe rose par la soude (NaOH). Les complexes produits absorbent dans le visible à une longueur d'onde de 510 nm (**Mekkiou., 2005 ; Vladimir *et al.*, 2011**)

b. Mode opératoire

Pour le dosage des flavonoïdes totaux ; la méthode décrite par **Ardestani et Yazdanparast, (2007)**, a été utilisée.

Dans un tube à hémolyse, 2 mL d'eau distillée et 150 μL de la solution de nitrite de sodium à 15% (NaNO_2) ont été mélangés avec 500 μL de chaque extrait. Après 6 min d'incubation à température ambiante, 150 μL de trichlorure d'aluminium à 10% (AlCl_3) ont été introduits. Après 6 min d'incubation à température ambiante, 2 mL d'hydroxyde de sodium à 4% (NaOH) ont été ajoutés au mélange. La solution a été ajustée à 5 mL par l'eau distillée. L'absorbance a été mesurée contre un blanc à une longueur d'onde de 510 nm après 15 min d'incubation à une T° ambiante.

En parallèle la courbe d'étalonnage a été préparée dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant comme contrôle positif la catéchine à différentes concentrations

Les concentrations ont été exprimés en microgramme équivalent de la catéchine par milligramme de l'extrait ($\mu\text{g EC/ mg E}$).

3.3. Dosage des tanins condensés

a. Principe

Le dosage des tanins condensés repose sur la présence l'acide chlorhydriques, sous l'effet de la vanilline qui les permet de se transformer en anthocyanoles d'une couleur rouge, mesurable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm (**Sun *et al.*, 1998 ; Mekkar, 2000 ; Schofield, *et al.*, 2001**)

b. Mode opératoire

Le dosage des tanins condensés a été déterminé selon le protocole de **Julkunen-Titto., (1985)**. Dans un tube 750 mL de l'acide chlorhydrique concerté (HCl) et 3 mL de vanilline à 4% ont été mis en contact avec 50 μL de chaque extrait. Le mélange a été incubé à une T° ambiante pendant 20 min. ensuite, l'absorbance a été mesurée par un spectrophotomètre UV/Vis à une longueur d'onde de 550 nm.

En parallèle, une courbe d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant la catéchine comme contrôle positif.

Les concentrations ont été exprimées en microgramme équivalent de la catéchine par milligramme de l'extrait ($\mu\text{g EC/ mg E}$).

4. Evaluation de l'activité antioxydante des extraits

4.1. Pouvoir Réducteur du fer par FRAP (FerricReducingAntioxidant Power)

a. Principe

Cette technique est basée sur la réduction du fer ferrique Fe^{3+} présent dans le complexe ferrocyanure de potassium $\text{K}_3 \text{Fe} (\text{CN})_6$, en forme ferreux Fe^{2+} (**figure 09**). Cette réaction est détectée par le virage de la couleur de la solution du jaune au bleu vert. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur de 700 nm (**Topçu *et al.*, 2007 ; Deore *et al.*, 2008**)

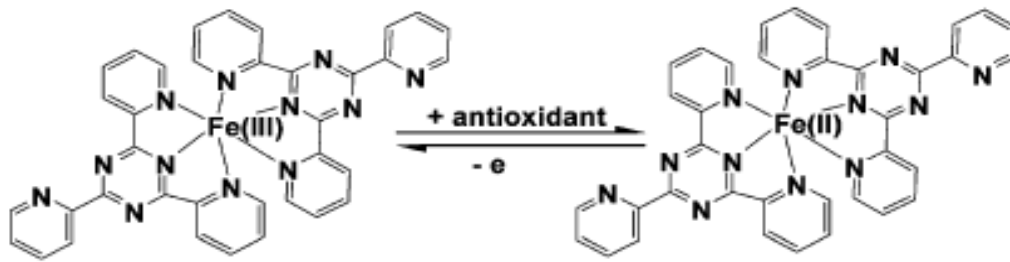


Figure 09 : réduction du fer ferrique Fe^{3+} en fer ferreux Fe^{2+}

b. Mode opératoire

Cette technique a été réalisée selon le protocole de **Karagözler *et al.*, (2008)**.

Dans un tube, 0,25 mL de la solution tampon phosphate salée (0,2 M ; pH= 6,6) et 0,25 mL de $\text{K}_3 \text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1% ont été mélangés avec 0,1 mL de chaque extrait à différentes concentrations. Les tubes ont été incubés pendant 20 min à 50°C. Ensuite, 0,25 mL de l'acide trichloracétique à 10% (TCA) ont été ajoutés pour stopper la réaction. Ensuite, 0,5 mL a été prélevé et mélangé avec 0,5 mL d'eau distillée et 0,1 mL de chlorure de fer à 0,1% (FeCl). L'absorbance du mélange a été mesurée à 700 nm contre un blanc et à l'aide d'un spectrophotomètre. L'augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés correspond à l'augmentation de l'absorbance.

L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif dans les mêmes conditions expérimentales.

La concentration effective de chaque extrait (EC_{50}) a été déterminée graphiquement à l'aide de la courbe de régression linéaire (l'absorbance en fonction de la concentration).

4.2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2 diPhenyl-1-Picryl-Hydrazyl)

a. Principe

C'est une méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antioxydante basée sur la mesure de la capacité des extraits à piéger le radical libre du DPPH. Lors de réduction du DPPH et en présence d'un agent antioxydant, sa couleur violette foncée se transforme jaune pâle (relative à la forme réduite) (**figure 10**). Cette réduction est facilement mesurée à 517nm. (**Moon et shibamoto, 2009**)

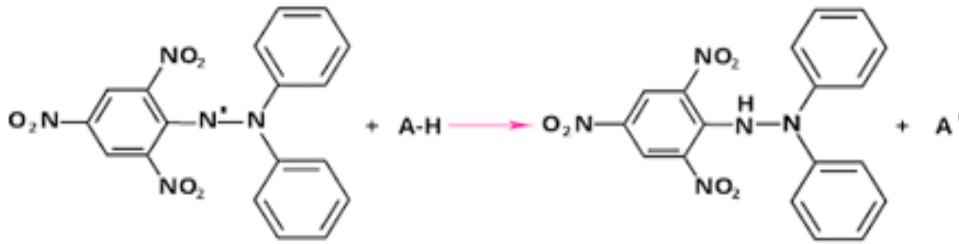


Figure 10 : Schéma de la réaction du DPPH en présence d'un antioxydant (**Moon et shibamoto, 2009**)

b. Mode opératoire

Ce teste a été réalisé selon la méthode décrite par **Popvici *et al.*, (2009)**. Dans des tubes à hémolyse, une série de dilution $\frac{1}{2}$ des extraits a été préparée. Ensuite 1950 μL de DPPH (0,064 mM) ont été introduit dans chaque tube. Le contrôle négatif a été réalisé uniquement avec le méthanol. Les tubes ont été incubés à l'obscurité pendant 30 min à T° ambiante. La lecture de l'absorbance a été faite contre un blanc pour chaque concentration à 517 nm.

L'acide ascorbique et Butylated Hydroxyanisoles (BHA) ont été utilisés comme contrôles positifs dans les mêmes conditions expérimentales.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition est sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{DPPH \%} = [(A_{\text{cntr}} - A_{\text{ech}}) / A_{\text{cntr}}] \times 100$$

Où :

A_{cntr} : absorbance de control négatif

A_{ech} : absorbance de l'échantillon

La concentration inhibitrice de 50% ou CI50 est la concentration nécessaire pour réduire 50% de radicale DPPH de chaque extrait. Elle a été déterminée graphiquement par la courbe de régression logarithmique tracée les pourcentages d'inhibitions en fonction des concentrations des extraits (**Scherer et Godoy, 2009**).

4.3. Capacité antioxydante totale (CAT)

a. Principe

Cette activité est réalisée en présence du phosphomolybdène. Elle est basée sur la réduction de molybdène Mo^{6+} (présent sous forme d'ions molybdate MoO_4^{2-}) en molybdène Mo^{5+} (MoO_2^+) en milieu acide et en présence de l'antioxydant et forme un complexe vert de phosphate (Prieto *et al.*, 1999)

b. Mode opératoire

Le réactif a été préparé en mélangeant 28mM phosphate de sodium (NaPO_4), 0,6N d'acide sulfurique, et 4mM de molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24}$). Ensuite, un volume de 0,3 mL de chaque extrait à différent concentration a été mélangé avec 30 mL de la solution du réactif. Les tubes ont été incubés pendant 2h à 95°C . L'absorbance a été lue après refroidissement des tubes à 695nm contre un blanc.

Capacité antioxydante totale (CAT) a été exprimée en milligramme équivalent acide ascorbique par gramme d'extrait (mg EAA/ g E)

4.4. Réduction du radical- cation ABTS

a. Principe

Cette méthode consiste à la réduction du radical l'ABTS⁺(acide 2,2 azinobis-3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonique). En présence d'un agent antioxydant le radical ABTS est réduit pour former un radical cation ABTS^{•+} (figure 11), ce qui entraîne une décoloration lue a une longueur de 734 nm (Lien *et al.*, 1999 ; Moon et Shibamoto, 2009)

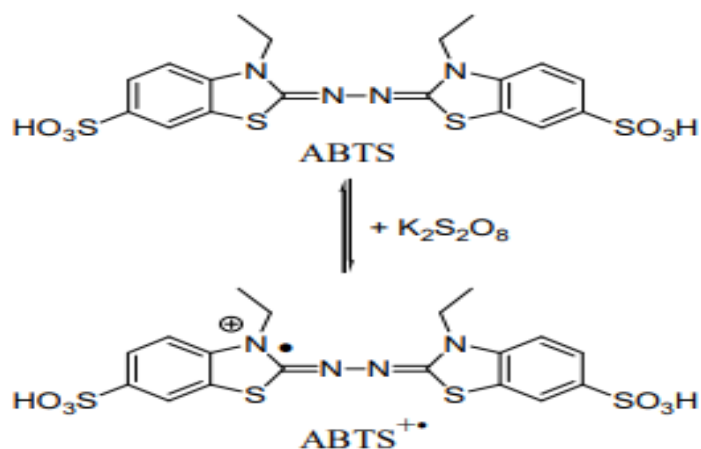


Figure 11: formation du radical-cation ABTS^{•+} à partir de l'ABTS et en présence d'oxydant persulfate de potassium (Moon et Shibamoto, 2009)

b. Mode opératoire

Cette méthode a été réalisée selon le protocole de **Mighri et al., (2010)**. La solution de l'ABTS a été préparée en mélangeant 2,45 mM de persulfate de potassium ($K_2O_8S_2$) et 7mM d'ABTS. Le mélange a été incubé pendant 16h à l'obscurité et à T° ambiante, ensuite cette solution a été diluée avec l'eau distillée jusqu'à l'obtention d'une absorbance de 0,70 à 745 nm.

Un volume de 160 μ L de la solution ABTS a été mélangé avec 40 μ L de chaque extrait à différentes concentrations. L'absorbance du mélange a été mesurée à 734 nm contre un blanc après 6 min d'incubation à une T° ambiante.

5. Evaluation de l'activité hémolytique

a. Préparation solution tampon phosphate (PBS)

La solution PBS a été préparée à un pH = 7,4 \pm 0,2 en utilisant le phosphate di-sodique 10mM (Na_2HPO_4), et phosphate de mono potassique 10mM (KH_2PO_4).

5.1. Test d'hémolyse

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par **Lee, (2002)**. Un prélèvement de sang a été réalisé à partir d'un donneur sain dans un tube héparines. Le tube a été centrifugé pendant 5 min à 4000 rpm et à 4°C. Après élimination du plasma (surnageant) et le culot a été lavé 2 fois avec une solution tampon phosphate salé 10 mM à pH= 7,4. Le tube a été centrifugé, par la suite les globules rouges ont été suspendu dans une solution tampon phosphate salé à raison de 2%.

Dans un premier temps, une série de dilution de chaque extrait (200 à 25 mg/mL) a été préparée. Dans un deuxième temps, un volume de 30 μ L de chaque extrait à différentes concentrations a été mélangé avec 2970 μ L de la suspension érythrocytaire à 2%. Les tubes ont été agités délicatement et incubés pendant 60 min (0, 15, 30, 45, 60) à 37°C dans un incubateur agitateur de paillasse (type orbital shaker, thermoforma).

Par la suite 0,1 mL de cette solution a été prélevé chaque 15min pur être introduit dans des nouveaux tubes contenant 1,9 mL de solution pendant 1 heure. Les tubes ont été centrifugés à 4000 rpm pendant 5min à 4°C. Ensuite le surnageant a été récupéré et l'absorbance a été lue à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS à 548 nm contre un blanc.

L'hémolyse totale (contrôle positif) a été obtenue par la mise en contact de 125 μ L de la suspension érythrocytaire à 2% avec 2375 μ L de triton X 100.

