

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Blida 1

Faculté des Sciences de la Nature et la Vie

Département de Biologie des populations et organismes

Mémoire de Fin d'Études en vue de l'obtention du Diplôme de
Master académique en Biologie

Option : Phytothérapie et Santé

Evaluation de quelques activités biologiques du Cresson de fontaine

Nasturtium officinale R.Br.

Présenté par

Khaldi Soumia

Devant le jury composé de :

M^{me} Faidi	MAB/BPO	Présidente
M^{me} Benassel	MAA/BPO	Examinatrice
M^{me} Touaïbia	MAA/BPO	Promotrice

☪ Promotion : 2015-2016 ☪

Dédicaces

Je dédie ce mémoire :

A mon cher frère Mohammed qui j'aurais aimé se sois là à mes cotés, partager ce moment crucial, que dieu l'accueille dans son vaste paradis.

A mes chers parents qui mon apporté de l'aide et m'ont toujours poussée vers l'avant. Pour tous leurs sacrifices, leur inquiétude, je leur serai toujours reconnaissante.

A mes chers frères, Hakim & Abbese.

A mes chères sœurs, Aicha, Fouzia, Nora, Hajira, Wahiba,

A mes belles sœurs, Assia & Samira.

A ma chère, Dr Aouad Sarah

A mon mari, chaouki.

Et à tous les membres de Ma famille ainsi Mes amis.

Remerciement

Je remercie avant tout ALLAH - le tout puissant- de m'avoir guidé durant toute ma formation.

Merci à mes proche notamment mes parent qui m'ont toujours donné le maximum de ce qu'ils pouvaient, a mes frères Hakim et Abesse, mes Sœurs Aicha, Fouzia, Nora, Djamila, Hajira, Wahiba,, mes neveux et mes nièces, merci pour votre soutien moral et votre amour. Merci à eux pour l'éducation qu'ils m'ont donné.

Je remercie Madame Faidi de nous avoir honoré de présider notre jury de soutenance.

Je remercie Madame Benassel, qui a bien voulu examiner ce manuscrit et pour sa présence par les jurys.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive connaissance à Mme. Touaïbia, enseignante à la faculté de science de nature et de la vie, Université de Blida 1 pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'accordée m'ont permet de réaliser ce travail.

Je tien remercier à l'équipe du groupe Antibiotique SAIDAL-Médéa, pour leur convivialité, et disponibilité.

Je tien particulièrement à exprimer ma gratitude aux Mme ketfi Sabrina, Hiba, Sihem, Hayet, Hajira, et les remercier pour m'avoir aidé énormément.

Je tien à remercier mon âme sœur Docteur Aouad Sarah pour son soutien, sa gentillesse, sa présence dans les moments les plus dures dans ma vie, Sarah Merci pour tous.

Je tien à remercier Mon mari Chaouki pour son soutien.

Je tien à remercier Mme Slama Amina, imene, Sihem Meriem, Mina, Wafa, Samia, Maïssa, leïla Narimen, Sabrina, Wissem, Amel, Djalila, Halima, Samia, Fatima, Amira, Kaouther, Meriem, Asma, foued, Seifeddine, Mr djamel.

TABLE DES MATIERES

Résumé

Abstract

Listes de Tableaux

Liste de Figures

Liste des Abréviations

Introduction 1

Chapitre I : Partie Bibliographique de la plante Etudiée : *Nasturtium officinale*

I.1 .Généralité sur la phytothérapie	3
I.2. Place de la phytothérapie en Algérie	3
I.3. Plantes médicinale	3
I.3.1. Récolte des plantes médicinale	4
I.4. Présentation de la plante étudiée	4
I.4.1. Historique	4
I.4.2. Famille des Brassicaceae	4
I.4.3. Nomenclature	5
I.4.4. Systématique	5
I.4.5. Description botanique	5
I.4.6. Habitat et répartition géographique	8
I.4.7. Culture	8

I.5. Compositions chimique	8
I.6. Usage de la plante	9
I.7. Toxicité de la plante	9

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II.1. Matériel biologique	10
II.1.1. Matériel végétale	10
II.1.2. Matériel animale	11
II.1.3. Milieux de culture et réactifs chimique	12
II.1.4. Les souches microbiennes	12
II.2. Matériel non biologique	13
II.3. Etude phytochimique de l'espèce <i>Nasturtium officinale</i>	13
II.3.1. Screening phytochimique	13
II.4. Caractérisations physicochimique de la poudre végétale	15
II.4.1. Détermination du taux d'humidité dans la poudre végétale	15
II.4.2. Détermination de la teneur des substances extractibles	15
II.4.3. Détermination des cendres totales	16
II.4.4. Détermination du potentiel hydrogène	17
II.5. Extraction par solvant	18
II.5.1. Extraction à chaud par Soxhlet	18
II.6. Evaluation de l'activité antioxydante <i>in vitro</i>	20
II.7. Evaluation de l'activité antimicrobienne	21
II.8. Etude de toxicité aigue par voie orale	23

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Résultats de l'étude phytochimique	25
III.1.1. Screening phytochimique	25
III.2. Résultats de la caractérisation physicochimique	26
III.3. Rendement de l'extraction	26
III.4. Résultats de l'activité antioxydante	27
III.5. Résultats de l'Activité antimicrobienne	29
III.6. Etude de toxicité aigue par voie orale	31

Conclusion	33
-------------------	----

Références Bibliographiques	35
------------------------------------	----

Annexes

Résumé

Nasturtium officinale est une plante médicinale appartenant à la famille des Brassicaceae. Cette espèce pousse spontanément en Algérie, elle est connue sous le nom de "cresson de fontaine" ou "القرنوش"

La partie aérienne de la plante séchée (tiges et feuilles) a été soumise à une extraction éthanolique par un montage de type soxhlet, l'extrait sec a donné un rendement de 16,38 %.

L'étude phytochimique de l'infusé et la poudre végétale de *Nasturtium officinale* a révélé une présence importante des flavonoïdes, des saponosides, des tanins et des coumarines. Tandis-que nous avons noté l'absence des mucilages, des anthocyanes, des anthraquinones, et de l'amidon.

Cependant l'examen physico-chimique de la poudre végétale a démontré que la plante se caractérise par un taux d'humidité conforme aux normes décrites par la pharmacopée européenne (<15). La teneur des cendres a avoisiné 16,45% alors que les taux des substances extractibles dans l'eau et dans l'éthanol étaient estimés à 7.4694 % et 5.11% respectivement. Le pH s'est avéré légèrement acide (6,28).

D'autre part, l'étude des activités biologiques à savoir l'activité anti-oxydante que nous avons réalisé par la méthode de piégeage de radicaux libres par le DPPH a permis de noter une EC50 de 93.694 mg/ml par rapport à la vitamine C.

De plus, l'activité anti microbienne a été déterminé sur huit souches microbiennes selon la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé, Les résultats ont montré que l'extrait a un effet inhibiteur envers la souche *Saccharomyces cerevisiae* avec une zone d'inhibition de 23mm de diamètre, et aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les autres souches microbienne testées.

l'étude de la toxicité aigue de l'extrait aqueux préparé à partir de la concrète alcoolique de *Nasturtium officinale*, administré par voix orale à des souris de souche N.M.R.I, a démontré que la DL50 est comprise entre 80 et 100 mg/kg, témoignant de son caractère modérément toxique.

Les mots clés : *Nasturtium officinale*, Soxhlet, Activité antioxydante, Activité antimicrobienne, Toxicité aigue,

Abstract

Nasturtium officinale is a medicinal plant which belongs to the Brassicaceae family. This species grows in Algeria, it's named the "watercress" or "القرنوش"

The aerial part of the dried plant (stems and leaves) was subjected to an ethanol extraction by Soxhlet, the dry extract gave a yield of 16.38%.

The phytochemical study of the infusion and powder of *Nasturtium officinale* has revealed an important presence of flavonoids, saponins, tannins and coumarins. While- we noted the absence of mucilages, anthocyanins, anthraquinones, and starch.

However, the physico-chemical examination of the plant powder showed that this plant has a humidity rate which meets the standards described by the European Pharmacopoeia (<15). The ashes content were around 16.45% while the rate of extractables in water and ethanol were estimated at 7.4694% and 5.11% respectively. The pH was slightly acidic (6.28).

On second part, we have done the study of biological activities firstly the antioxidant activity have achieved by free radical scavenging activity test DPPH, we noted an EC50 of 93.694 mg / ml compared with vitamin C.

In addition, the antimicrobial activity was determined on eight microbial strains according to the disk diffusion method on an agar medium. The results showed that the extract had an inhibitory effect against *Saccharomyces cerevisiae* strain with a zone of inhibition equal to 23mm in diameter, and no inhibiting effect against the growth of all other tested microbial strains.

The study of the oral acute toxicity of the aqueous extract prepared from the alcoholic dry extract of *Nasturtium officinale*, on strain of mice N.M.R.I proved that the LD50 is between 80 and 100 mg / kg, witnessing on its character moderately toxic nature.

Keywords: *Nasturtium officinale*, Soxhlet, antioxidant activity, antimicrobial activity, acute toxicity,

الملخص

Nasturtium officinale هي نبتة ذات طابع طبي تنتمي الى عائلة Brassicaceae.

هذه النبتة تنمو بشكل عشوائي بالجزائر، انها معروفة باسم "جرجير الماء" أو "القرنوش".

16.83% قدر مردود الاستخلاص بالمنقع في الايثانول باستعمال جهاز Soxhlet للجزء الهوائي للنبتة (السيقان والأوراق) ب

كشفت الدراسة الكيميائية النباتية للمنقوع والمسحوق الخاص بالنبتة المدروسة وجود الفلافونيدات، الصابونوزيد، والكومارين. وفي حين أن لاحظنا عدم وجود الصمغ، الانثوسيانين، الانتراكينون والنشاء.