L'hémolyse spontanée a été testée par la solution tampon phosphate salé (PBS) (le mélange a été utilisé comme un contrôle négatif).

Le taux d'hémolyse a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = [(A_{\text{ext}} - A_{\text{H S}}) / (A_{\text{H T}} - A_{\text{H S}})] \times 100$$

Où :

A_{ext} : absorbance de l'extrait

$A_{\text{H S}}$: absorbance de l'hémolyse spontanée

$A_{\text{H T}}$: absorbance de l'hémolyse totale

Résultats et interprétations

1. Rendement

Dans notre étude nous avons utilisés deux solvants de polarités différentes à savoir : le méthanol à 80% et le dichlorométhane.

Le calcul des rendements des différents extraits (**figure 12**) montre que le meilleur rendement a été obtenu par l'extrait méthanol à 80%(19,29%), suivit par l'extrait dichlorométhane (5,39%).

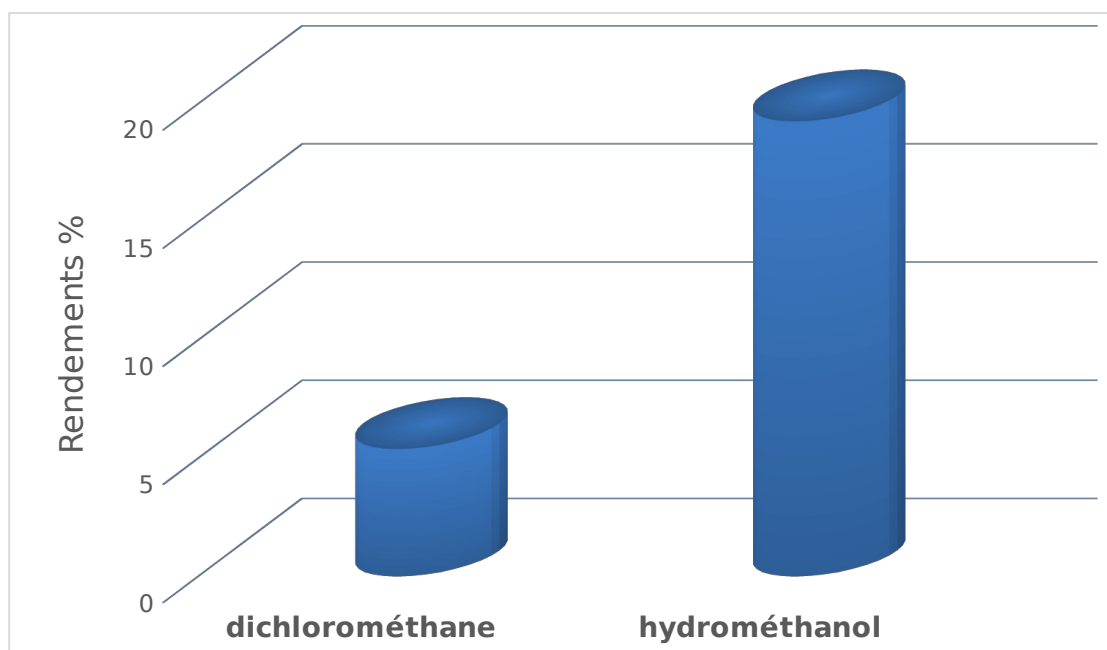


Figure 12 : Rendements des deux extraits de la plante *L. inermis*

Nous remarquons que la polarité des solvants influence sur le rendement. Cette différence est due la diversité structurale des composés chimique pour chaque extrait.

Le tableau 2, montre les caractéristiques des extraits des feuilles de la plante *L. inermis*. Nous constatons que l'extrait hydro-méthanol est pâteux et soluble dans le DMSO alors que l'extrait dichlorométhane est liquide et soluble lui aussi dans le DMSO.

Tableau 02: Caractéristiques des extraits des feuilles de la plante *L. inermis*

Extrait	Aspect	Couleur	Solubilité
Hydro-méthanol	Pâteux	Marron foncé	DMSO
Dichlorométhane	Liquide	Vert foncé	DMSO

2. Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont des composés bioactifs connus pour leurs excellentes propriétés biologiques (antioxydante, antimicrobiennes etc.) et la plupart des effets pharmacologiques des plantes sont attribués à leur richesse en composés phénoliques.

Ces différents effets nous ont encouragés à effectuer les dosages des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés. Ces dosages ont été effectués pour les deux extraits préparés par des méthodes spectrophotométriques, en utilisant des courbes d'étalonnages et leurs équations de régressions linéaires.

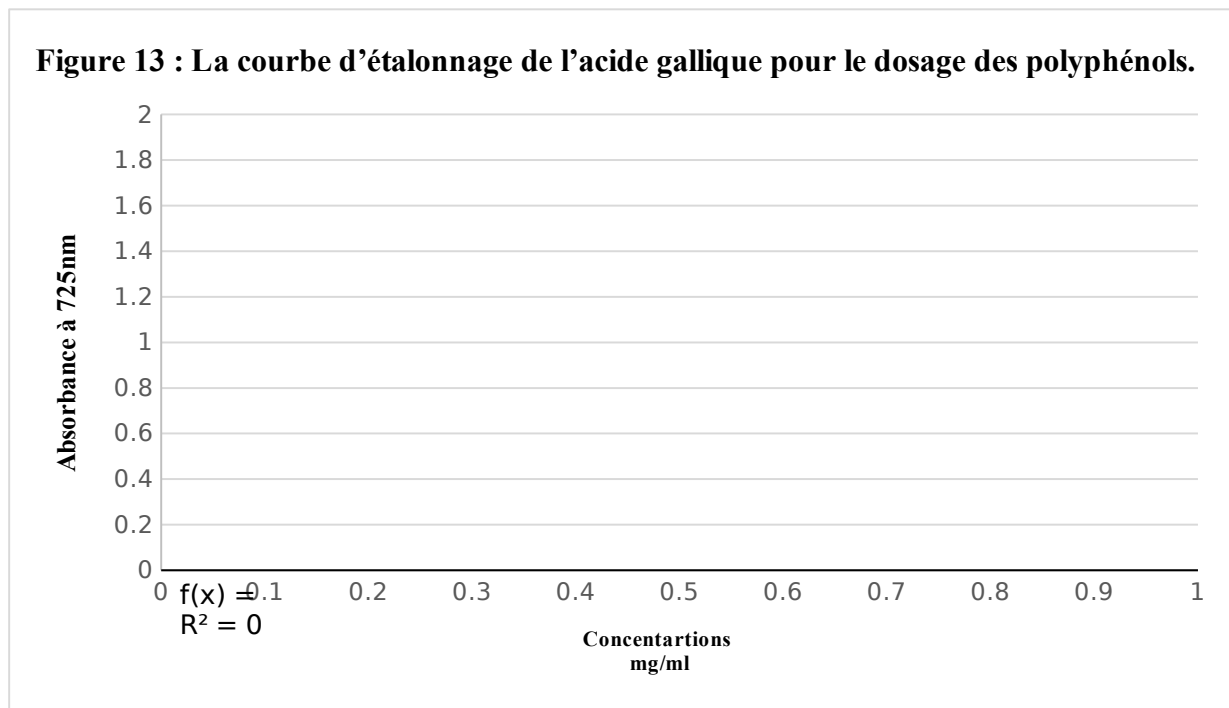
2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique qui utilise le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus sont exprimés en μg équivalent acide gallique par milligramme d'extrait (μg EAG/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire suivante : $y = 1,661x$ et le coefficient de détermination $R^2=0,997$ (**figure13**).

La courbe d'étalonnage a été réalisée par des solutions des standards l'acide gallique préparée dans les mêmes conditions à concentrations différentes allant de 0 à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Le calcul des teneurs en phénols totaux en utilisant l'équation montre que l'extrait hydro-méthanol des feuilles de *L. inermis* est riche en phénols totaux. Cette teneur est de l'ordre de 117,61 μg EAG/mg d'extrait. L'extrait dichlorométhane a montré une basse teneur de l'ordre de 31,66 μg EAG/mg d'extrait (**tableau 03**).

D'après ces résultats, nous constatons clairement que le taux de polyphénols calculé varie proportionnellement en fonction de la polarité des solvants d'extraction. En effet, l'extrait hydro-méthanol a présenté un taux plus élevé par rapport l'extrait dichlorométhane.

Figure 13 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

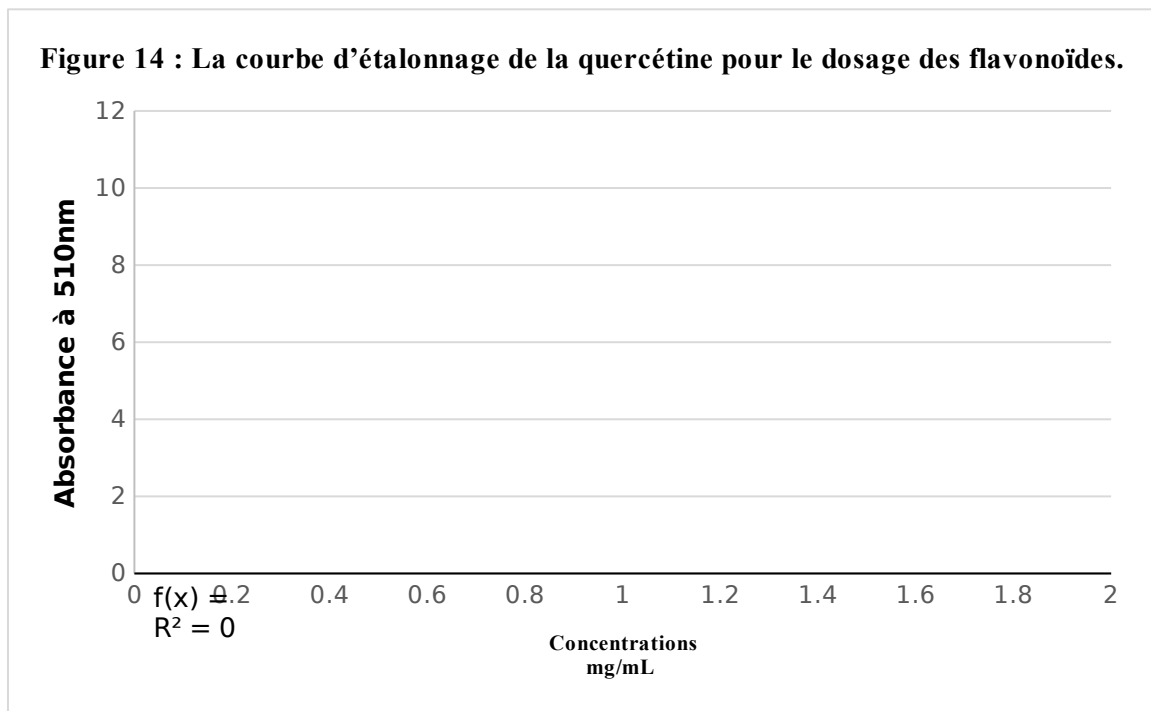
2.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé par une méthode spectrophotométrique. La catéchine considérée comme référence nous a permis de tracer une courbe d'étalonnage, d'où nous avons calculé la teneur en flavonoïdes des différentes deux extraits des feuilles de notre plante. Cette teneur est exprimée en μg équivalent de catéchine (EC) par milligramme de l'extrait.

La formule de la régression linéaire obtenue pour cette courbe est : $y = 0,082x$ et le coefficient de détermination $R^2 = 0,995$ (**figure 14**).

Nous constatons que l'extrait dichlorométhane contient $350,43 \mu\text{g EC/mg}$ d'extrait alors que l'extrait hydro- méthanol ne contient que $102,37\mu\text{g EC/mg}$ d'extrait (**tableau 03**).

L'extrait dichlorométhane est très riche en flavonoïdes par rapport à l'extrait hydro-méthanol.



2.3. Dosage des tanins condensés

La quantification des tanins a été effectuée par extrapolation des absorbances obtenues sur la courbe d'étalonnage réalisée par la catéchine. Les résultats sont exprimés en μg équivalent de la catéchine par milligramme de l'extrait. La formule de régression linéaire obtenue pour cette courbe est comme suit :

$$y = 0,633 x \text{ et le coefficient de détermination } R^2 = 0,995 \text{ (figure 15)}$$

Le dosage des tanins des feuilles de *L. inermis* a donné un taux de l'ordre de $67,23 \mu\text{g EC/mg}$ d'extrait pour l'extrait dichlorométhane. Les tanins étaient absents dans l'extrait hydro-méthanol (**tableau 03**). En effet l'extrait dichlorométhane a présenté un taux plus élevé par rapport à l'extrait hydro-méthanol.

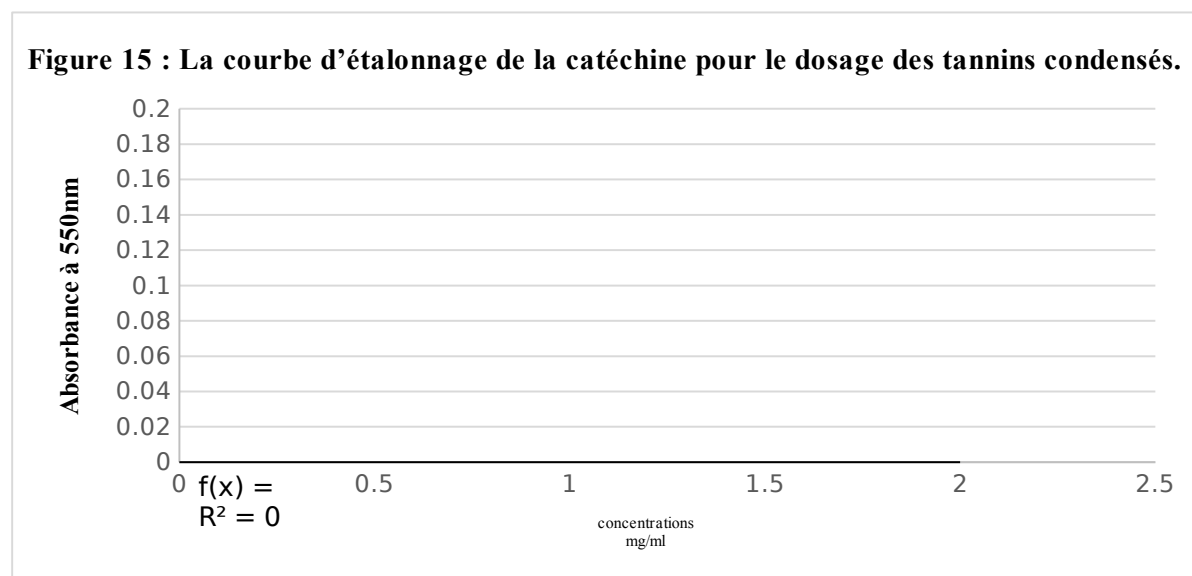


Tableau 03: Les taux des composées phénoliques des feuilles de la plantes *L. inermis*

Extraits	Polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG /mg E}$)	Flavonoïdes totaux ($\mu\text{g QE/mg E}$)	Tannins condensées ($\mu\text{g CE/mg E}$)
Dichlorométhane	31,66 \pm 5,63	350,43 \pm 10,71	67,23 \pm 27,43
Hydro-méthanol	117,61 \pm 11,65	102,37 \pm 11,09	0

3. Etude de l'activité antioxydante

3.1. Piégeage du radical libre DPPH (2,2 Diphényl-1-Picryl-Hydrazyl)

Ce test a été déterminé par la mesure de la diminution de l'absorbance d'une solution alcoolique de DPPH à 517 nm, réduit par les extraits de la plante. À partir des valeurs des absorbances obtenues nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée auparavant.

Les résultats obtenus, montrant une augmentation proportionnelle des pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des concentrations des deux extraits et du BHA (contrôle positif). Ce qui a permis l'obtention des courbes logarithmiques (**figures 16 et 17**).

L'extrait hydro-méthanol a montré un pouvoir antiradicalaire plus important que celui de l'extrait dichlorométhane. À une concentration de 4 mg/mL, l'extrait hydro-méthanol a un pourcentage d'inhibition de 90 %, contre 15% pour l'extrait dichlorométhane.

Cependant, ces données restent inférieures à celles des antioxydants de synthèses (BHA, Acide ascorbique) qui ont présenté la meilleure activité antiradicalaire par rapport à nos extraits avec de faibles concentrations, où la concentration de 0,2 mg/mL a un pourcentage d'inhibition de 95 % et 75% respectivement (**figure 16**)

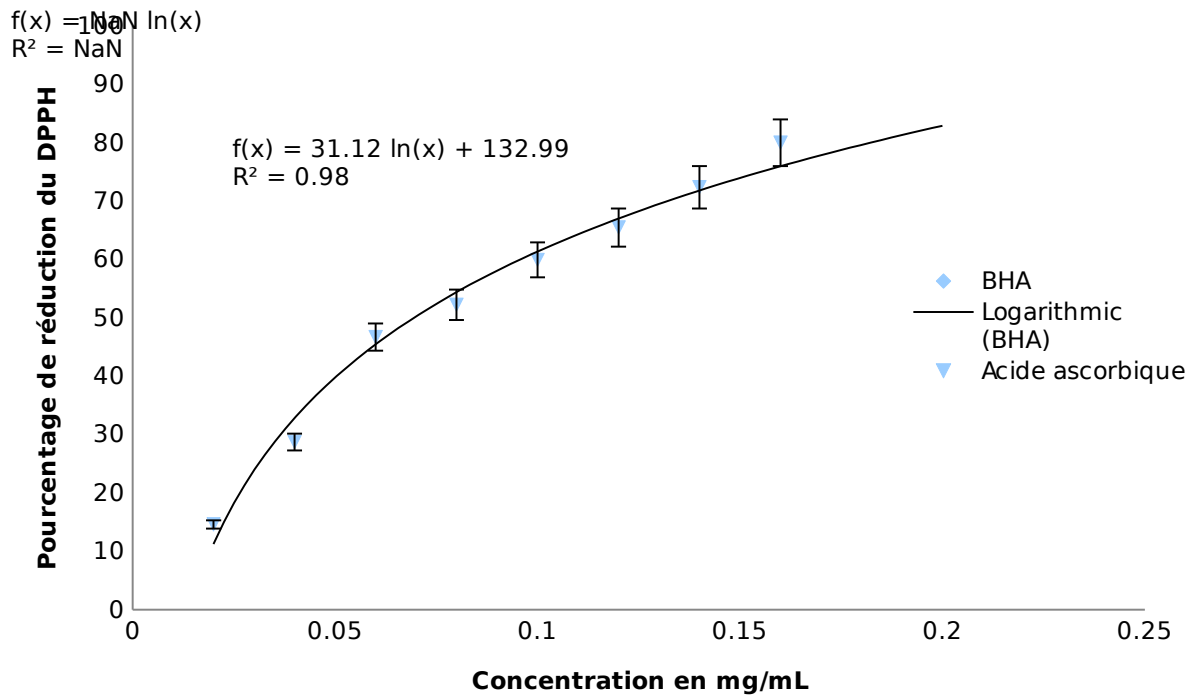
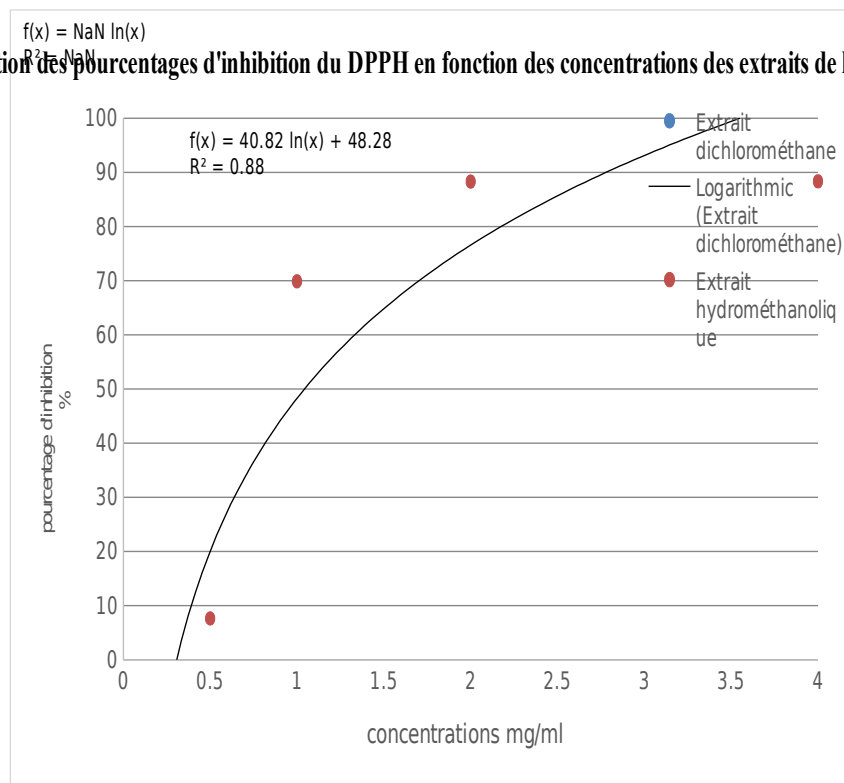


Figure 17 : Evolution des pourcentages d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits de la plante *L. inermis*



La capacité antiradicalaire de nos extraits, a été exprimée aussi par la détermination de la concentration qui assure la réduction de 50 % du radical DPPH[•] (CI₅₀). Une faible valeur d'CI₅₀ correspond à une grande efficacité de l'extrait et à un pouvoir antiradicalaire plus fort. Les valeurs des CI₅₀ trouvées pour le BHA et l'Acide Ascorbique et pour les deux extraits sont représentés dans le **tableau 04**. En comparant les CI₅₀ des extraits testées, nous remarquons que l'extrait hydro-méthanol présente une CI₅₀ inférieure à celle de l'extrait dichlorométhane et donc une activité antiradicalaire meilleure.

Tableau 04: CI₅₀ du BHA et des deux extraits de *L. inermis*

	Extraits		BHA	Acide Ascorbique
	Hydro-méthanol	Dichlorométhane		
CI ₅₀ en mg/mL	0,27 ± 0.025	> 4 ± 0,03	0,08	0,1

Nous remarquons aussi que les CI₅₀ obtenues pour le BHA et l'Acide Ascorbique, utilisés comme molécules de référence sont bien inférieurs à ceux des extraits.

3.2. Capacité antioxydant total (CAT)

Ce test a été mesuré par la réduction du phosphomolybdène dans un milieu acide en présence d'un agent antioxydant.

Les résultats sont calculés par le dosage d'acide ascorbique à partir de la courbe d'étalonnage ($y=0,0189x$; $R^2= 0,9914$) (**figure 18**) et représentés dans le **tableau 05**. Nous constatons que l'extrait hydro-méthanol à exprimer une valeur légèrement élevée (20,06 EAA mg / g E), par rapport à l'extrait dichlorométhane (17,44 EAA mg / g E).

Tableau 05: Capacité antioxydant total des deux extraits de la partie aérienne de la plante *L. inermis*

	Extraits	
	Hydro-méthanol	Dichlorométhane
CAT (EAA mg/ g E)	20,06 ± 0,96	17,44 ± 1,15

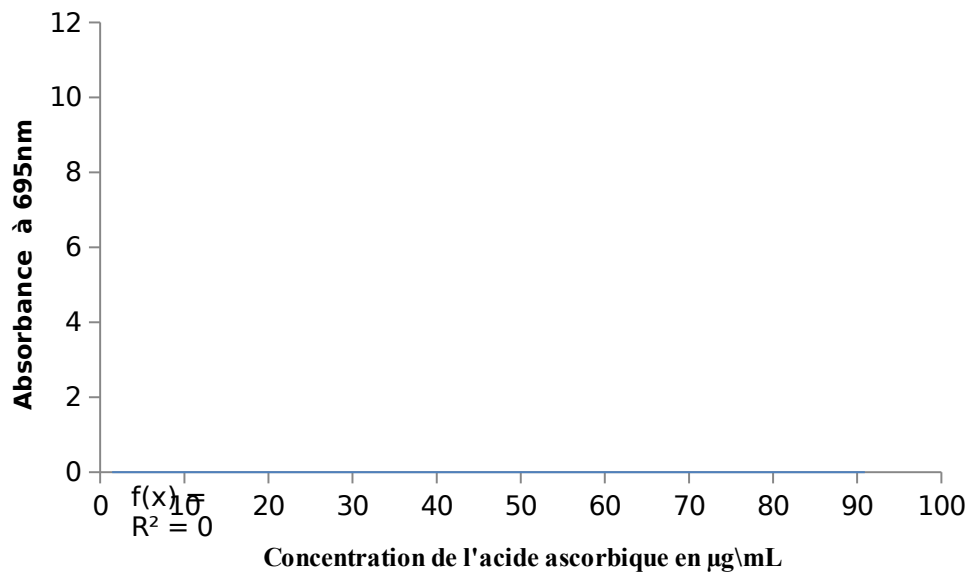


Figure 18 : Courbe d'étalonnage de la capacité antioxydant total de l'acide ascorbique

3.3. Piégeage du radical ABTS

Cette méthode consiste à la réduction du radical l'ABTS^{•+}, lue a une longueur de 734 nm. À partir des valeurs des absorbances obtenues nous avons calculé les pourcentages d'inhibition.