بينما التحاليل الفيزيوكيميائية للمسحوق النباتي والمنقوع كشفت أن النبتة تتميز بنسبة رطوبة موافقة للمعايير المحددة بدستور الأدوية (<15)، اجمالي الرماد قارب 16.45 %، في حين أن نسبة المواد القابلة للاستخراج في الماء و في الميثانول قدرت ب 7.4694 % و 5.11% بالترتيب. درجة الحموضة حامضية قليلا (6.28).

سمح بتسجيل التركيز من جهة أخرى دراسة النشاطات البيولوجية. النشاط المضاد للأكسدة الذي حقق بطريقة محاصرة الجدر الحر DPPH للمنقوع الفعال الذي قدر ب 93.649 مغ/مل مقارنة بالفيتامين سي.

من ناحية أخرى أبدى النشاط المضاد للجراثيم على ثمانية سلالات ميكروبية بطريقة انتشار الأقراص في وسط هلامي.

النتائج أظهرت أن المستخلص له تأثير خاص ضد خميرة *Saccharomyces cerevisiae*

والتي بلغ مقدار المنطقة المثبطة ب 23 مم وليس له تأثير مثبط على نمو كل السلالات الجرثومية المدروسة الأخرى.

كما أظهرت دراسة تأثير السمية عن طريق البلع للمستخلص المائي الذي تم تحضيره باستخدام المستخلص الكحولي لنبتة *Nasturtium officinale* أن الجرعة القاتلة لفئران من سلالة N.M.R.I بنسبة 50% قدرت ما بين ال 80 و ال 100 مغ/كغ والتي تشهد على طبيعته المتوسطة السمية.

الكلمات المفتاحية: جرجير الماء, Soxhlet, النشاط المضاد للأكسدة, النشاط المضاد للجراثيم, السمية القاتل

LISTE DES TABLEAUX

Titre	Page
Tableau 1: coordonnées géographiques du site de récolte	10
Tableau 2: Souches microbiennes utilisées	12
Tableau 3: Classes de toxicité : échelle de Hodge et Sterner	24
Tableau 4: Résultat de la mise en évidence de quelques composées chimiques	25
Tableau 5: Caractères physicochimiques de la poudre végétale	26
Tableau 6: Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus	26
Tableau 7: Pourcentage de l'activité anti-radicalaire	27
Tableau 8: Résultats de l'activité antimicrobienne l'extrait aqueux de <i>N. officinale</i>	29
Tableau 9: Taux de mortalité des souris après gavage de l'extrait de <i>N. officinale</i>	32

LISTE DES FIGURES

Titre	Page
Figure 1: Partie aérienne du <i>Nasturtium officinale</i>	7
Figure 2: Morphologie de la Feuille du <i>Nasturtium officinale</i>	7
Figure 3: Morphologie de la racine du <i>Nasturtium officinale</i>	7
Figure 4: partie aérienne du cresson de fontaine	11
Figure 5: feuilles et tiges du cresson de fontaine après séchage	11
Figure 6: poudre végétale (cresson de fontaine)	11
Figure 7: poudre conservé dans des sacs en papier	11
Figure 8: Incinération de la poudre végétale	17
Figure 9: Extraction par le montage du Soxhlet	19
Figure 10: Elimination du solvant par un évaporateur rotatif	19
Figure 11: Réalisation des suspensions microbienne	22
Figure 12: Aspect et couleur de l'extrait éthanolique	27
Figure 13: Pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de <i>N.officinale</i> à 517 nm	28
Figure 14: zones d'inhibition de la croissance d' <i>Aspergillus niger</i> et <i>Candida albicans</i>	30
Figure 15: zone d'inhibition de la croissance de <i>Saccharomyces cereviciae</i> .	30
Figure 16: zones d'inhibition de la croissance de <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Sarcina lutea</i>	30
Figure 17: zone d'inhibition de la croissance d' <i>E.coli</i>	30
Figure 18: zone d'inhibition de la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>	30
Figure 19 : zone d'inhibition de la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30

LISTE DES ABRIVIATIONS

- **ATCC** : American Type Culture Collection.
- **APG** : Angiosperms Phylogeny Group.
- °C: degré Celsius
- **DL** : Dose Létale.
- **DO** : Densité optique.
- **DPPH** : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl
- **EC** : Concentration effectrice.
- **FeCl₃** : chlorure ferrique
- **H**: heure
- **KOH** : hydroxyde de potassium
- **nm** : nanomètre
- **NMRI** : Naval Medical Research.
- **O.N.A.B** : Office National *Alimentation* Bétail
- **OMS** : Organisation Mondiale de Santé.
- **R%** : rendement.
- **µl** : microlitre
- **UV-Vis** : ultraviolet Visible
- **V** : volume

Introduction

Depuis des temps immémoriaux, les plantes ont servi comme première source de médicaments pour les hommes, et elles ont continué à fournir à l'humanité, des remèdes thérapeutiques nouveaux et originaux (**Leduc et al., 2006**). Certaines plantes médicinales sont d'un grand support pour l'industrie pharmaceutique et ont un impact économique (**Lesely, 1997**).

Le continent africain est doté d'une biodiversité la plus riche dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles ont été identifiées et beaucoup d'entre elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies (**Pousset, 2004**).

L'Algérie se caractérise par une aire géographique et une diversité floristique très riche, surtout en plantes médicinales spontanées et cultivées (**Ozenda, 1977**), bien que leur usage est très ancien en médecine traditionnelle, mais leur exploitation dans le domaine pharmaceutique reste toutefois très restreint, car il suscite des études approfondies pour affirmer leurs vertus. C'est dans cet axe que nous sommes intéressés à étudier une plante qui pousse spontanément en Algérie, appartenant au genre *Nasturtium*, il s'agit de l'espèce méditerranéenne *Nasturtium officinale*, appelée communément : *le cresson de fontaine*.

L'objectif de travail vise à démontrer la richesse de cette plante en composés actifs et mettre en évidence quelques unes de ses vertus indiqués par les tradi-praticiens, vue qu'il n'y a que très peu d'études qui se sont intéressé à dévoiler les vertus de cette plante , bien que sa consommation dans notre pays en tant qu'espèce potagère fut très ancienne .

Pour ce faire, notre étude sur *Nasturtium officinale* a porté sur :

- La caractérisation de quelques métabolites secondaires de la plante par un screening chimique.
- La caractérisation physico-chimique de la poudre de tiges feuillées séchées.
- l'extraction par épuisement à chaud de la poudre végétale, à l'aide d'un solvant polaire : Éthanol, en utilisant un montage de type Soxhlet, en vu d'obtenir une concrète alcoolique.

- L'évaluation du pouvoir anti-oxydant *in vitro* par une méthode spectrométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

- L'évaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé

- l'évaluation de la toxicité aigue par voie orale sur des souris de souche N.M.R.I

Chapitre I

Partie bibliographique

I.1. Généralités sur la phytothérapie :

Selon **Scimeca et Tétou (2005)**, la phytothérapie est le traitement par les plantes, du grec, « **phyton** » qui signifie plantes et « **thérapeia** » qui veut dire soin ou cure.

Elle existe depuis les temps les plus reculés et tire ses ressources exclusivement des plantes (**Iserin, 2001**). C'est une méthode thérapeutique destinée à prévenir et à traiter certains troubles fonctionnels et/ou certains états pathologiques au moyen de plantes, de parties de plantes ou de préparations à base de plantes sous différentes formes et à une dose pondérale (**Wichtl et Anton, 2003 ; Scimeca et Tétou, 2004**).

I.2. Place de la phytothérapie en Algérie :

L'Algérie par ses différents étages bioclimatiques (humide, sub-humide, semi-aride, aride, saharien) avec des hivers variés (très froid, froid, doux, chaud) et compte tenu de sa position biogéographique lui confère un ensemble d'espèces naturelles et cultivées d'une gamme importante et variée, caractérisée par des espèces appartenant à différents éléments géographiques (**Djediou, 2010**).

Dans le Hoggar, en absence de médecins et dans certaines contrées isolées, les Touaregs se soignent avec les plantes médicinales et aromatiques dont ils connaissent le secret transmis de père en fils (**Neffati et Sghaier, 2014**).

De même, en Kabylie, les montagnards utilisent des plantes médicinales et aromatiques pour se soigner (**Neffati et Sghaier, 2014**).

Le recours à la phytothérapie en Algérie a connu un regain très important auprès de la population et ce pour les résultats édifiants, connu et reconnu par une très grande tranche de la population, aussi le monde de nos ancêtres a toujours utilisé cette pratique guérissante naturelle et puisée dans l'histoire de nos aïeux, ayant donné beaucoup de satisfactions, nos chercheurs ne cessent de recourir à la recherche profonde afin de découvrir ces plantes naturelles qui continuent d'aider et de traiter plusieurs pathologies (**Ould El Hadj et al., 2003**).

I.3. Plantes médicinales :

Les plantes médicinales sont utilisées pour prévenir, soigner ou soulager divers maux (**Schauenberg et Paris, 2005**). Se sont des drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses (**Bruneton, 1999 ; Bouzid et al, 2011**). Elles peuvent être utilisées sous forme de poudre, d'extrait, de teinture, d'infusion ou de décoction (**Baba Aissa, 2011**). Cependant, de nombreuses plantes sont toxiques et ne doivent être utilisées que sous forme de principes actifs, comme matières premières ou « précurseurs » pour obtenir un médicament (**Grunwald et Janicke, 2007**).

I.3.1. Récolte des plantes médicinales

Selon l'OMS (2003) :

- ✓ Les plantes médicinales devront être récoltées à la saison ou à l'époque optimale pour assurer la production de matières végétales médicinales et de produits finis de la meilleure qualité possible.
- ✓ Le moment de la récolte dépend de la partie de la plante qui sera utilisée.
- ✓ Le meilleur moment pour la récolte (saison et moment de la journée où la plante est à son maximum de qualité) sera déterminé en fonction de la qualité et de la quantité de constituants biologiquement actifs plutôt que du volume total de la partie de la plante à récolter.
- ✓ Pendant la récolte, on veillera à assurer qu'aucune matière étrangère, mauvaise herbe ou plante toxique n'est mélangée avec les matières végétales médicinales récoltées.