Les résultats obtenus, montrant que le pourcentage d'inhibition du radical ABTS est proportionnel à la concentration des deux extraits et du BHA et BHT (contrôle positif). Ce qui a permis l'obtention des courbes logarithmiques (**figures 19 et 20**).

L'extrait hydro-méthanol a montré un pouvoir antioxydant un peu plus important que celui de l'extrait dichlorométhane. À une concentration de 1 mg/mL, l'extrait hydro-méthanol a montré un pourcentage d'inhibition de 98 %, contre 90% pour l'extrait dichlorométhane.

Cependant, ces données restent inférieures à celles de l'antioxydant de synthèse (BHA et BHT) qui ont présenté les meilleures activités à de faibles concentrations (**figure 19**).

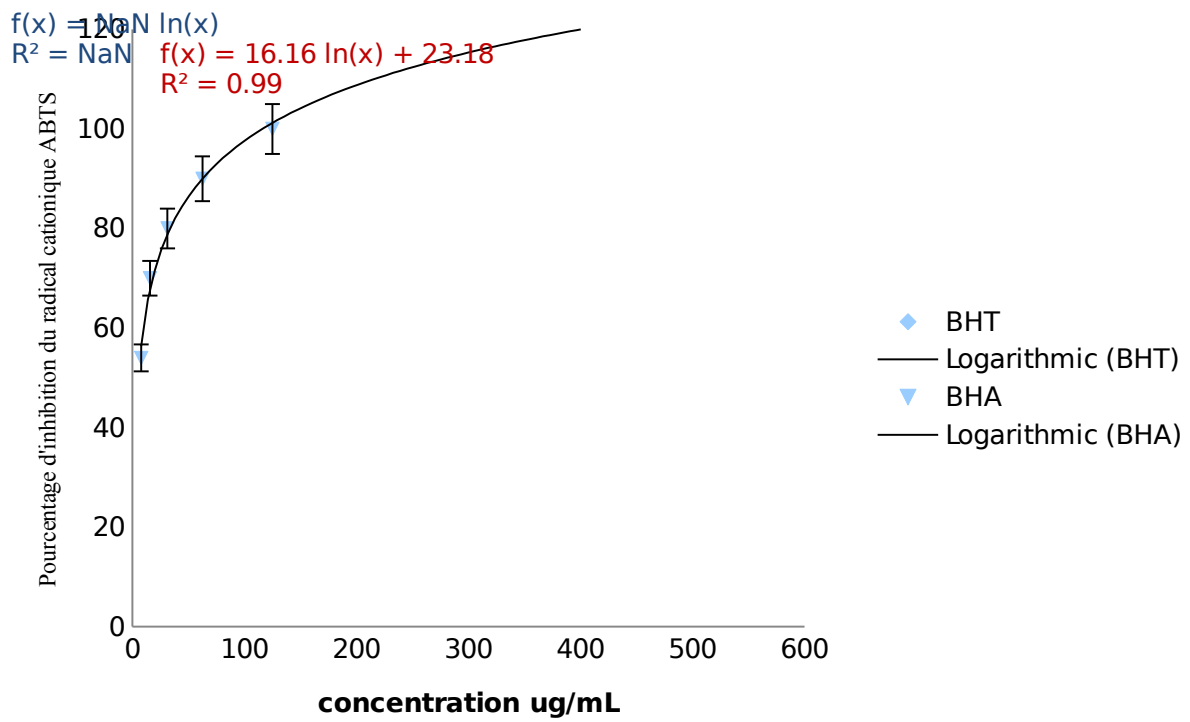
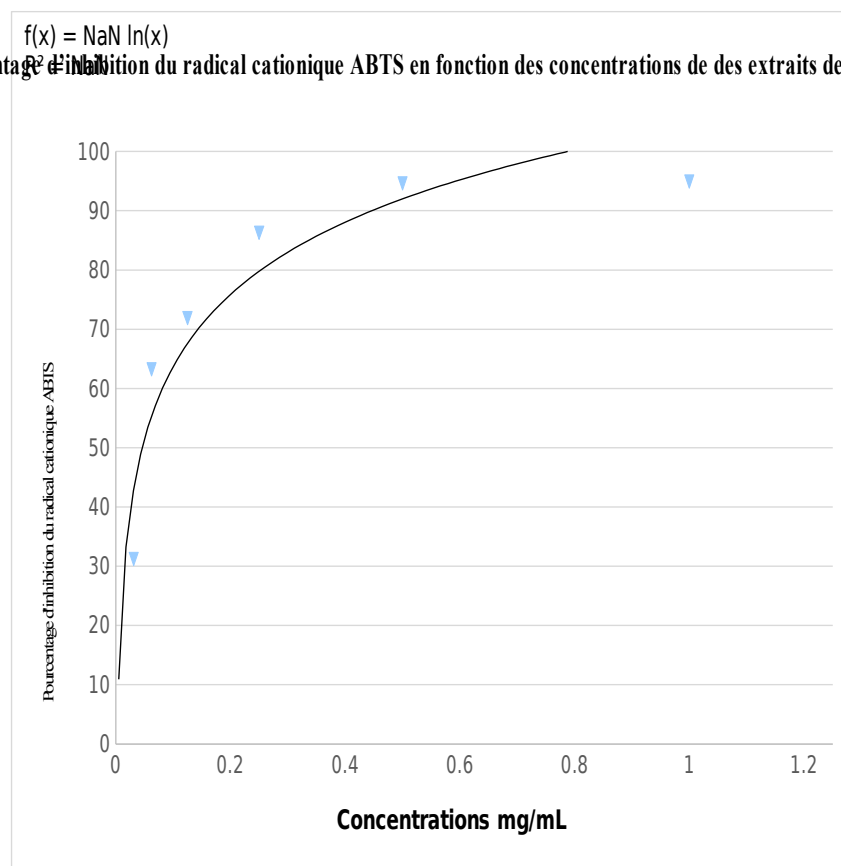


Figure 20: Pourcentage d'inhibition du radical cationique ABTS en fonction des concentrations de des extraits de la plante *L. inermis*



La capacité antiradicalaire de nos extraits, a été exprimée aussi par la détermination de la concentration qui assure la réduction de 50 % du radical ABTs (CI_{50}). Une faible valeur d' CI_{50} correspond à une grande efficacité de l'extrait et à un pouvoir antiradicalaire important.

Les valeurs des CI_{50} trouvées pour le BHA, BHT et pour les deux extraits sont représentées dans le **tableau 06**. En comparant les CI_{50} des extraits testés, les résultats montrent clairement que les deux extraits testés possèdent des CI_{50} presque semblable 0,014 mg/mL pour l'extrait hydro-méthanol et 0,018 mg/mL pour l'extrait dichlorométhane et donc les deux extraits possèdent une propriété antioxydante intéressante.

Tableau 06: CI_{50} du BHA et des deux extraits de *L. inermis*

	Extraits		BHA	BHT
	Hydro-méthanol	Dichlorométhane		
CI_{50} en mg/mL	0,014 ± 0,01	0,018 ± 0,02	0,0049	0,0076

Cependant les CI_{50} obtenues pour le BHA et BHT, utilisées comme molécules de références sont bien inférieurs à ceux des extraits.

3.4. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Cette méthode est utilisée pour évaluer la capacité des extraits à réduire le Fe^{3+} en Fe^{2+} , cette réduction est mesurable à 700nm.

Les résultats obtenus, montrant que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à la concentration des deux extraits. Nous avons obtenu des courbes de régression linéaires des absorbances en fonction des concentrations extraits et des standards BHA et l'Acide Ascorbique (**figures 21 et 22**).

L'extrait hydro-méthanol a montré la meilleure capacité à réduire le fer par rapport à l'extrait dichlorométhane. La concentration efficace à réduire 50% le fer (EC_{50}) confirme les résultats obtenus (**tableau 07**). Une faible valeur d' EC_{50} correspond à une grande efficacité de l'extrait à réduire le fer. En comparant les EC_{50} des extraits testés, nous remarquons que l'extrait hydro-méthanol présente une EC_{50} inférieure à celle de l'extrait dichlorométhane et donc un meilleur pouvoir réducteur

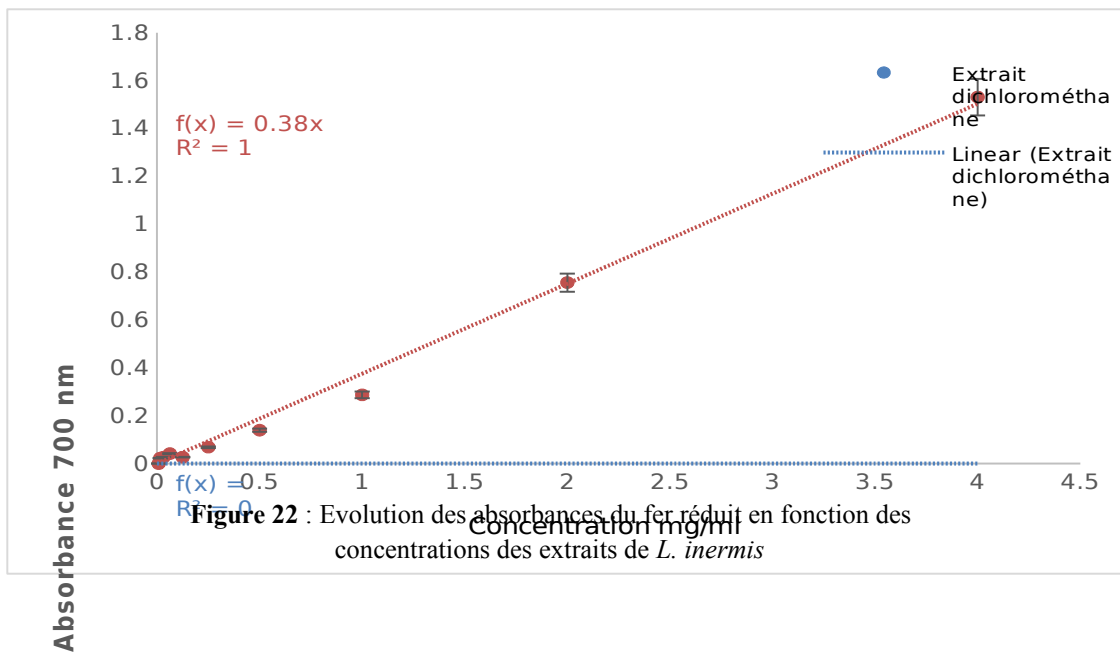
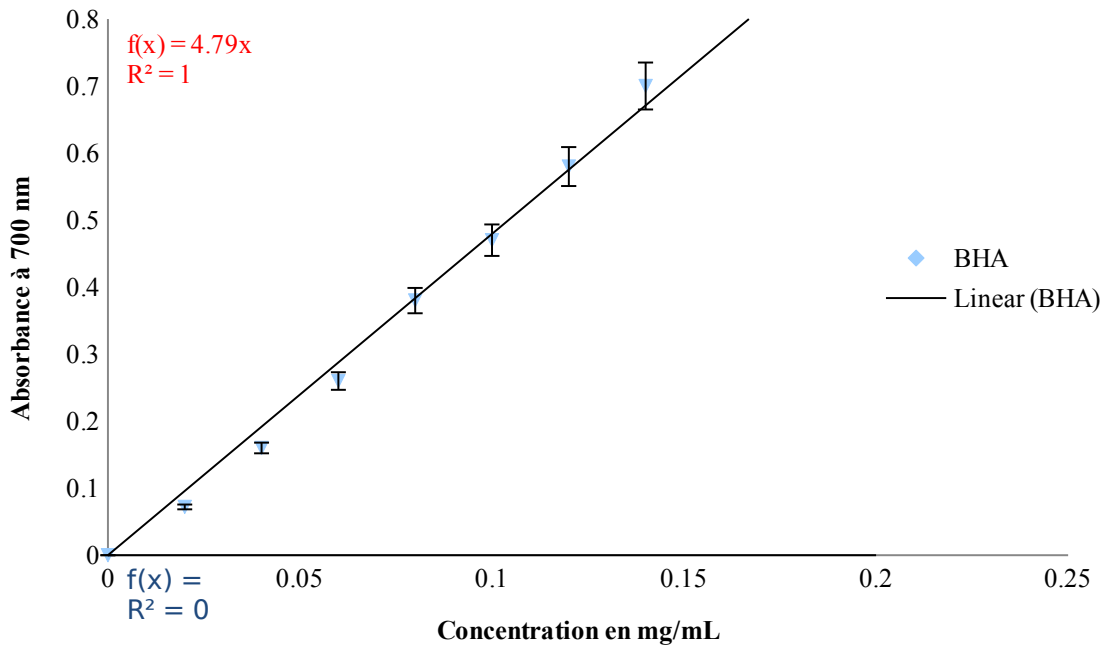


Figure 22 : Evolution des absorbances du fer réduit en fonction des concentrations des extraits de *L. inermis*

Tableau 07: EC₅₀ du BHA et des deux extraits de *L. inermis*

	Extraits		BHA	Acide Ascorbique
	Hydro-méthanol	Dichlorométhane		
EC ₅₀ en mg/mL	1,29 ± 0,04	4,69 ± 0,05	0,09	0,10

Nous remarquons aussi que les CE_{50} obtenue pour le BHA et l'Acide Ascorbique, utilisés comme molécules de références sont bien inférieures à celles des extraits, est donc un pouvoir réducteur de fer plus élevé.

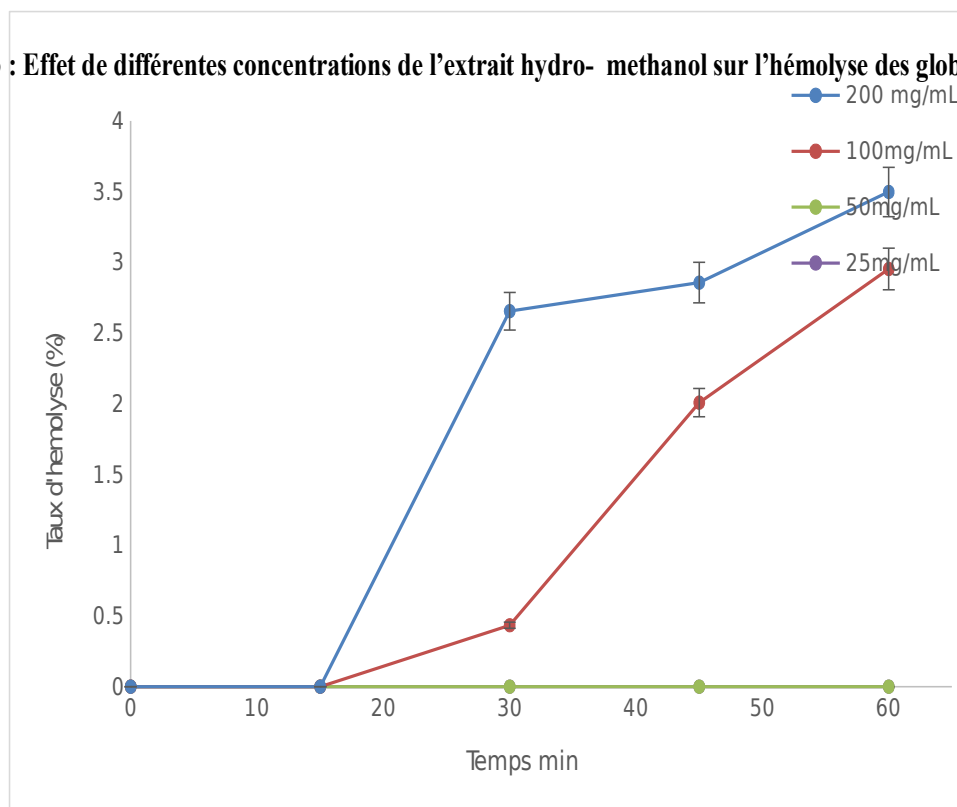
4. Etude de l'activité hémolytique

Afin de mieux comprendre le comportement de ces composés au cours du temps, l'effet hémolytique a été suivi pendant 60 min. Quatre dilutions ont fait l'objet de ce suivi. L'intervalle des différentes dilutions été choisi de tel façon à tester des concentrations beaucoup plus élevées que celle obtenues dans les tests antioxydants.

La figure 23 représente l'effet hémolytique vis-à-vis des globules rouges humains de quatre concentrations de l'extrait hydro-méthanol.

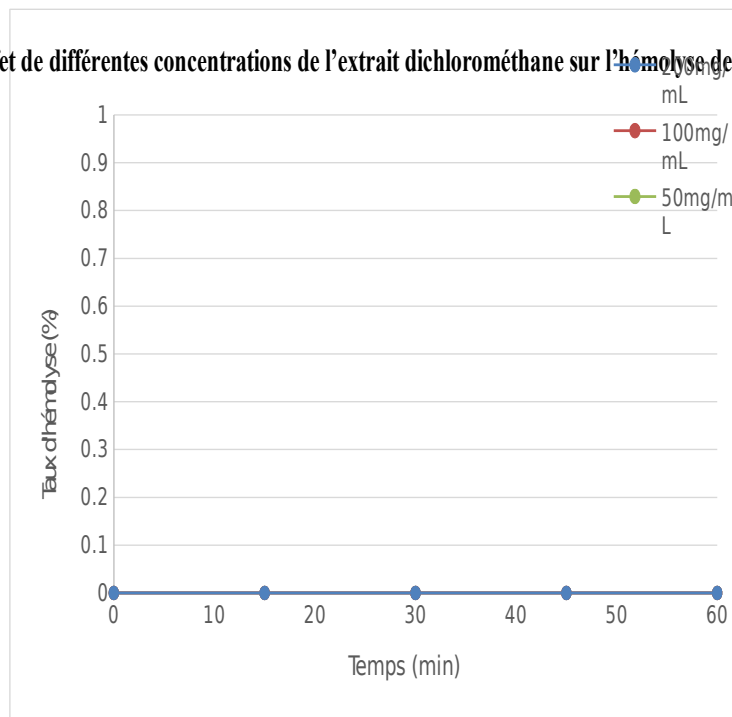
Nous constatons que les différentes dilutions de l'extrait hydro-méthanol ont montré une bonne relation dose-réponse vis-à-vis des globules rouges humains après 60 minutes d'incubation. Cette réponse est maximale à la concentration la plus élevée (200 mg/ mL.) est nulle à la concentration la plus faible (25 mg/mL). À la concentration la plus élevée le taux d'hémolyse est de 3,49 %.

Figure 23 : Effet de différentes concentrations de l'extrait hydro- méthanol sur l'hémolyse des globules rouges



La figure 24 : représente l'effet hémolytique vis-à-vis des globules rouges humains de quatre concentrations de l'extrait dichlorométhane. Toutes les concentrations ont montré un taux d'hémolyse nulle pendant 60 min d'incubation.

Figure 24 : Effet de différentes concentrations de l'extrait dichlorométhane sur l'hémolyse des globules rouges



Discussion

Ces derniers temps, l'évaluation des activités biologiques des plantes médicinales a augmenté considérablement en Algérie. Ceci montre que les molécules isolées à partir des plantes médicinales sont certainement intéressantes pour être utilisées en thérapie alternative ou comme modèle pour la synthèse de nouvelles substances (**Houghton, 2000**).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique ainsi qu'à l'évaluation de l'activité antioxydante et hémolytique des feuilles de la plante *L. inermis*. Cette plante a été largement utilisée dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique.

Deux solvants ont été utilisés pour l'extraction : dichlorométhane et hydro-méthanol (80%). Les résultats des rendements obtenus ont montré que l'extrait hydro-méthanol a donné le rendement le plus élevé. Nos résultats sont en accord avec une étude réalisée par différents extraits obtenus par macération des feuilles de *L. inermis*. Cette étude a montré que l'extrait méthanol à 90% avait le meilleur rendement (**Niazi et al., 2020**). Ces résultats peuvent être expliqués par l'influence de plusieurs facteurs comme l'espèce végétale, les conditions du séchage, le contenu de chaque espèce en métabolite, les méthodes d'extraction, et la nature des solvants utilisés (**Rhita et al., 2018**).

Nous avons ensuite déterminé la teneur des composés phénoliques en polyphénols totaux, en flavonoïdes, et en tanins condensés. L'extrait hydro-méthanol a montré une teneur plus élevée en polyphénols totaux, et l'extrait dichlorométhane a montré des teneurs plus élevées en flavonoïdes et en tanins condensés.

D'après **Enneb et al., (2015)**, l'extrait méthanol à 80% des feuilles de henné a montré un taux en polyphénol totaux de l'ordre de 118,94 μg EAG/mg E. Ces résultats confirment ceux trouvés dans notre étude. Cependant **Ebrahimzadeh et al., (2008)** et **Benyahkem et Lamrik, (2017)** ont trouvé des résultats supérieurs aux nôtres par l'extrait hydro-éthanol. Dans l'étude de **Ben Hasouna et al., 2011**, les extraits aqueux, butanol et chloroforme ont montré les des valeurs différentes en polyphénol (444 ± 38 , 286 ± 8.0 , 73 ± 4.0 μg EAG/mg E respectivement).

D'après **Lee et al., 2002**, les techniques de quantification et le mode d'extraction influencent directement sur le taux des polyphénols totaux extrait.

Nos résultats ont montré que l'extrait dichlorométhane est riche en flavonoïdes par rapport à l'extrait hydro-méthanol. **Ojewunmi et al., (2014)** ont obtenu des teneurs proches à celle que nous avons obtenu avec de l'extrait hydro-méthanol alors que **Rhita et al., (2018)** ont obtenu

des valeurs nettement inférieures (71,114 µg EQ/ mg E). Cependant, **Enneb et al., (2015)** ont rapporté des teneurs supérieures aux nôtres pour le même extrait (171 mg EQ/ mg E).

De même pour les tanins, selon **Enneb et al., (2015)** et **Benyahkem et Lamrik., (2017)**, les teneurs en tanins condensés dans l'extrait hydro-méthanol sont moins importantes par rapport à l'extrait dichlorométhane.

Il est admis que les composés phénoliques sont à l'origine de plusieurs activités biologiques tel que : activité anti-inflammatoire, antioxydante et antibactérienne... Comme nos deux extraits contenaient de nombreux composés phénoliques, cela nous a poussés à étudier leur activité antioxydante via quatre techniques : DPPH, CAT, ABTs et FRAP.

Les propriétés antioxydantes de différents extraits des plantes peuvent être évaluées à l'aide de divers tests in vitro. Les dosages antioxydants dans les aliments, les systèmes biologiques et les produits cosmétiques peuvent être divisés en deux groupes: Ceux qui évaluent la peroxydation lipidique et ceux qui mesurent la capacité piégeage des radicaux libres (**Sánchez-Moreno, 2002**). Nous avons testés seulement la capacité des extraits à piéger les radicaux libres par plusieurs méthodes.

Les activités antioxydantes dans le présent travail ont été présentées comme des valeurs CI50/EC50, correspondant à la quantité d'extrait nécessaire pour piéger 50% des radicaux libres présents dans le mélange réactionnel. Des valeurs élevées de CI50 indiquent une faible activité antioxydante. L'échantillon des feuilles de *L. inermis* ont montré une intéressante capacité de piégeage des radicaux libres. Sur l'ensemble des activités antioxydantes testées, l'extrait hydro-méthanol a montré les meilleures activités par rapport à l'extrait dichlorométhane

Ces résultats soutiennent ceux de **Enneb et al., 2015**, qui a montré que l'extrait hydro-méthanol exhibe le pouvoir de piégeage du DPPH le plus important. De même, **Philip en 2011**, a montré que les fractions de l'extrait dichlorométhane ont une activité de piégeage du radical, moins intéressante que pour l'extrait hydro-méthanol. La CI50 obtenue était de l'ordre de 0,51 mg/ mL.

Hasouna et al., 2011, ont évalué les propriétés de piégeage du radical DPPH des extraits : l'eau, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Les CI50 obtenues sont respectivement $7,6 \pm 0,1$, $4,8 \pm 0,2$, $9,0 \pm 0,3$ µg/ml. Les extraits chloroforme et n-hexane avaient une CI 50 >200 µg/mL.

Selon **Zouhri et ses collaborateurs, 2017**, l'huile extraite des feuilles de *L. inermis* est douée de l'activité anti-radicalaire très importante avec une CI_{50} d'ordre de 19 $\mu\text{g/ml}$.

Plusieurs auteurs ont rapporté que l'activité antioxydante des plantes est attribuée aux composés phénoliques (**Cetkovic et al., 2008 ; Hernandez et al., 2009 ; Daniel et Workneh., 2017**). Selon **Chang et al., 2001**, le pouvoir antioxydant peut être attribué au contenu phénolique en raison de ses propriétés rédox. Cette propriété lui permet d'agir comme un agent réducteur. Ceci confirme nos résultats étant donné que l'extrait hydro-méthanol contenait une quantité considérable en polyphénols. Selon **Sun et ses collaborateurs, 2007**, le meilleur solvant pour extraire les antioxydants est le méthanol (**Sun et al., 2007**).

Nous pensons que les tanins condensés ne sont pas impliqués dans les quatre activités testées dans cette étude. Cette déduction est soutenue par l'étude qui montre que l'activité antioxydante trouvée dans les différents extraits de la plante *L. inermis* n'était pas en corrélation avec la teneur en tanins (**Abdelmalek et al., 2014**). Le même auteur rapporte qu'il existe une corrélation positive entre les phénols et l'activité antioxydante.