I.4. Présentation de la plante étudiée : *Nasturtium officinale*

I.4.1. Historique

Le cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*) est apprécié depuis longtemps en tant que légume et plante médicinale. Dans l'Antiquité, les Grecs lui attribuaient des vertus contre les troubles mentaux et recommandaient aux sots de «manger du cresson». La phytothérapie européenne utilisait le cresson avant tout pour purifier le sang et le prescrivait jadis comme tonique de printemps (**Iserin, 2001**).

I.4.2. Famille des Brassicaceae

La famille des Brassicacées comprend environ 3 700 espèces, réparties sur toute l'étendue du globe, mais plus abondantes dans l'hémisphère Nord. C'est une famille facile à définir et très reconnaissable par ses

fleurs à pétales disposés en croix, d'où le nom de Crucifères (du latin « cruce[m] ferre », porter une croix) (Dupont et Guignard, 2007).

I.4.3. Nom vernaculaire

Plusieurs dénominations et synonymes ont été attribués au cresson de fontaine, nous citerons quelques exemples :

- ✓ Nom arabe : Guernounech الفرونش (Djerroumi et Nacef, 2004). Guerrino'uch (Quezel et Santa, 1962).
- ✓ Nom français : Cresson de fontaine (Kothe, 2007). Cresson officinal, Cresson d'eau ;
- ✓ Non anglais : Watercress (Voutsina et al, 2016)

I.4.4. Systématique de l'espèce *Nasturtium officinale*

Classification botanique de *Nasturtium officinale* APG III (2009) :

Règne	Plantae
Sous Règne	Trachéophytes
Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Brassicales
Famille	Brassicaceae
Genre	<i>Nasturtium</i>
Espèce	<i>Nasturtium officinale</i> R.Br.

I.4.5. Description botanique de la plante

Le cresson de fontaine est une plante herbacée pérenne pouvant atteindre 60 cm (Kothe, 2007). Elle est semi-aquatique résistante, adaptée aux températures fraîches (Derek et Ernest, 1998).

- **Les racines** : le cresson de fontaine se ramifie beaucoup avant de fleurir et produit de fines racines aux nœuds de la tige (ou prennent aussi naissance les feuilles), et ces racines descendent jusqu'à l'eau ou s'enfoncent dans le sol humide (Ernest et Grace, 2001).

- **La tige :** Elle est ascendante, cannelée et anguleuse, creuse mais épaisse, pratiquement glabre et peut atteindre jusqu'à 25 à 70 cm de long (**Hensel, 2008**).
- **Les feuilles :** elles sont vert foncé, luisantes, persistantes, alternes et pennatiséquées (**Hensel, 2008**). vivace à saveur piquante (**Quezel et Santa, 1962**), de taille qui varie entre 4 et 12 cm de long (**Barker, 2009**).

Les lobes latéraux sont elliptique, entiers ou échancrés, le lobe terminal est arrondi a cordiforme et de plus grande taille ; les 3 à 9 segments foliaires ont globalement une forme de lyre (**Hensel 2008**).

- **Les fleurs :** Elles sont portées par des pédicelles insérés perpendiculairement à l'axe de l'inflorescence ; comprennent 4 sépales à la base disposées en croix, 4 pétales blancs avec des onglets peu distincts, 6 étamines à anthères jaunes, dont 2 plus courtes, les 4 autres dépassent la corolle ; de chaque coté des étamines courtes, se trouve un petit pétale nectarifère vert ; l'ovaire est supère (**Hensel, 2008**).
- **Les fruits :** Le fruit est une silique de 13 à 18 mm de long sur 2 mm de large et de 1,8 à 1,5 mm d'épaisseur, renfermant des graines brunes, globuleuses à ovoïdes, d'environ 1 mm de diamètre et dont la surface est parcourue d'une ornementation hexagonale formant un réseau grossier (graines réticulées) (**Hensel, 2008**).

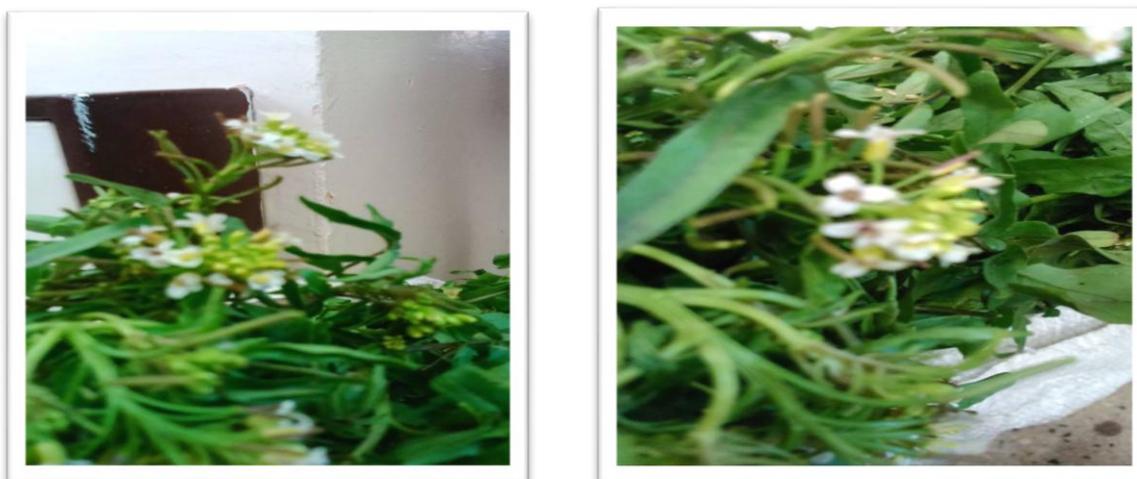


Figure 1: Partie aérienne du *Nasturtium officinale* (**originale, 2016**).

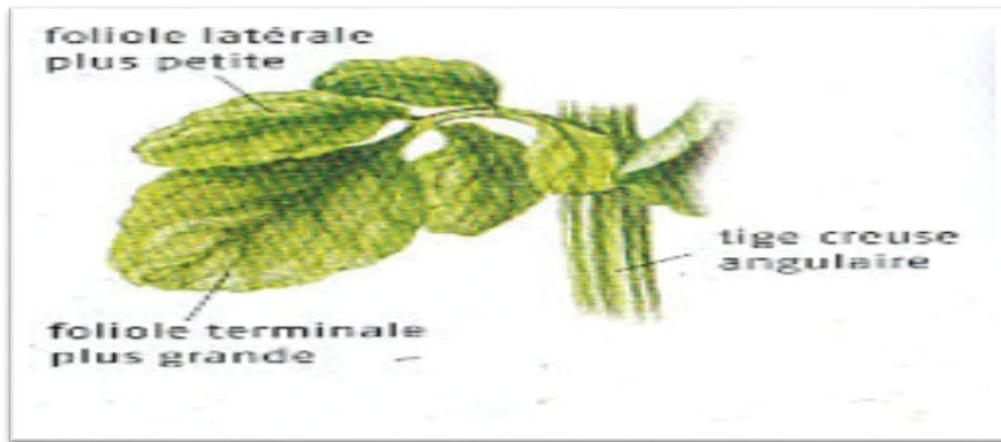


Figure 2 : Morphologie de la Feuille du *Nasturtium officinale* (Hensel, 2008).



Figure 3 : Morphologie de la racine du *Nasturtium officinale* (originale 2016).

I.4.6. Habitat et répartition géographique

Répandu dans toutes les régions tempérées, le cresson de fontaine pousse au bord des cours d'eau ou dans l'eau des torrents. Très courant à l'état sauvage. (Quezel et Santa, 1962).

- **Dans le monde** : le cresson de fontaine est indigène en Europe et en Asie occidentale ainsi que dans les hauteurs d'Ethiopie. Il a été introduit dans de nombreuses régions d'Afrique et il s'est naturalisé localement sur le continent africain, à Madagascar et sur d'autres îles de l'océan Indien, principalement dans les zones montagneuses, il est également introduit dans de nombreuses autres régions tempérées et tropicales (Grubben, 2004).
- **En Algérie** : Dans les eaux de toutes l'Algérie, et sur tout le littoral (Quezel et Santa, 1962).

I.4.7. Culture

Selon **Mappa (2010)**, le cresson à besoin d'eau courante pour se développer. Les eaux doivent avoir une température de 11 à 12 °C pour une culture hivernale, avec un débit suffisant (environ 35 m³/h).

La profondeur des fosses de culture doit être de 30 cm, il est essentiel d'avoir un sol riche en humus et de n'utiliser que des fumures minérales.

La multiplication se fait par semis de mars à septembre ou par bouturage.

Les principaux ennemis de cette plante sont : les crevettes, les limaces, les larves de chironomes, les mouches du cresson et les pucerons.

D'après ce même auteur, la récolte à lieu environ 130 jours après la date de semis et le rendement moyen est de 800kg/are.

I.5. Composition chimique

Le cresson de fontaine est connu pour sa teneur en 2-phényléthyl-isothiocyanate, un composé naturel dérivé du **gluconasturtine (Freitas et al., 2013)**

Une étude a mis en évidence qu'un extrait éthanolique de cresson avait un contenu en flavonoïdes et polyphénols de 96.2 mg équivalent en acide gallique par gramme d'extrait sec et de 63.2 mg en équivalent catéchine par gramme sec (**Bahramikia, 2010**).

Le cresson de fontaine est également une source de glucosinolate (**Park, 2011 ; Kopsell, 2007**) et de caroténoïdes (**Kopsell, 2007**), des Vitamines A, B1, B2, C et E, et des hétérosides sulfurés. L'isothiocyanate a une grande efficacité antibiotique (**Iserin, 2001**). Cette plante également riche en vitamines D, en iode et en fer (**Djerroumi et Nacef 2004**).