Certains auteurs ont montré que les phénoliques et les flavonoïdes jouaient un rôle majeur dans les activités antioxydantes, car la quantité des composés était proportionnelle à l'activité (**Philippe, 2011**). Ainsi dans leur étude, **Oyesola et al (2014)** l'analyse phytochimique des feuilles de *L. inermis* a révélé la présence d'acide gallique, de mannitol, de mucilage, d'alcaloïde, la lawsone (2-hydroxy-1,4 naphthoquinone), d'apigénine, d'acide p-coumaricacide, de 2-méthoxy-3-méthyl- 1,4-naphthoquinone, apigénine-7-apiosyl-glucoside (apiine), lutéoline, cosmosiine. Les flavonoïdes ainsi que les triterpénoïdes et les polyphénols sont des composés naturels dans les plantes avec un grand impact bénéfique sur l'état de bien-être de l'homme (**Saeed et al, 2012**). D'après **Frankel (1995)**, ces composés possèdent des activités antioxydantes capables d'éliminer les radicaux libres excessifs produits au cours des processus métaboliques. La présence des flavonoïdes et composés phénoliques totaux observées dans notre étude peut être responsable des activités antioxydantes totales présentées par nos extraits. Ces résultats corroboraient le rapport précédent sur *L. inermis* (**Oyesola et al, 2014**). Cela pourrait s'expliquer aussi en partie par la présence de flavonoïdes et de naphthoquinones (**Mikhaeil et al., 2004**).

Ben Hsouna et ses collaborateurs ont déjà signalé la capacité des extraits de feuilles de *L. inermis* à piéger les radicaux libres DPPH. (**2011**) (**Ben Hasouna et al., 2011**). Différentes fractions obtenues à partir de plusieurs solvants ont montré diverses activités antioxydantes et

le composant responsable d'une telle capacité a été isolé et identifié par les auteurs comme étant le 1,2,4-trihydroxynaphtalène-1-O- β -D-glucopyranoside. D'autres auteurs ont également signalé l'activité antioxydante des extraits de feuilles de henné (**Uddin, 2011**) évaluée par la méthode DPPH. Dans ce cas, la 3,3', 4', 7-tétrahydroxy flavanone était le composant ayant à l'origine de cette activité. En comparant les activités antioxydantes de l'extrait de henné et de la lawsone pure avec une concentration similaire à celle présente dans les extraits de henné par la méthode DPPH, certains auteurs ont rapporté que l'activité antioxydante n'était pas seulement due au dérivé de la naphthoquinone mais également à d'autres composés polyphénoliques non identifiés par les auteurs (**Zohourian, 2011**).

Afin de pouvoir exploiter les propriétés antioxydantes de nos extraits, il est évident que l'étude des propriétés d'hémolyse et de néphrotoxicité doit être faite à un stade avancé, compte tenu de la sensibilité de l'être humain à l'hémolyse et la néphrotoxicité de ces substances présentes dans les extraits. Lorsque la membrane plasmique des globules rouges entre en contact avec un agent hémolytique, ceci conduit à la lyse cellulaire qui se traduit à la libération de l'hémoglobine dans le milieu extracellulaire et qui absorbe à 548 nm. C'est pourquoi nous avons dosé le taux d'hémoglobine dans le milieu extracellulaire à différentes concentrations des extraits. Les globules rouges sont considérés comme les principales cibles des radicaux libres en raison du transport de l'oxygène par l'hémoglobine redox active (**Abirami et al., 2014**), et la présence des concentrations élevées d'AG polyinsaturé dans la membrane (**Banerjee et al., 2008**).

Les tests d'hémolyse des deux extraits de la plante *L. inermis* vis-à-vis des globules rouges humains sont montrés que l'extrait hydro-méthanol à présenter à la concentration la plus élevée un pourcentage d'hémolyse très bas de l'ordre de 3,49%, alors que l'extrait dichlorométhane n'a montré aucune toxicité vis-à-vis des globules rouges humains.

Iram et al.,(2013) a testé la toxicité de l'extrait éthanol de *L. inermis* vis-à-vis des mâles des rats albinos. Dans cette étude il a été conclu que cette plante ne présente aucun pouvoir toxique in vivo durant 24h de traitement. Dans une étude réalisée par **Klaus et al., (2010)**, la lawsone, 1,4-naphtoquinone, 2-méthyl-1,4-naphtoquinone, juglone, plumbagin et lapachol ont été étudiés pour leur cytotoxicité vis-à-vis des kératinocytes humains. Les composés 1,4-naphtoquinones, ménadione, juglone et la plumbagin étaient très cytotoxiques et induisaient fortement la formation d'espèces réactives d'oxygène et détruisaient la glutathion cellulaire. Cependant ni lawsone ni le lapachol n'étaient cytotoxiques dans ces tests.

Selon **Makkar et Backer., 1997**, la cytotoxicité des feuilles de la plante *L. inermis* vis-à-vis des GR aux fortes concentrations est due à la présence des teneurs élevées en tanins et en saponines dans l'extrait.

Il est clair que les saponines sont des composés terpéniques qui ont la capacité de favoriser la formation des pores au niveau de la membrane cellulaire, ce qui entraînant l'hémolyse ainsi la libération d'Hb dans le plasma.

Conclusion et perspectives

Cette étude s'est intéressée à la recherche de l'activité antioxydante et de l'effet hémolytique d'extraits des feuilles de *L. inermis*.

Il ressort de cette étude que le meilleur rendement des feuilles de la plante *L. inermis* a été obtenu par l'extrait hydro-méthanol (19,29%).

Le dosage des composés phénolique nous a montré que l'extrait hydro-méthanol renferme le taux le plus élevé en polyphénol totaux ($117,61 \pm 11,65 \mu\text{g EAG/mg E}$). Cependant l'extrait dichlorométhane a montré une teneur plus élevée en flavonoïdes et en tanins condensés ($350,43 \pm 10,71 \mu\text{g QE/mg E}$; $67,23 \pm 27,43 \mu\text{g CE/mg E}$ respectivement).

L'évaluation de l'activité antioxydante nous a permis de constater que notre plante possède un pouvoir antioxydant intéressant. L'extrait hydro-méthanol avait la plus forte activité de piégeage le radical libre DPPH et ABTs avec un CI_{50} de $0,27 \pm 0,025 \text{ mg/mL}$; $0,014 \pm 0,01 \text{ mg/mL}$ respectivement. Le même extrait montré la meilleur capacité antioxydante totale ($20,06 \pm 0,96 \text{ mg EAA/g}$) et le meilleur pouvoir réducteur de fer ($\text{EC}_{50}=1,29 \pm 0,04 \text{ mg/mL}$).

Les essais réalisés in vitro des deux extraits vis-à-vis des GR ont montré que les deux extraits n'étaient pas toxiques.

Notre travail ne constitue qu'une première étape dans la recherche, pour compléter ce travail il serait souhaitable de :

- Identifier puis isoler les composés actifs des feuilles de *L. inermis*
- Etudier les effets synergiques avec les molécules pures
- Développer des agents antioxydants pour des applications thérapeutiques
- Effectuer des tests in vivo de toxicité aiguë, subaiguë et chronique sur des modèles animales.

Références bibliographiques

- **AbdulmoneimSaadabi MA., 2007.** Evaluation d'extraits de feuilles de *Lawsonia inermis* (henné soudanais) comme agent antimicrobien. Res J Biol. Sci ; 2 : Pp : 419-423.
- **AbdelmalekWiem, AazzaSmail,MnifWissem, FaleiroM, Miguel M, 2014.** Antioxydant, anti-inflammatoire et anti-acétyl choline esterase. Activités de feuille, fleur et semence aqueuses extraits de *Lawsonia inermis* de Tunisie. Int J Pharm Pharm Sci, Vol 6, Issue 5, Pp: 445-452
- **Abirami A., Gunasekaran N., Perumal S., 2014.** In vitro antioxydant, anti-diabétique, cholinestérase et tyrosine inhibitrice potentiel de jus frais de *Citrus hystrix* et *C. maxima* fruits. Food Science and Human Wellness, 3 : Pp : 18-22.
- **Afonso, V ; Champy, R ; Mitroic, D ; Collin P et Lomri A., 2007.** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutase : rôle dans les maladies rhumatismales. Revue du rhumatisme, 74 (7) : Pp : 636-643.
- **Ahame S., 2003.** Etude phytochimique et des activités biologiques de balanites aegyptiaca L. (Balanitaceae). Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako Pp : 117.
- **Ahmed Dildar, Muhammad Mehboob Khan et RamshaSaeed, 2015.** Analyse comparative des composés phénoliques, des flavonoïdes et du potentiel antioxydant et antibactérien des extraits méthanoliques, hexaniques et aqueux des feuilles d'*Adiantum caudatum*. 4 (2): Pp : 394-409.
- **Agarwal P., Alok S., Vernal A., 2014.** Une mise à jour sur le henné aux herbes ayurvédiques (*Lawsonia inermis* L.) : une revue. Int J Pharm Sci Res ; 5 ; Pp : 330-9
- **Aguiar-Martinez., 2007.** H2-Erythrocytes-MB7 : Hématologie H2- Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes
- **Ajitha B., Ashok Kumar Reddy Y., SreedharaReddy P., Suneetha Y., Hawan-Jin Jeon., et Chi Won Ahn., 2016.** Instant biosynthèse de nanoparticules d'argent à partir de l'extrait de feuille de *Lawsonia inermis* : activité antibactérienne, antioxydante et antiprotéolytique. J. of molecular liquids 2019 (2016) Pp : 474-481
- **Alain Damier., 2002.** Guide du traitement des déchets. 3^e Edition. Dunod Paris.
- **Ardestani A., Yazdanparast R., 2007.** Effets inhibiteurs de l'extrait d'acétate d'éthyle de *Teucrium polium* sur l'oxydation protéique in vitro. Food and chemical toxicology, 45 : Pp : 2402-2411.
- **Arun P, Purushotham KG, Jayarani J, Kumari V., 2010.** Activité antibactérienne in vitro et contenu en flavonoïdes de *Lawsonia inermis*. Int J Pharm Tech Res ; 2 : Pp : 1178-1181
- **Ashnagar, A., Shiri, A., 2011.** Isolation et caractérisation de 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (LAWSONE) à partir des feuilles broyées de la plante de henné commercialisée dans la ville d'Ahwaz en Iran. Int. J. Chem. Tech. Res. 3, 1Pp: 941-944.
- **Baba L et Mcgrath IM., 2008.** Radicaux libres : effets dans la période néonatale. Advances in Neonatal Care 8 Journal. Pp: 256-264.

- **Babili, F.E., Valentin, A., Chatelain, C., 2013.** *Lawsonia inermis*: Its anatomy and its antimalarial, antioxidant and human breast cancer cells MCF7 activities. *Pharm. Anal* ;4 : Pp : 6.
- **Badiaga, M., 2011.** Etude ethnobotanique, phytochimiques et activités biologiques de *Nauclea latifoliasmith* une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako10 Pp : 183.
- **Badonisemwal R; Deepk Kumar semwal, Sandracombrinck 2014.** *Lawsonia inermis L.* (henna): Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological aspects. *Journal of Ethno pharmacology* : Pp : 1-24
- **Banerjee A., Kunwar A., Mishra B., Priyadarsini K. I., 2008.** Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of *curcumin*: Studies from AAPH in duced hemolysis of RBCs. *Chemico-Biological Interactions*, 174: Pp: 134-139.
- **Baynes RE & Hodgson E., 2010.** Absorption and Distribution of Toxicants. In: *A Textbook of Modern Toxicology*. 4 th ed. John Wiley& Sons. Inc (Hoboken, New Jersey), Pp: 79-114.
- **Bellamine Kawtar., 2017.** La phytothérapie clinique dans les affections dermatologique. Thèse de doctorat. UNIVERSITE MOHAMMED V – RABAT. Pp : 10-11
- **Benhamama L., 2015.** Contribution à l'étude phytochimique et évaluation de l'activité Antioxydante de la plante médicinale *Crataegus monogyna*. Mémoire de master en biologie. Université Frères Mentouri Constantine
- **Ben hasouna A., Trigui M., Culioli G., Blache Y., Jaoua S., 2011.** Antioxidant constituents from *Lawsonia inermis* leaves: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity: *Food Chemistry* . 125: Pp: 193–200.
- **Ben M'Rad S., Merai S., Grairi H., Yaalaoui S., Tritar F. et Djenayah F., 2004.** Allergie immédiate au henné pur. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*;44 : Pp : 159–160.
- **Benyahkem Meriem, LamriKhaoula., 2017.** Contribution à l'étude de l'activité antioxydante des extraits phénoliques des trois espèces : *Punica granatum L.* (Grenadier) ; *Zeamays L.* (Maïs) et *Lawsonia inermis L.* (Henné). Mémoire du master UNIVERSITE de OUARGLA : Pp :41.
- **Bezanger - Beau Quesne L- Pinkas. M., Torck M.,1986.** Les plantes dans la thérapeutique moderne 2ème édition MALOINE –Paris Pp : 262-268
- **Bismuth C, Baud F, Fréjaville P.P., Garnier R., 1987.** Toxicologie clinique. Flammarion Médecine science. Paris : Pp : -956.
- **Boizot, N et Charpentier, J.P.,2006.** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier. INRA Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques ;18 : Pp : 79- 82.

- **Bonnaillie C., Salacs M., Vassiliova E., Saykova I., 2012.** Etude de l'extraction de composés phénoliques à partir de pellicule d'arachide *Arrachis hypogaea* L. Revue de Génie Industriel, 7 : Pp : 35-45.
- **Bonvalot N, 2002.** Méthode d'élaboration : 14.
- **Borade AS., Kale BN., Shete RV., 2011.** Une revue phytopharmacologique sur *Lawsonia inermis* (linn.). Int J Pharm Life Sci 2011 ; 2 : Pp : 536-41
- **Bruneton, J., 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). Lavoisier.
- **Chang S. T., Wu J. H., Wang S. Y., Kang P.L., Yang N. S., Shyur L. F., 2001.** Antioxydant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49 : Pp : 3420-3424.
- **Carrière, A. Galinier, A. Fernandez, Y. Carmona, M.C. Pénicaud, L. and Casteilla, L., 2006.** Les espèces actives de l'oxygène : le yin et le yang de la mitochondrie. Médecine / Sciences, 221 : Pp : 47-53
- **Cartwright-Jone C., 2006.** The Geographie of the Black Henna Meme Organism and the Epidemic of Para-phenylenediamine Sensitization: *A Qualitative History*.
- **Cetkovic G., Canadanovic-Brunet J., Djilas S., Savatovic S., Mandi A., TumbasV., 2008.** Assessment of polyphenolic content and in vitro antiradical characteristics of apple pomace. *Food Chemistry*, 109, Pp : 340-347.
- **Chakrabartty T., Poddar G. et Pyrekt JS., 1982.** Isolation of dihydroxylupene And dihydroxylupane from the bark of *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*. 21: Pp : 1814-1816.
- **Charpentier B., Hamon-Lorléac'h F., Harlay A., Ridoux L. et Chansellé S. (2008).** Guide du préparateur en pharmacie. Elsevier Masson 3^{ème} Édition.
- **Chaudhary G., Goyal S., Poonia P., 2010.** *Lawsonia inermis linnae us*: à phytopharmacological review, Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.2; Pp: 91-98.
- **Chouikh A., Alla F., Neffar S., Rebiai A., Adjaj EL., Chefrour A., 2018.** Evaluation of phenolic contents (quantitative and qualitative) and antioxidant activities in different physiological phases of *Genista Sahara* (Coss. & Dur.) growing in the Sahara of Algeria. Tom. XXV, 2: Pp : 115-121.
- **Crichton R. R., Wilmet S., Legssyer R., Ward RJ, 2002.** Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 91(1): Pp: 9-18
- **Crozier A, M. N. Clifford, H. Ashihara., 2006.** Plant Secondary Metabolites, Blackwell Publishing, Oxford UK.
- **Davies K. J., 2000.** Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50 : Pp : 279-289.

- **Deore, S. L ; Khadabadi, S. S ; Baviskar, B.A ; Khangenbam, R.A ; Koli, U.S ; Daga, N.P ; Gadbail, P.A ; and Jain, P.A., 2008.** In vitro antioxidant activity and phenolic content of *Crotoncaudatum*. International Journal of Chemistry Technology Research, 1 (2): Pp: 174-176.
- **Derbré, S., 2019.** Phytothérapie et troubles urogénitaux, sélectionner des produits efficaces et sûrs. Actualités Pharmaceutiques, 58(588), Pp : 38–42.
- **Dhananjay Kumar Singh, Suaib Luqman, Ajay Kumar Mathur., 2015.** *Lawsonia inermis L.* A commercially important prima evaldying and medicinal plant with diverse pharmacological activity. Industrial Crops and Products; 65: Pp: 269–286
- **Djeridane A., 2008.** Evaluation du pouvoir antioxydant et de l'inhibition d'enzymes (la carboxylestérase et l'Acylase) par des extraits phénoliques de dix-neuf plantes médicinales locales. Thèse de doctorat en sciences, Ecole Normale Supérieur de KOUBA, Alger. Pp : 150.
- **Dr. Hans W. Kothe., 2007.** 1000 plantes aromatiques et médicinales : -189
- **Ebrahimzadeh M.A., Pourmorad F., Hafezi S., 2008.** Antioxidant activities of irani an corn silk. Turk Journal of biol, 32 : Pp : 43-49.
- **Edeas, M., 2007.** Les polyphénols et les polyphénols de thé. Phytothérapie, 5(5) : Pp : 264- 270
- **Enneb H, A. Belkhadhi, F. Cheour et A. Ferchichi., 2015.** Comparaison des composés phénoliques et du pouvoir antioxydant de la plante de henné (*Lawsonia inermis L.*). / Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology, 20(2) : Pp : 788-793
- **Ernst E., 2000.** Adverse effects of *herbai* drugs in dermatology. British Journal of Dermatology; 143: Pp : 923-929.
- **Estelle dauvin., 2009.** Intoxication par les plantes. Faculté de médecine de nancy. thèse de doctorat en médecine. . Université henripoincarénancy1.Paris.
- **Favier A., 2003.** Le stress oxydant, Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'act. Chim Pp : 108-115.
- **Finkel T., Holbrook N. J., 2000.** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408 : Pp : 239–247.
- **Francoise Marc, Andre Davin, Laurence Deglene-Benbrahim, Carine Ferrand, Michel Baccaunaud et Pierre Fritsch., 2004.** Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in food. Med Sci (Paris); 20: Pp: 458–463
- **Frankel E., 1995.** Nutritional benefits of flavonoids. International conference on food factors: Chemistry and Cancer Prevention, Hamamatsu, Japan. Abstracts;C6-2.

- **Gabriel AdetoyeAdedeji; OlukayodeYekinOgunsanwo; TaiwoOlayemiElufioye., 2017.** Quantifications of phytochemicals and biocide actions of *Lawsonia inermis linn.* Extracts against wood termites and fungi. / International Biodeterioration & Biodegradation; 116: Pp: 155-162
- **Govindarajan R., Vijayakumar M., Pushpangadan P., 2005.** Antioxidant approach to disease management and the role of “Rasayana” herbs of Ayurveda. Journal of Ethno pharmacology, 99 : Pp : 165–178.
- **Gozubuyuk G. S ; Aktas E ; Yigit N.,2014.** An ancient plant *Lawsonia inermis* a (henna): determination of in vitro antifungal activity against dermatophytes species. Journal de mycologie médicale (2014) : Pp : -490 ; 1- 6
- **Gupta S; Ali M; Alam M; Niwa M; et Sakai T., 1992.** 24, β ethylcholest-4en-3 β -ol from the roots of *Lawsonia inermis*. Phytochemistry.31: Pp: 2558 -2560
- **Gupta S., Ali M. et Alamo M.S. (1993).** A naphthoquinone from *Lawsonia inermis* stem bark. *Phytochemistry*. 33: Pp : 723-724.
- **Haleng J; Pincemail J; DefraingneT.O; Charlier C; Chapelle Jp., 2007.** Oxidative stress. Rev Med liege. 62 : Pp : 628-638.
- **Halliwell B, et Whiteman M., 2004.** Measuring reactivities species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean ? Br J Pharmacol ; 142 : Pp : 231-255.
- **Hamhami A., 2013.** Synthèse et réactivité de la *purpuro galline*. Mémoire en chimie option Catalyse et Chimie verte. Université Abou-Bakr Belkaid- Tlemcen.
- **Hartmann, T., 2007.** From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry.
- **Hasouna. B., Trigi, M., Clioli, G., Blace, Y., & Jaoa, S., 2011.** Antioxidant activities of Lawsonia and saffron: in vitro, in vivo and in cell culture. Food Chemistry, 125(1), Pp: 193-200.
- **Havsteen, B. H., 2002.** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & therapeutics, 96(2-3), Pp : 67-202.
- **Hellal Z., 2011.** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites de citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoires de Magister en biologie, université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. Algérie. Pp : -78
- **Hernández I., Alegre L., Van Breusegem F., Munné-Bosch S., 2009.** How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*, 14 :125–132. Food Chem, 53: Pp : 1841-1856.

- **Hoffman R. M., (2008).** Imaging in Mice with Fluorescent Proteins: From Macro to Sub cellular. Sensors, vol. 8 : Pp : 1157-1173.
- **Horde. P. (2014).** Hémolyse – Définition. Santé médecine (Sante-medecine.commentcamarche.net). (Site Consulter le 18/04/2020).
- **Houghton P.J. (2000).** Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. Phytotherapy Research. 14 (6): Pp: 419 – 423.
- **Huang D., Ou B., Prior RL., 2005.**The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. J. Agric. Food Chem, 53: Pp : 1841-1856.
- Jeyaseelan, E.C., Jenothiny, S., Pathmanathan, M., Jeyadevan, J., 2012.** Antibacterial activity of sequentially extracted organic solvent extracts of fruits, flowers and leaves of *Lawsonia inermis L.* from Jaffna. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2, Pp : 798–802
- **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.
- **Julkunen-Titto R., 1985.** Phenolic constituents in the level north willows: Methods for precursors of clarified apple juice sediment. Journal of Food Science, 33 : Pp : 254-257.
- **Karagözler A. A., Erdağ B., Emek Y. Ç., Uygun D. A., 2008.** Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystiechashastata*. Food Chemistry, 111 : Pp : 400-407.
- **Kazandjieva.J., Grozdev.I. Ettsankov.N., 2007.**Temporary henna tattoos. Clinic in Dermatology; 25, Pp : 383-387.
- **Kechida et Meghiche., 2019.** Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *Saccocalyx Satureioides*. Mémoire UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA. Pp : -12
- **KerharoJ,etGadamJ. 1981.** Les plantes médicinales et toxiques. Ed Vigots frèresPp : 517-518.
- **Khare C.P., 2007.** Indian Medicinal Plants. Springer Science +Businessn Media, LLC.
- **Kim D K, Lee C Y., 2004.** Comprehensive study on vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC) of Various Polyphenolics in Scavenging a Free Radical and its Structural Relationship. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 44 : Pp : 253-273.
- **Kirkland D, Marzin D., 2003.** An assessment of the geno toxicity of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, the dye ingredient of henna. Mutat Res ; 537 : Pp : 183-199.
- **Klaus V., Hartmann T., Gambini J., Graf P., Stahl W., Hartwig A. et Klotz L. (2010).** 1,4-Naphthoquinones as inducers of oxidative damage and stress signaling in Ha CaT human keratinocytes. Arch. Biochem. Biophys. 496: Pp: 93–100.

- **Koechlin-Ramonatxo, C. (2006).** Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20 : Pp : 165-177.
- **Kubola J, Siriamornpun S., 2008.** Phenolic contents and antioxidant activities of bitter melon (*Momordica charantia L.*) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food chemistry*, 110(4): Pp : 881-8.
- **Kurman R.J., Norris H.J., 2010.** Endometrial sinus tumor of the ovary: a clinical and a pathologic analysis of 71 cases *Cancer*; 38: Pp: 2404-2419.
- **Kumar, M., Kumar, S., Kaur, S., 2014.** Identification of polyphenols in leaf extracts of *Lawsonia inermis L.* with antioxidant, antigenotoxic and antiproliferative potential. *Int. J. Green Pharm.* 8, Pp : 23–30
- **Lavai R., 2008.** Le Henné, La plante aux multiples usages
- **Leblanc GA., 2010.** Acute toxicity: A Textbook of Modern Toxicology. Hoboken, New Jersey. (4): Pp : 125-236.
- **Lee J. Y. S., Cho P.Y., Kim T. Y., Kang S. Y., Song K. Y., Hong S. J., 2002.** Hemolytic activity and developmental expression of pore-forming peptide clonerin. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 296: 1238-1244.
- **Lekouch N., Sedki A., Nejmeddine A., et Gamon S., 2001.** Lead and traditional Moroccan pharmacopoeia. *The science of total environment* ;280; Pp 39-43
- **Lien E.J., Ren S., Bui H.H. & Wang R., 1999.** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants, *Free Radic Biol Med*, 26: Pp: 285-294.
- **Lugasi A., Hovari J., Sagi K.V., Biro L., 2003.** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica Szegedensis*. 1-4.125- 119.