I.6. Usage de la plante

1.6.1. Emplois comme épice :

Les jeunes tiges feuillées, fraîches et coupées grossièrement, sont ajoutées aux salades (salade vert, de concombres, de tomates ou de pommes de terre), cuites à l'étuvée ou encore sont aussi consommées en légumes comme des épinards, et les graines peuvent être employés au même titre que la moutarde (**Koth, 2007**).

1.6.2. Usages médicaux :

Le cresson est dépuratif, diurétique, stimulant, apéritif et fébrifuge (**Djerroumi et Nacef, 2004**).

Il est également employé contre les vers intestinaux, la tuberculose, le scorbut (il guérit les carences en vitamine C), le diabète, les névralgies, les maux de dents et la chute des cheveux. Il est utile dans le traitement de l'anémie et dans les suites des maladies infectieuses (**Djerroumi et Nacef, 2004**). Il facilite la digestion et la guérison des bronchites (notamment celles qui donnent lieu à une sécrétion abondante de mucus) (**Iserin, 2001**).

I.7.Toxicité

La consommation excessive de cresson cru peut provoquer des troubles urinaires (cystite). Il arrive que la plante soit contaminée par les larves de la douve du foie (*Fasciola hepatica*), ver parasite habituel des ruminants, qui peut se montrer dangereux pour l'Homme en s'enkystant dans le foie (**Rammal et al, 2008**).

Chapitre II

Matériel et Méthodes

La partie expérimentale de ce travail s'est déroulée pendant une période allant du mois de mars au mois de Juillet 2016 afin de traiter quelques paramètres phytochimiques et pharmacologiques de l'espèce *Nasturtium officinale*.

Notre étude a été réalisée au niveau de différents établissements, dont il convient de citer :

- Le laboratoire des PFE du département de biologie (USDB)
- Les laboratoires de physicochimie, et de microbiologie et toxicologie du groupe pharmaceutique Antibiotical de SAIDAL, Médéa.
- Le laboratoire de biochimie du CRIAA (Blida).

II.1. Matériel biologique :

II.1.1. Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé est constitué de tiges feuillées de l'espèce *Nasturtium officinale* (**Figure 4**), les parties aériennes de l'espèce ont été récoltées dans la région de Birtouta (Alger) en novembre 2015 (**Tableau 2**)

Le séchage a été réalisé à température ambiante, à l'abri de la lumière et dans un endroit bien aéré, pour éviter le développement des moisissures (**Figure 5**).

Après séchage, le matériel végétal est broyé à l'aide d'un moulin électrique (**Figure 6**). La poudre obtenue est conservée dans des sacs en papier, jusqu'à son utilisation (**Figures 7**)

L'identité et la nomenclature de la plante ont été confirmées par Mr. Mettaï, sur des spécimens fraîchement récoltés, au niveau du département de Pharmacie, de l'université BLIDA-1.

Tableau 1: coordonnées géographiques du site de récolte.

Localisation	Altitude	Latitude	Longitude
Birtouta	60 m	36°38'59 " Nord	3°0'0 " Est
wilaya d'alger			

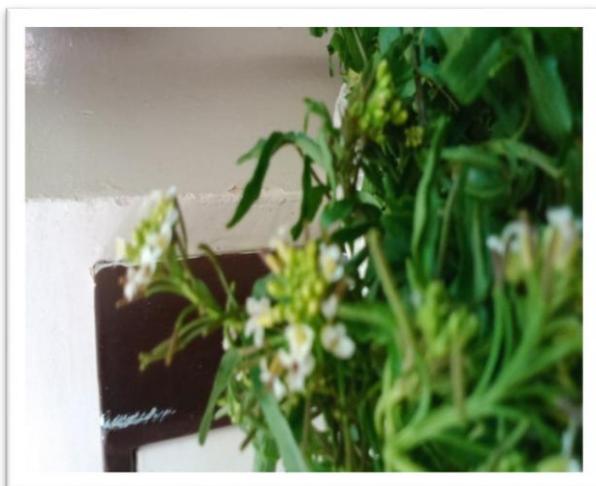


Figure 4: partie aérienne du cresson de fontaine.



Figure 5: tige feuillées du cresson de fontaine après séchage.



Figure 6: poudre végétale (cresson de fontaine).

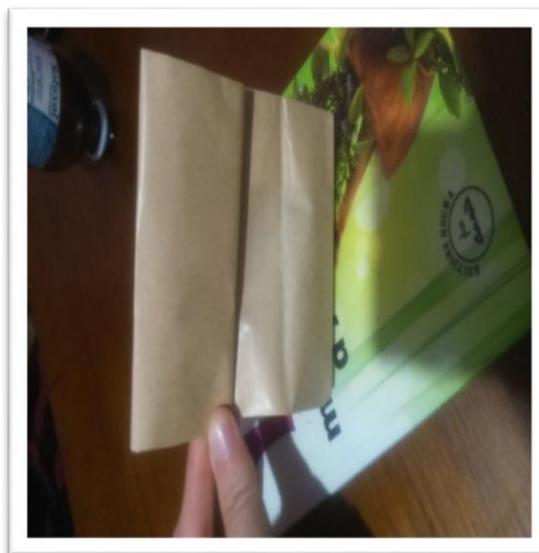


Figure 7: poudre conservé dans des sacs en papier.

(Photos originales, 2016)

II.1.2. Matériel animal

Nous avons utilisé des souris de laboratoire qui ont été élevées au niveau du laboratoire de pharmacotoxicologie, faisant partie de l'unité animalerie du complexe antibiotical- SAIDAL de MEDEA.

En total, 20 souris de souche *Albinos* (N.M.R.I) de poids entre 18 et 20 g, sont utilisées pour l'étude de toxicité aigue. Ces animaux ont été soumis aux conditions de stabulations suivantes :

- ▲ Hébergement dans des cages collectives en plastique à raison de cinq (5) souris par lot
- ▲ Alimentation fournie sous forme de granulés d'origine O.N.A.B (49.80% de glucides, 23.5% de protéines, 5% de lipides et 5.7 % de complexe minéral vitaminé) manufacturée par le groupe Antibiotical- SAIDAL de MEDEA
- ▲ abreuvement en eau potable *ad libitum* ;
- ▲ Ces animaux sont acclimatés sous les conditions de l'animalerie suivantes :
- ▲ Une température moyenne variante entre 20°C à 24° C.
- ▲ Une photopériode de 10 heures.
- ▲ Une humidité relative de 50%.

II.1.3. Milieux de culture et réactifs chimiques

Lors de l'évaluation de l'effet antimicrobien, nous avons utilisé deux milieux de culture solides : la gélose Sabouraud (SAB) pour les levures et champignons, et Soja agar pour les bactéries. Tous ces milieux de cultures proviennent du groupe antibiotical- SAIDAL de MEDEA.

Et afin de mener une étude du pouvoir antioxydant du cresson de fontaine, nous avons préparé un réactif à partir du radical libre DPPH (2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl).

II.1.4. Les souches microbiennes

L'activité antimicrobienne de l'extrait aqueux du cresson de fontaine a été évaluée sur cinq souches bactériennes, deux souches de levures et une souche fongique (**Tableau 2**), ces souches ont été conservées et maintenues en vie, par des repiquages continus, sur des milieux de culture adéquats.

Tableau 2: Souches microbiennes utilisées

Souches Microbiennes	Référence	Gram
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC6538P	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC11105	-
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	ATCC9027	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538P	+
<i>Sarcina lutea</i>	Institut Pasteur	+
<i>Aspergillus niger</i>	Champignon	Champignon
<i>Candida albicans</i>	ATCC10231	Levure
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ATCC9763	Levure

II.2. Matériel non biologique :

Les différents Appareillages, verreries et réactifs utilisés dans cette étude sont portés en **Annexe 1**.

II.3. Étude phytochimique de l'espèce *Nasturtium officinale*

II.3.1. Screening phytochimique

Le screening phytochimique est un ensemble de réactions chimiques simples, permettant d'orienter rapidement vers l'étude détaillée de quelques types de constituants chimiques. Le but est de connaître les principales familles de métabolites présents dans l'espèce à étudier. Ces tests sont effectués sur l'infusé préparé à partir de la poudre végétale, selon le protocole décrit par **Diallo (2005)**.

- **Solution à analyser** : (préparation de l'infusé 5%)

Nous avons introduit 5g de la poudre sèche dans un erlenmeyer de 250ml contenant 100ml d'eau distillée bouillante. Nous avons arrêté l'ébullition et fermé avec un verre de montre, après infusion pendant 15minutes, nous avons filtré et réajusté avec un peu d'eau chaude de manière à obtenir un volume final de 100ml de filtrat.

a) Recherche des substances polyphénoliques

- **Les anthocyanes**

On prend 5ml d'infusé auquel on ajoute 5ml d'acide sulfurique puis 5 ml d'ammoniaque. Si la coloration s'accroît par acidification puis vire au bleu violacé, donc la présence des anthocyanes est confirmée.

- **Les tanins**

On introduit 5ml d'infusé dans un tube à essai, puis on lui ajoute 1ml d'une solution aqueuse diluée de FeCl_3 , En présence des tanins, il se développe une coloration bleu noirâtre

- **Tanins catéchiques**

On Ajoute à l'infusé (5 ml), de l'éthanol chlorhydrique (1 ml) ce mélange est porté à ébullition pendant 15 minutes. En présence des tanins catéchiques, il se forme un précipité rouge soluble dans l'alcool amylique.

- **Tanins galliques**

On introduit 5ml d'infusé dans un tube à essai, puis on lui ajoute quelques fragments d'acétate de sodium pulvérisé. On y ajoute goutte à goutte 1 ml d'une solution de FeCl_3 , en présence des tanins galliques, il se développe une couleur bleu noirâtre

- **Les flavonoïdes**

On verse 2 ml de l'infusé dans un tube, et on lui ajoute quelques copeaux de magnésium et quelques gouttes d' HCl , Le virage de la couleur vers l'orange ou le rouge brique indique la présence des flavonoïdes

b) Recherche des mucilages

On introduit 1ml de l'infusé dans un tube et on lui ajoute 5ml d'éthanol, après 10 minutes, l'obtention d'un précipité floconneux indique la présence des mucilages

c) Recherche des coumarines

On fait bouillir 2 g de poudre végétale dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min dans un bain marie, après refroidissement, on filtre. On prend 5 ml du filtrat auquel on ajoute 10 gouttes de KOH et quelques gouttes d'HCl, l'apparition d'un trouble indique la présence des coumarines.

d) Recherche de saponosides

A 2 ml d'infusé, on ajoute quelques gouttes d'une solution saturée d'acétate de plomb, la formation d'un précipité blanc indique la présence des saponosides.

e) Recherche des anthraquinones

• Dérivés anthracéniques libres

A 1g de poudre végétale, on ajoute 10 ml de chloroforme, ce mélange est chauffé au bain marie pendant 3 min puis filtré. On introduit 1ml de ce filtrat dans un tube à essai et on lui ajoute 1ml d' NH_4OH . L'apparition d'une coloration rouge indique leur présence: c'est la réaction de Borntragger

f) Recherche des glucosides

A 2 g de poudre végétale, on ajoute quelques gouttes d' H_2SO_4 1M, la formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glucosides.

g) Recherche de l'amidon

A 2g de poudre végétale, on ajoute quelques gouttes d'iode, la formation d'une coloration bleu-violacée indique la présence de l'amidon.

II.4. Caractérisation physico-chimique de la poudre végétale

II.4.1. Détermination du taux d'humidité dans la poudre végétale :

Le taux d'humidité dans la poudre végétale est l'un des indices importants qui caractérisent la bonne qualité de celle-ci. Les plantes médicinales ne doivent pas contenir une quantité d'humidité dépassant la norme décrite par la pharmacopée européenne (**Pharmacopée européenne, 2002**).

On met 1g de poudre végétale dans un creuset en porcelaine préalablement séché et pesé ; l'ensemble est placé dans une étuve réglée entre 100 et 105°C durant deux heures.

Après avoir obtenu un poids constant, on calcule le pourcentage d'eau contenue dans la poudre par la formule suivante (**pharmacopée européenne, 2005**).

$$X\% = \frac{M - M'}{M} \times 100$$

Avec :

X% : Taux d'humidité de la poudre végétale.

M : Masse de la prise d'essai en gramme.

M' : Masse de la prise d'essai après séchage en gramme.

II.4.2. Détermination de la teneur des substances extractibles :

Les substances extractibles sont des substances organiques et inorganiques extraites à partir des matières végétales par un solvant.

a. Substances extractibles par l'eau :

On introduit dans un ballon 1g de poudre végétale et 20 ml d'eau distillée, qu'on porte à ébullition pendant 15 minutes. On laisse refroidir pendant 20 minutes et on filtre. Le filtrat est mis dans un bécher préalablement pesé (masse m), après évaporation à sec, on pèse à nouveau le bécher avec le résidu (masse m').

La teneur des substances extractibles par l'eau, exprimée en pourcentage, est calculée par la formule suivante (**Diarra, 2003**) :

$$\text{Substances extractibles par l'eau} = \frac{m - m'}{P_e} \times 100$$

Avec :

P_e : Masse de la prise d'essai

m : Masse du bécher vide.

m' : Masse du bécher avec le résidu.

b. Substances extractibles par l'éthanol 80% :

On introduit dans un erlenmeyer 1g de poudre végétale et 20 ml d'éthanol 80%, qu'on laisse macérer pendant 24 heures à la température du laboratoire, après l'avoir recouvert. Ce mélange est ensuite filtré avec du papier filtre.

On pèse le bécher vide (m) avant d'y mettre le filtrat, on laisse évaporer à sec et on repèse le bécher avec le résidu (m'). La teneur des substances extractibles par l'éthanol, exprimée en pourcentage, est calculée par la formule suivante (**Togola, 2002**) :

$$\text{Substances extractibles par l'éthanol} = \frac{m - m'}{P_e} \times 100$$

P_e : Masse de la prise d'essai.

m : Masse du bécher vide.

m' : Masse du bécher avec le résidu.

II.4.3. Détermination des cendres totaux :

La détermination des cendres est une méthode utilisée pour mesurer la quantité des substances résiduelles non volatiles contenues dans une drogue lorsque l'échantillon est complètement calciné.

On pèse 1g de poudre végétale, qu'on distribue uniformément dans un creuset préalablement taré. La température est augmentée progressivement au cours de l'incinération au four à moufle durant les deux premières heures, puis elle est maintenue à 800°C pendant 4 heures (**Figure 8**).

L'échantillon est refroidie durant 1 nuit, une fois sortie du four, la capsule est placée dans un dessiccateur pendant 15 minutes puis pesée. Le calcul du pourcentage des cendres totales par gramme de poids sec se fait selon la formule suivante (**Pharmacopée européenne, 2002**) :

$$C\% = \frac{P - P_c}{P_e} \times 100$$

P : Poids du creuset après calcination.

P_c : Poids du creuset vide.

P_e : Masse de la prise d'essai.



Figure 8 : Incinération de la poudre végétale (Originale 2016)

II.4.4. Détermination du potentiel hydrogène (pH)

Dans une fiole de 200 ml, on disperse 4 g de poudre végétale dans de l'eau chaude. Après refroidissement, la fiole est complétée jusqu'au trait de Jauge avec de l'eau distillée. On détermine le pH de cette solution en utilisant un pH-mètre (**Dowson et Aten, 1963**).

II.5. Extraction par solvant (Solide-liquide)

L'extraction est réalisée par épuisement de la poudre végétale à l'aide d'un solvant très polaire qui est l'Éthanol, en adoptant la méthode d'extraction à chaud par le montage Soxhlet au laboratoire.

L'usage des tiges feuillées séchées et réduites en poudre offre une plus grande surface de contact de ce matériel végétal avec le solvant extracteur (Éthanol), permettant ainsi d'améliorer le rendement de l'extraction.

II.5.1. Extraction à chaud par Soxhlet

Principe

L'extracteur Soxhlet est un montage spécifique conçu pour l'extraction continue solide-liquide. Le solvant (à raison de 100 ml pour 10 g d'échantillon solide à extraire) est porté à ébullition à 78°C (température d'ébullition de l'éthanol). Ensuite, les vapeurs sont condensées à l'intérieur de l'extracteur contenant le solide à extraire dans une cartouche de papier épais.

Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation du solvant dans le réservoir, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant les substances dissoutes. Ce cycle peut être répété plusieurs fois jusqu'à l'épuisement complet du solide (**William, 2007**).

Mode opératoire

- Le montage comporte une plaque chauffante, un ballon de 500 ml à col rodé et à fond plat, dans lequel le solvant est chauffé jusqu'à environ 98°C un réfrigérant qui condense les vapeurs et un extracteur de 250 ml à l'intérieur duquel on introduit, dans une cartouche poreuse, la poudre végétale à extraire et où retombe le solvant condensé par le réfrigérant (**Figure 9**).

Un siphon permet de vider périodiquement l'extracteur de la solution obtenue. La solution retombe alors dans le ballon où se concentrent les extraits.

Par ce procédé, la poudre végétale est successivement épuisée à l'aide de l'éthanol. L'extrait brut issu de l'extraction précédente est soumis à une double filtration, puis concentré à l'évaporateur rotatif (**Figure 10**) et enfin séché à température ambiante.

Le résidu sec obtenu est pesé pour déterminer son rendement et conservé au frais, dans un flacon sombre bien fermé, pour effectuer ultérieurement les tests phytochimiques. La formule utilisée pour calculer le rendement (R%) est la suivante:

$$R\% = (\text{Masse d'extrait sec} / \text{masse de la prise d'essai}) \times 100$$

✓ Le solvant utilisé est l'éthanol (à raison de 400 ml pour 40 g de poudre végétale).



Figure 9 : Extraction par le montage du Soxhlet (Originale 2016)



Figure 10: Elimination du solvant par un évaporateur rotatif (Originale 2016.)

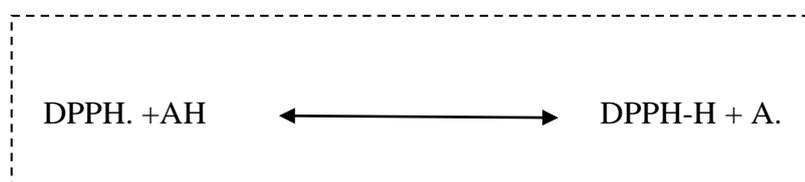
II.6. Évaluation de l'activité antioxydant *in vitro*

Pour l'évaluation de l'effet anti-oxydante de la concrète obtenue, nous avons adopté le protocole décrit par **Talbi et al., (2014)**

Principe

La capacité de donations des électrons par l'extrait est mise en évidence par une méthode spectrométrique, en suivant la disparition de la couleur violette d'une solution méthanolique contenant le radical libre DPPH (2-2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Le Diphényle picryl-hydrazyle (DPPH), un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété anti-radicalaire, entraînant ainsi une décoloration, l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu donneur des protons. (**Sanchez-Moreno, 2002**), selon la formule de réduction de DPPH suivante:



Mode opératoire

Préparation du réactif DPPH :

On dissout 4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol (0.004 %), ce réactif doit être fraîchement préparé et maintenu à l'abri de la lumière.

Préparation de l'extrait méthanolique :

Nous avons préparé six concentrations : 5, 10, 20, 40, 80, 100 mg de l'extrait sec pour les faire dissoudre dans un volume de méthanol. La plus faible dose est de 5mg d'extrait sec dissout dans un volume de 1ml de méthanol, et la plus forte dose est de 100mg/ml.