- **Mac Laren D., 2007.**Advances in sports and exercise science series. Nutrition and Sport. Antioxidants and free radicals by Close GL and Mc Ardle F. Elsevier.
- **Macheix, J. J., Fleuriet, A., & Jay-Allemand, C., 2005.** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses polytechniques.
- **Mady Pirard., 2016.** "Initiation à la phytothérapie, Guide pratique d'une herboriste" - Edilivre-Aparis. Pp : 186.
- **Magder S., 2006.** Reactive oxygen species. Toxic molecules or spark of life? crit care: Pp: 208-2016
- **Makkar H., Becker K., 1997.**Degradation of quillaja saponins by mixed culture of rumen microbes. Letters in Applied Microbiology, 25(4), Pp : 243-245.
- **Makkar H.P.S.,2000.** In Quantification of tannins in tree foliage" Working document, FAO/IAEA, Vienna.
- **Matulich J. et Sullivan J., 2005.** A temporary henna tattoo causing hair and clothing dye allergy. Contact Dermatitis; 53: 33-36.
- **Maqtar, Q.A.A.A., Maqtari, M.A.A., 2014.**In Vitro Antibacterial activity of Different Yemeni Leaves extracts of *Lawsonia inermis* against Some Bacterial Pathogens. Int. J. Res. Stud. Bio sci. 2, Pp: 52–57.
- **Mekkiou R; Touahar H; Dijoux-franca M. G; Mariotte A. M; Benayache S; Benayache F., 2005.** A new isoflavone from *Genista saharae* (*Fabaceae*). Biochemical Systematics and Ecology, 33:Pp: 635-638.
- **Merabet Hadj Sahraoui., 2018.** Evaluation de la corrélation du stress oxydatif et le syndrome du surentrainement et leurs impacts sur les indices de la performance physique chez les jeunes athlètes. Thèse de doctorat. Université Mostaganem. Pp : 61-62.
- **Merghem R., 2009.** Eléments de biochimie végétale. Edition Bahaeddine Pp : 107-133
- **Mighri,H;Halaoui,Akrout,A ; Najjaa,H ; andNeffati,M., 2010.**Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisi anaridzone. Clinical Review of Chimie 13: Pp: 380-386.
- **Mikhaeil BR, Badria FA, Maatooq GT, Amer MMA., 2004.** Antioxidant and Immunomodulatory Constituents of Henna Leaves. Z. Naturforsch. 59c: Pp: 468-476.

- **Mohsin, A., Shah, A.H., Al-Yahya, M.A., Tariq, M., Tanira, M.O.M., Ageel, A.A., 1989.** Analgesic, antipyretic activity and phytochemical screening of some plants used in traditional Arab system of medicine. *Fitoterap.* 60, Pp : 174–177.

- **Moon J.K; Shibamoto T., 2009.**Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57: Pp: 1655-1666.
- **Nohynek G. J., Fautz R., Benech-Kieffer F. et Toutain H., 2004.**Toxicity and human health risk of hair dyes. *Food and Chemical Toxicology*; 42: Pp: 517-543.

- **NurAlam M., Bristi N., Rafiquzzaman M., 2013.**Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. (21) :Pp : 145-149.

- **Ojewunmi O.O., Oshodi T., Ogundele O.I., Micah C., Adenekan S., 2014.**In vitro antioxidant, antihyperglycaemic and antihyperlipidaemic activities of ethanol extract of *Lawsonia inermis* leaves. *British journal of pharmaceutical research*, 4(3): Pp: 301-314.

- **Okpekon, T., Yolou, S., Gleye, C., Roblot, F., Loiseau, P., Bories, C., Grellier, P., Frappier, F., Laurens, A., Hocquemiller, R., 2004.**“Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast”. *J. Ethano pharmacol.* 90, Pp : 91–97.

- **Olivier Lebert., 2005.** Le Karité et le Henné ; deux matières premières Africaines à fort pouvoir culturel local utilisées dans les cosmétiques. Thèse de Doctorat d'état en pharmacie : Université de Nantes. Faculté de Pharmacie : N° 34 : Pp : -62.

- **OMS, (2008).** Rapport sur la santé dans le monde. Les soins de santé primaires : maintenant plus que jamais.

- **Ouedroago Y., Nacoui.MA O., Guissou I.P. et GuedeGuina F.2001.** Evaluation in vi vo et in vitro de la toxicité des extraits aqueux d'écorce de tige et de racine de *Mitragyna inermis* (Willd).O.Ktz (RUBIACEAE). *Pharm. Méd. Trad. VoU1*, Pp :13-29

- **Oyesola O. Ojewunmi, Tope Oshodi, Omobolanle I. Ogundele, Chijioke Micah and Sunday Adenekan, 2014.** In vitro Antioxidant, Antihyperglycaemic and Antihyperlipidaemic Activities of Ethanol Extract of *Lawsonia inermis*. *Leaves British Journal of Pharmaceutical Research*. 4(3): Pp: 301-314.

- **Paris R. R et Moyses, 1965.** Précis de matière médicale Edition Paris : Masson.
- **Paris R., Moyses H., 1967.** Précis de matière médicale. Masson et Cie, paris 1967 Pp : 453-454.
- **Paul I., 2001.** Encyclopédie des plantes médicinales. Dorling Kindersley Limited, Londres,Pp : 226.

- **Philippe M.,2013.** Les familles des plantes à fleurs d'Europe : Botanique systématique et utilitaire. Presses universitaires de Namur.

- **Philip, J.P, Madhumitha, G., & Mary, S., 2011.** Free radical scavenging and reducing power of *Lawsonia inermis* L. seed Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 4 (6), Pp: 457-461.
- **Philibert C, Hoegy D, Philippe M, et al., 2015.** A French survey on the resort of oral alternative complementary medicines used in children with cancer. Bull Cancer (Paris) ;102 (10) : Pp :854–62
- **Popvici C., Saykova I., Tylkowski B., 2009.** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. Revue du Génie Industriel, 4 : Pp : 26-39.
- **Prieto P; Pineda M; Aguilar M., 1999.** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry :269; Pp: 337-341.
- **Prior R L; Wu X; Schaich K., 2005.** Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. Agric. Food Chem. (53) Pp : 4290-4302.
- **Rahmoun M.N., 2009.** Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique de produit dérivé de LAWSONE : Pp : -8
- **Rahmoun, N., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Benabdallah, M., Choukchou-Braham, N., 2013a.** Antifungal activity of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). Pharmaceut. Biol. 51, Pp : 131–135.
- **Rahmoun, N.M., Atmani, Z.B., Benabdallah, M., Boucherit, K., Villemin, D., Nouredine Braham, N.C., 2013b.** Antimicrobial activities of the henna extract and some synthetic naphthoquinones derivatives. Am. J. Med. Biol. Res. 1, Pp : 16–22.
- **Ratnam, V.D. Ankola, D.D. Baradwaj, V. Sahana, D.K. Ravi Kumar, M.N.V., 2006.** Role of antioxidants in Sciences, Vol 81, Pp. 895-905.
- **Reuter S., Gupta S. C., Chaturvedi M. M., Aggarwal B. B., 2010.** Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free *Radical Biology and medicine*, 49: Pp: 1603–1616.
- **Rhita Zbadi1, Hicham Mohti2, Fadila Moussaoui2., 2018.** Stress oxydatif : évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. Mt 2018 ; 24 (2) : Pp : 134-41
- **Ronald S. Jackson PhD, in Jackson PhD., 2014.** [Constituants chimiques du raisin et du vin.](#) Dans [Wine Science \(quatrième édition\)](#)
- **Roué M. (2011).** Contribution de la flore bactérienne associée au métabolisme secondaire de l'éponge calcaire *Clathrina clathrus*. Thèse de doctorat en Ecologie chimique et microbienne. Université de Pierre et Marie Curie (France).
- **Saeed N, Khan MR, Shabbir M.** Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2012;12: Pp: 221.

- **Sánchez-Moreno C., 2002.** Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 2002; 8: Pp: 121-137.
- **Sahpaz S., 2013.** Composés aromatiques polyphénoliques laboratoire de pharmacogonose EA GRIOTT. Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques Univ Lille 2.
- **Sarita.G. Mohd.A. Sarwar.A. 1991.** Ethycholest 4 and 3 bolls from the roots of *Lawsonia inermis*. *Phytochemistry*, vol 31 n° 7 Pp : 2558-2560.
- **Sarojini, N., Kanti, C.C., Priyanka, J., Kumari, S.U., Das, M.D.S., 2012.** “Correlation between the phytochemical constituents and anthelmintic activity of *Lawsonia inermis* Leaf extracts”. *IJRAP*. 3, 67–70.
- **Sarmi M.P., et Cheymer V., 2006.** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed Lavoisier. Pp : 2 -10.
- **Scherer R., et Godoy H. T., 2009.** Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112 : Pp : 654-658.
- **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, Pp: 827- 831.
- **Schofield P ; D.M. Mbugua ; A.N.Pell., 2001.** Analysis of condensed tannins a review. *Anim. FeedSci. Technol.* Vol. (91), page : 21.
- **Scientific Committee on Consumer Products (SCCP), 2005.** Opinion on *Lawsonia inermis* (Henna) COLIPA N° C169. European Commission, Health& Consumer Protection Directorate-General. Adopted by the SCCP during the 6th pienary meeting of 13.
- **Sies H., 1991.** Oxidative stress : from basic research to clinical application. *Am J Med.*, 91, Pp :31-38.
- **Solabia G, 2000.** A la découverte du hennée et autres espèces associées. *Le petit botanistes* 2000 ; 22 : Pp : 1-2
- **Soualeh, N., &Soulimani, R., 2016.** Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*, 14(1), Pp : 44-57.
- **Stahl et Sies., 2002.** Carotenoids and protection against solaruv radiation. *Skin pharmacol. Appl. Skin physical.* 15 : pp : 292-296.
- **Sun B; JM.Richardo-da-Silvia; I.Spranger., 1998.** "Critical factors of vanillinas say for catechins and proanthocyanidins" *J. of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. (46), Pp: 4267.
- **Thomas L., 2013.** Hemolysis as influence and interference factor. *EJIFCC* vol 13 Pp: 4.
- **Tissier M., 2011.** Contribution à l'étude du stress oxydant chez le chien de cross canin. Thèse Méd. Vét., Lyon.

- **Topçu G ; Ay M ; Bilici A ; Sarikurkcu C ; Ozturk M ; et Ulubelen A., 2007.** A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. Food Chemistry., 103 ; 816-822.
- Uddin N, Siddiqui BS, Begum S, Bhatti HA, Khan A, Parveen S, Choudhary MI., 2011.** Bioactive flavonoids from the leaves of *Lawsonia alba* (Henna). Phytochem Lett, 2011; 4: Pp: 454-458.
- **Valko, M., Leibfritz, D, Moncol, J, Cronin, M.T.D, Mazur, M Telser, J., 2007.**Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J BiochemCell Biol 39 Pp: 44-84.
- **Vermerris W., Nicholson R., 2006.** Phenolic Compound Biochemistry. Springer, Dordrecht, The Netherland, Pp: 211-234.
- **Viala, A., 2005.**Notions sur la toxicologie. In: Toxicologie. 2nd ed. Lavoisier (Paris), Pp : 3-10.
- **Vladimir-Knežević s., Blažković B., BivalŠtefan M., Alegro A., Kőszegi T., & Petrik J.,2011.** Antioxidant activities and polyphenolic contents of three selected Micromedia species from Croatia. Molecules, Vol.16, No.2, Pp: 14454-1470, ISSN 1420- 3049.
- **Wallace et Hayes, A., 2008.** Principle and methods of toxicology. Ed Tayler & Francis, New York, Pp : 1134.
- **Yadav S K, Dhote M, Kumar P, Sharma J, Chakrabarti T, Jurvarkar A A., 2010.** Differential antioxidative enzyme responses of *jatropha curcas* L. to chromium stress. J. Hazard. Mater. 180 : Pp : 609-615.
- **Yadav S, Kumar A, Dora J, Kumar A.,2013.** Perspectives essentielles de *Lawsonia inermis*. Int J Pharm Chemical Sci 2013 ; 2 : 888—96.
- **Yusuf, Y., 2006.** Trends Food Sci. Tech. Pp: 17, 64-71
- **Zohourian TH, Quitain AT, Sasaki M., 2011.** Polyphenolic contents and antioxidant activities of *Lawsonia inermis* leaf extracts obtained by microwave-assisted hydrothermal method. J Microw Power Electromagn Energy 2011; 45: 193-204.
- **Zouhri. A, A. Bousfiha et L. Aarab., 2017.** Evaluation of antioxidant properties, anti-inflammatory and photoprotective effects of *Lawsonia inermis* lipids: 15: Pp: 67–71