Dans des tubes à essais, on introduit 0.1ml de l'extrait à tester auquel on ajoute 3.9 ml de réactif DPPH. Parallèlement, un contrôle négatif est préparé en mélangeant 0.1ml de méthanol avec 3.9ml de la solution méthanolique de DPPH. La lecture de l'absorbance est faite contre un blanc préparé pour chaque concentration à 517nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

Le pourcentage d'inhibition des radicaux libres est déterminé par la formule de **Wang et al. (1998)**.

$$\text{I\%} = \left[\frac{\text{Abs}_c - \text{Abs}_e}{\text{Abs}_c} \right] \times 100$$

Avec :

I% : pourcentage d'inhibition

Abs_c : Absorbance contrôle

Abs_e : Absorbance de l'échantillon testé

La valeur concentration efficace EC₅₀ a été déterminée pour chaque extrait, elle correspond à la concentration du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du DPPH (Wang et al, 1998).

Les valeurs moyennes de l'EC₅₀ ont été calculées par les régressions linéaires

II.7. Évaluation de l'activité antimicrobienne

Principe

L'évaluation du pouvoir anti-microbien de l'extrait préparé (100mg/ml) à partir de la concrète alcoolique des feuilles et de tiges du cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*), a été réalisée par la technique de diffusion des disques sur milieu gélosé (Gulluce et al, 2006).

Dés l'application des disques imbibés par la substance à analyser, les substances actives diffusent de manière uniforme. Après incubation, les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires, correspondant à une absence de culture (Fauchere, 1997).

Préparation de l'extrait

Une masse de 3g d'extrait sec est dissoute dans 30ml de solution solubilisant (100 ml d'eau distillée+ 1ml tween 80) pour avoir une solution ayant une concentration de 100mg/ml.

Mode opératoire :

A partir d'une culture bactérienne jeune de 18 heures, on réalise des suspensions en mettant quelques colonies dans 5ml d'eau physiologique stérile, pour avoir une solution de 0.5 Mac Farland.

A partir d'une culture fongique jeune de 48 heures, on réalise des suspensions en diluants quelques colonies dans 5ml d'eau physiologique stérile pour avoir une solution de 2 Mac Farland.

Sur des milieux de culture déjà préparés (Sabouraud pour les levures et champignons et Soja agar pour les bactéries), l'ensemencement est fait par écouvillonnage en couvrant toute la surface de la gélose contenue dans la boîte de Pétri.

A l'aide d'une pince stérile, on prélève un disque stérile de papier buvard (9 mm) et on l'imbibe avec 25 µl de l'extrait aqueux (100mg/ml). Ce dernier est déposé à la surface de la gélose, on laisse diffuser sur la paillasse, puis on incube à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour les levures et le champignon.

L'estimation de l'activité antimicrobienne est basée sur une échelle de mesure mise en place par **Keshavarz et al. (1996)**. Ils ont classé le pouvoir antimicrobien, en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne, en 04 classes :

- Fortement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 28mm.
- Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 16 et 28 mm.
- Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone varie entre 10 et 16mm.
- Non inhibitrice lorsque le diamètre d'inhibition est inférieur à 10mm.

II.8. Étude de toxicité aigue par voie orale

IVAN, en **1928** a développé une méthode chiffrée de comparaison de la toxicité des substances chimiques, nommée la DL50 (Dose létale de 50 % des animaux testés). Selon **HODGSON (2005)**, les effets rencontrés avec la toxicité aiguë se traduisent, en général par une mortalité et /ou en morbidité enregistrée dans le lot des animaux testés.

Elle permet de connaître le degré de toxicité d'un produit, en fonction de la voie d'administration et de l'espèce animale. Le résultat obtenu ne permet pas de faire une extrapolation directe sur l'Homme mais donne une orientation sur la suite des essais à réaliser avant cette extrapolation.

Principe

Le principe de ce test consiste à déterminer statistiquement la dose moyenne qui provoque la mortalité de la moitié des animaux testés.

On administre des doses qui se suivent dans un ordre croissant à plusieurs groupes de souris. Après la période d'observation, les différents taux de mortalité pour chaque dose sont calculés pour donner une valeur statistique qui correspond à la DL 50. En plus de la mortalité, d'autres signes de toxicité, tel que les vomissements, la diarrhée, l'irritation...etc. sont à noter afin d'évaluer la DL 50 (**Stelljes, 2008**).

Mode opératoire

Nous avons utilisé la méthode de **Berhens et Karber (1949)** pour sa simplicité. Tous les essais ont été initiés le même jour avec le même matériel et dans les mêmes conditions (conditions normales d'une animalerie conventionnelle)

Distribution des lots et choix des doses de l'extrait aqueux.

Nous avons utilisé quatre lots (quatre lots d'essais) contenant chacun cinq souris (entre 18 et 20 g) Chaque lot va recevoir une dose de l'extrait solubilisé dans un solvant neutre constitué par un mélange eau + tween 80. Le volume administré pour chaque souris est de 0.5 ml.

Les différentes doses d'extraits ont été émulsionnées dans un solvant constitué d'eau distillée et de Tween 80 (1ml de tween dans 100ml d'eau distillée). Ce dernier est un stabilisateur d'émulsions sans toxicité significative sur l'animal.

Les doses utilisées sont : 40 ; 60 ; 80 ; 100 mg d'extrait / Kg de poids de l'animal.

Le produit a été administré par gavage en respectant la durée recommandée de 5 secondes / souris. Les animaux sont privés d'alimentation durant les deux heures qui suivent le gavage

Les animaux sont mis en observation pendant 14 jours, avec distribution d'aliments et d'eau *ad libitum*.

Lecture des résultats

Le calcul de la DL 50 se fait selon la méthode de Berhens et Karber (1949):

$$DL_{50} = DL_{100} - \frac{\sum a b}{n}$$

n : Nombre moyen d'animaux par lot

b : nombre moyen des morts de deux doses successives

a : différence entre deux doses successives

Les valeurs obtenues vont être comparées avec celles fournies dans le tableau suivant :

Tableau 3: Classes de toxicité : échelle de **Hodge et Sterner (O'Hare et Atterwill, 1995)**.

DL ₅₀ (orale)	Indice de Toxicité
Jusqu'à 1 mg / kg	1 : extrêmement Toxique
De 1 à 50 mg / kg	2 : hautement Toxique
De 50 à 500 mg / kg	3 : modérément Toxique
De 500 à 5000 mg / kg	4 : légèrement Toxique
De 5000 à 15000 mg / kg	5 : presque pas Toxique
Plus de 15000 mg /kg	6 : relativement inoffensif

Chapitre III

Résultats et Discussion

III.1. Résultats de l'étude phytochimique

III.1.1. Screening phytochimique

Le test phytochimique est une analyse qualitative qui nous permet de mettre en évidence les différentes classes de métabolites secondaires que contient la plante. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de colorations par des réactifs spécifiques de chaque famille de composés.

Les résultats expérimentaux de nos extraits mentionnés dans le **tableau 4** montrent la présence ou l'absence de certains groupes chimiques de métabolites.

Tableau 4: Résultat de la mise en évidence de quelques composés chimiques.

Composés		Résultat	Réaction
Les anthocyanes		-	Pas de coloration bleue
Tanins	T. catéchiques	+	Précipitation dans l'alcool
	T. galliques	+	Coloration bleu noirâtre
Flavonoïdes		+	Acidification puis coloration orange
Coumarines		+	Apparition d'un trouble
Saponosides		+	Précipitation
Anthraquinones (Dérivés anthracéniques libres)		-	Pas de coloration rouge
Glucosides		-	Pas de coloration rouge brique
Mucilages		-	Pas de précipitation

Présence (+)

Absence (-)

Le test phytochimique réalisé sur la poudre et l'infusé de *Nasturtium officinale*, révèle la présence de plusieurs familles de composés bioactifs : tanins, flavonoïdes, coumarines, saponosides.

Cependant, cette plante n'a pas présenté une réaction positive lors de la mise en évidence des anthocyanes, des anthraquinones, des glucosides, des mucilages et de l'amidon, ce qui révèle l'absence de ces métabolites.

III.2. Résultats de la caractérisation physicochimique

Les propriétés physicochimiques de la poudre végétale de *Nasturtium officinale* sont résumées dans le **tableau 5**

Tableau 5: Caractères physicochimiques de la poudre végétale.

Taux d'humidité dans la poudre végétale (%)	12.11
Teneur des substances extractibles par l'eau (%)	7.4694
Teneur des substances extractibles par l'éthanol l(%)	5.11
Cendres totales (%)	16.45
pH	6.28

Nous avons trouvé un taux d'humidité égale à 12.11 % de la poudre, ceci montre que l'échantillon sur lequel nous avons travaillé se prêtait à une bonne conservation (<15%) d'après les recommandations de la pharmacopée européenne (2002), près de 7.5% de ses substances sont solubles dans l'eau et 5.11 % dans l'éthanol, 16.45 % de la poudre sont des substances résiduelles que l'on peut obtenir après une incinération. Le pH s'est avéré légèrement acide (6.28).

III.3. Rendement de l'extraction

A partir de 40 g de poudre des tiges feuillées de *Nasturtium officinale* et 400 ml de l'éthanol, nous avons obtenu un extrait éthanolique considéré comme étant l'extrait brut de couleur verte foncée (**Figure 12**) pouvant contenir de la chlorophylle, des flavonoïdes, des polyphénols et d'autres composés (**Tableau 6**)

Tableau 6 : Aspects, couleurs et rendements des extraits obtenus.

Nature de l'extrait	Rendement de l'extrait sec (%)	couleur de l'extrait	Aspect
Extrait éthanolique	16.38	Vert foncé	Liquide

Le choix de la plante *Nasturtium officinale* est basé sur une récolte spontanée. Son calcul de rendement d'extraction révèle un grand écart d'une plante à l'autre. En effet, Il est difficile de comparer les valeurs de notre rendement à celui cité par (**Sánchez-Mata et Javier Tardío, 2016**) qui ont rapporté un taux de 13.2%, car le rendement n'est que relatif et semble être liée aux propriétés géographiques, à la durée de stockage et de récolte ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (**Lee et al, 2003**).



Figure 11 : Aspect et couleur de l'extrait éthanolique (**Originale, 2016**)

Afin d'utiliser l'extrait pour des essais pharmacologiques, la conservation de l'état bioactif des molécules extraites semble importante. L'épuisement complet du solvant s'avère nécessaire. La présence même des traces d'éthanol dans l'extrait peut entraîner des effets secondaires indésirables. De ce fait l'effet positif ou curatif de la substance pharmacologique peut être masqué par l'action du solvant (**Bousahel, 2010**).

III.4. Résultats de l'effet anti-oxydant

L'activité anti radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1 picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Ce test est basé sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène ou un électron, la forme non radicalaire DPPH-H est formée (**Bortolo et al, 2007**).

Les résultats sont exprimés en tant que pourcentage de l'activité anti-radicalaire qui a été calculée pour des concentrations croissantes allant de 5 jusqu'à 100mg/ml.

Tableau 7 : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire.

Concentration mg/ml	DO	I%
100mg/ml	1.0542	60.3771375
80mg/ml	0.9679	34.8910752
40mg/ml	0.8021	16.3270087
20mg/ml	0.8169	9.52213633
10mg/ml	0.7899	3.39658
5mg/ml	0.823	1.22979621

Les résultats montrent que l'extrait méthanolique de *N. officinale* ne possède pas un pouvoir réducteur

remarquable par rapport au contrôle positif (acide ascorbique 10mg/ml) qui a présenté un pourcentage de réduction de 92,62% (EC50=0,89mg/ml)

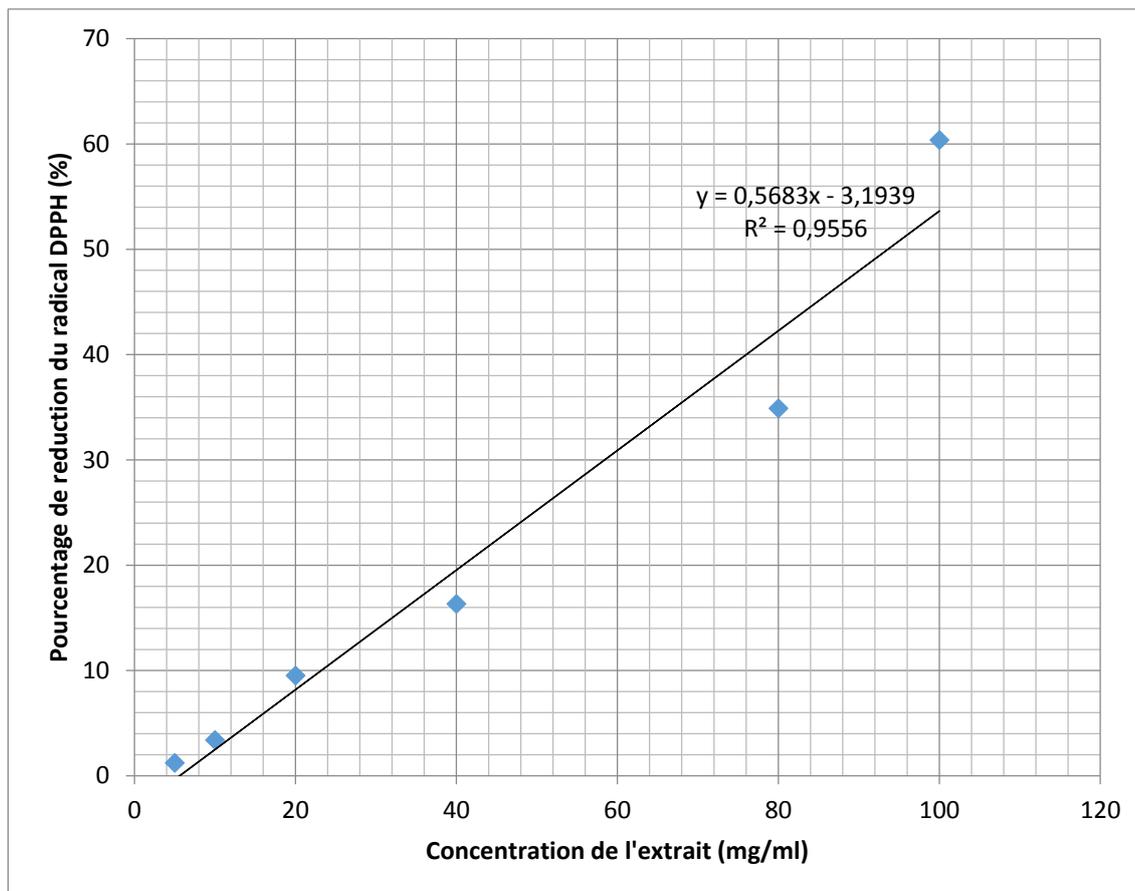


Figure 12 : Pouvoir réducteur de l'extrait éthanolique de *N.officinale* à 517 nm.

Les résultats obtenus avec ce test montrent que l'extrait aqueux de *N. officinale* a une EC50 93.649 mg/ml (**Figure 12**).

On constate que l'extrait étudié à différentes concentrations n'a pas une importante activité antioxydante, malgré sa richesse en composés phénoliques qui a été démontrée lors du screening phytochimique réalisé sur la poudre végétale ainsi que l'infusé.

Sur cette même piste d'investigation, les travaux menés par **Dorman et al, (2003)**, ont démontré qu'il n'est pas une corrélation significative entre la teneur des polyphénols et l'activité antioxydante de l'extrait aqueux de la poudre végétale du cresson de fontaine.

Ces derniers ont montré que la capacité antioxydante des extraits des plantes n'est pas nécessairement liée à un contenu élevé de composés phénoliques, mais vraisemblablement dépend d'autres composés à effet antioxydant.

Le niveau de corrélation entre le contenu phénolique et l'activité antioxydante a un aspect intéressant, mais il faut prendre en considération que les composés phénoliques répondent différemment dans

l'analyse, selon le nombre de groupes phénoliques et que les composées phénolique totaux n'incorporent pas nécessairement tous les antioxydantes qui peuvent être présents dans un extrait (**Tawaha et al, 2007**)

III.5. Résultats de l'activité antimicrobienne

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antimicrobien de l'extrait de *N. officinale* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide, (Sabouraud (SAB) pour les levures et champignons, et Soja agar pour les bactéries).

L'activité antimicrobienne de l'extrait a été estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait à tester vis-à-vis de huit (8) souches de micro-organismes (**Tableau 8**).

Tableau 8: Résultats de l'activité antimicrobienne l'extrait aqueux de *Nasturtium officinale*.

Les souches	ZI en mm		
	Extrait étudié	Témoin positif	Témoin négatif
<i>Aspergillus niger</i>	-	16	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	18	-
<i>Candida albicans</i>	-	12	-
<i>E.coli</i>	-	15	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	23	-
<i>Saccharomyces cereviciae</i>	23	28	-
<i>Sarcina lutea</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	11	-

(-) absence de zone d'inhibition

ZI= Zone d'inhibition

Témoin positif : gentamycine pour les bactéries (30µg/disque)et nystatine (50µg/disque) pour les souches fongiques

Témoin négatif : solution solubilisant (100 ml d'eau distillée+ 1ml tween 80



Figure 13 zones d'inhibition de la croissance d'*Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

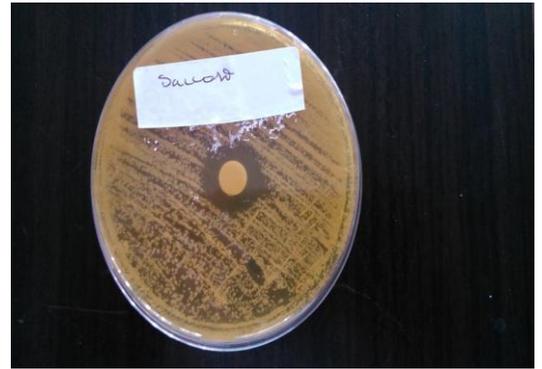


Figure 14 : zone d'inhibition de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae*.



Figure 15 : zones d'inhibition de la croissance de *Bacillus subtilis* et *Sarcina lutea*.



Figure 16 : zone d'inhibition de la croissance d'*E. coli*



Figure 17 : zone d'inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus*



Figure 18 : zone d'inhibition de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa*

Pour le test de l'activité antimicrobienne, un effet positif de l'extrait aqueux du *Nasturtium officinale* est observé uniquement contre la souche *Saccharomyce cerevisiae* (**Figure 14**) avec une zone d'inhibition modérée de 23 mm. Selon **Brantner et Williams. (1992)**. Cette activité peut être due à la présence des flavonoïdes et des tanins. Les composés phénoliques participent à la défense de la plante contre les agressions comme antibactériens ou antifongiques en se liant aux protéines et en inactivant les mécanismes enzymatiques des microorganismes (**Harborne et al, 1992**).

Ce test était complètement négatif pour les autres espèces bactériennes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) et fongiques (*Aspergillus niger* et *Candida albicans*). Certains microorganismes, en particulier les champignons, peuvent d'ailleurs dégrader les composés phénoliques qui leur servent alors de substrats carbonés et favorisent ainsi leur croissance (**Straney et al, 2002**). La méthode d'extraction ainsi que la quantité d'extrait mise dans les disques pourrait être à l'origine de ces résultats. En fait, il a été rapporté que les huiles essentielles des plantes, et non leurs extraits, ont la plus grande efficacité dans le traitement des pathologies infectieuses (**Rios et Recio, 2005**).

Les conditions de séchage et de broyage de la plante peuvent être aussi à l'origine de l'absence de l'activité antibactérienne. Il est rapporté par **Seidel (2005)** que si la plante est connue par son contenu en composés volatiles ou thermolabiles, il est conseillé de congeler le matériel végétal le plus tôt possible après sa collecte. Il est aussi recommandé de le broyer subséquemment dans un mortier avec le nitrogène liquide car le broyage est aussi à l'origine de la génération de chaleur responsable de la perte des molécules ainsi que la décomposition et l'oxydation des molécules (**Jones et Kinghorn, 2005**). Finalement, l'activité d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre un nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement (**Sarker et al, 2005**).

Cela est interprété par le fait que la plante produit une variété de molécules ayant un large spectre de structures telles que les flavonoïdes, coumarines, tanin et saponosides. Cependant, la plupart de ces petites molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries et les champignons.

III.6. Étude de toxicité aiguë par voie orale

Nous avons pris quatre lots de 5 souris, pour lesquels, nous avons attribué différentes doses d'extrait aqueux (100mg/kg, 80mg/kg, 60mg/kg, 40mg/kg) préparé à partir du résidu sec. L'administration de l'extrait aqueux de *Nasturtium officinale* a été faite par voie orale. Nous avons reportés les taux de mortalité, enregistrés durant le période d'observation, dans le tableau suivant :

Tableau 9: Taux de mortalité des souris après gavage de l'extrait de *Nasturtium officinale*.

lots	Doses (mg/kg)	Nombre de souris	Nombre de mortalité	Taux de mortalité(%)
01	100	5	3	60
02	80	5	2	40
03	60	5	1	10
04	40	5	1	10

Signes notés après l'extrait sur certains animaux

cliniques gavage de

- Après 36h de gavage une forte agitation et une immobilité, suivie de la mort de quelques souris pour les lots ayant reçu 80 et 100 mg/kg.

Cette expérience montre que l'extrait de la plante semble exercer, à différentes doses, un effet stressant sur les souris.

Vu que la plus forte dose testée au cours de cette expérience n'a pas provoquer la mortalité de tous les animaux du lot, autrement dit, puisque la détermination de la DL100 n'a pas pu être atteinte (pour des raisons de non disponibilité des animaux de laboratoire), donc la détermination de la DL50 demeure abstraite, on peut cependant, faire une approximation de la dose qui provoque la mortalité de la moitié des souris du lot en l'incluant dans un intervalle allant de 80 à 100 mg/kg, qui sont les deux doses successives pour lesquelles presque la moitié des animaux du lot ont péri.

En se référant à l'échelle de Hodge et Sterner (**O'Hare et Atterwill, 1995**), citée précédemment dans la partie matériel et méthodes, nous pouvons admettre que l'extrait testé de *Nasturtium officinale* peut être considéré comme étant une substance modérément toxique (incluse dans un intervalle allant de 50 à 500 mg / kg)

Conclusion

Cette étude vise à apporter une contribution à la connaissance phytochimique, physico-chimique, toxicologique, et à évaluer quelques potentialités bioactives de la concrète extraite à partir des feuilles et de tiges de l'espèce *Nasturtium officinale* récoltée dans la région de Birtouta (Alger-Algérie).

A la lumière des résultats obtenus, nous avons constaté que la concrète alcoolique séchée, recueillie après extraction à chaud à l'aide d'un montage de type Soxhlet, présente un rendement de 16.83%.

La détermination des caractéristiques physico-chimiques, nous a permis de confirmer la bonne qualité de la poudre végétale utilisée. Elle se distingue par un taux de cendres de 16,45%. Cependant le taux des substances extractibles dans l'eau est égal à 7.4694%, alors que celui obtenu dans l'alcool est de 5.11%.

Le screening phytochimique entrepris sur la poudre de *Nasturtium officinale* a démontré la présence de plusieurs métabolites secondaires entre autres les tanins (les tanins galliques et catéchiqes), les saponosides, les flavonoïdes et les coumarines. Ces métabolites secondaires détectés possèdent une grande valeur thérapeutique.

La concrète alcoolique étudié à différentes concentrations n' pas une importante activité antioxydante, malgré sa richesse en composés phénoliques qui a été démontrée lors du screening phytochimique réalisé sur la poudre végétale ainsi que l'infusé. Cela pourrait être attribué probablement à la structure et le nombre de groupes phénoliques ainsi que la nature du test utilisé.

En outre, l'étude de l'activité antimicrobienne de *Nasturtium officinale* évaluée par la technique de diffusion sur milieu gélosé a révélé que l'extrait a une activité modérée envers la souche *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, il s'est avéré inactif sur les autres souches bactériennes et fongiques testées.

De même que, nous avons prouvé que la DL50 de l'extrait aqueux, préparé à partir de la concrète alcoolique de *Nasturtium officinale*, et administré par voie orale à des souris de souche N.M.R.I, est estimé entre 80 et 100 mg/kg, ce qui lui attribue un effet modérément toxique

A la lumière des résultats obtenus, le présent travail peut être considéré comme une première initiative ainsi qu'une source d'informations préliminaire sur la mise en évidence des propriétés phytochimique, physico-chimiques, anti-bactériennes et anti-oxydante de *Nasturtium officinale* poussant spontanément en Algérie.

Au terme de cette étude, nous pouvons admettre que l'espèce *Nasturtium officinale* constitue une source potentielle de molécules bioactives susceptibles d'avoir de nombreuses actions dans la prévention et le traitement de nombreuses maladies humaines.

Vu que notre pays possède une biodiversité immense, dont chaque plante se caractérise par un réservoir assez important des métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques

particulières, qui demandent d'être exploitées par des recherches complémentaires plus approfondies, de cet effet, ce travail reste ouvert à de larges perspectives, dont il convient de citer :

- la recherche de nouvelles substances bioactives naturelles pourront répondre aux différents problèmes de la santé et d'être un alternatif des médicaments synthétiques.
- l'orientation des recherches scientifiques vers la mise en évidence des propriétés pharmacotoxicologiques de cette plante.

Références

- 1- **Baba Aissa F., 2011,** « Encyclopédie des plantes utiles, flore méditerranéenne 'Maghreb, Europe méridionale' substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident » Ed- Elmaarifa, Algérie, p471.

- 2- **Bahramikia Seifollah., Razieh Yazdanparast., 2010**, « Antioxidant Efficacy of Nasturtium officinale Extracts Using Various In Vitro Assay Systems » Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran, 3(4):283–290
- 3- **BOUSSAHEL S., 2011**, « Étude biochimique et histologique de l'effet de quelques extraits des plantes toxiques dans la région de Sétif », p39.
- 4- **Bouزيد W., Yahia M., Abdeddaim M., Aberkane M.C., Ayachi A., 2011**, « Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits de l'Aubepine Monogyne » Labanese science journal, vol 12, n°1, 59-69, Algérie.
- 5- **Bruneton J., 1999**, « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales » 3^{ème} édition : Tec et Doc, Paris, p1120.
- 6- **Brantner A., Males Z., Pepeljak S., Antolic A. (1996)**. Antibacterial activity of paliurus spina-christi Mill (Christ's thorn). Journal of Ethnopharmacology 52,119-122.
- 7- **Cortes Sánchez-Mata, Javier Tardío., 2016**, « Mediterranean Wild Edible
- 8- **Darker B. et Ernest S., 1998**, «Les légumes du canada » Ed- NCR research, P297
Barker Daniel J., 2009, « Pacific Northwest Aquatic Invasive Species Profile: Nasturtium officinale (Watercress) » FSH 423.
- 9- **Djedioui A., 2010**, « Evaluation e l'activité hypoglycémiant et anti-hyperglycémiant de l'extrait aqueux d'*inula viscosa* ; une plante de l'est algérien chez le rat avec un diabète induit» Ed, p5
- 10- **Djerroumi A. et Nacef M., 2004**, « 100 plantes médicinales d'Algérie » Ed- Houma.
- 11- **Diallo, A., 2005**, Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense Willd.* Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. p99.
- 12- **Diarra, M.N.,2003** Etude phytochimique d'une plante antipaludique: *Spilanthes oleracea*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. p78.
- 13- **Dowson, A.et Aten, M., 1963**, « Composition et maturation, récolte et conditionnement des dattes ». Collection F.A.O. Rome. p67.
- 14- **Dupont F. et Guignard J.L., 2007**, « Botanique systématiques moléculaire » Ed- Elsevier Masson.
- 15- **Ernest S. et Grace D., 2001**, « Conseil national de recherches » Ed-NRC research, p78
- 16- **Freitas E, Aires A, de Santos Rosa EA, Saavedra MJ., 2013** « Antibacterial activity and synergistic effect between watercress extracts, 2-phenylethyl isothiocyanate and antibiotics against 11 isolates of Escherichia coli from clinical and animal source ». Lett Appl Microbiol. Oct;57(4):266-73.
- 17- **Grunwald L.J. et Janicke C., 2007**, « La santé par les plantes » Ed- Marabout, p144.

- 18- Grubben G.J.H., 2014**, « Légumes » Ed-PROTA, p451.
- 19- Harborne B, et Williams A., 2000** « Advances in flavonoid research since 1992 » Ed-ELSEVIER [Volume 55, Issue 6](#), November 2000, Pages 481–504.
- 20- Hensel W., 2008**, « 350 plantes médicinales » Ed- Fotolito longo AG. Italy. p72.
- 21- Hodgson E. 2005**. A textbook of modern toxicology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey and Canada, troisième édition, p557 (63-218).
- 22- Iserin P., 2001**, « Larousse des plantes médicinales, identification, préparation, soins » Ed- Larousse, p335.
- 23- Iserin P., 2001**, « Larousse des plantes médicinales, identification, préparation, soins » Ed- Larousse, p338.
- 24- Ivan A R. 2005**. Medicinal Plants of the World: Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. Humana Press Inc, New Jersey. p 623.
- 25- Jones W., et Kinghorn D., 2005**, « Extraction des métabolites secondaires des plantes » Pubmed DOI: 10.1007/978-1-61779-624-1_13.
- 26- Kopsell DA., 2007**, « Influence of nitrogen and sulfur on biomass production and carotenoid and glucosinolate concentrations in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) » *Agric Food Chemistry* Dec 26;55(26):10628-34.
- 27- Kothe H.W., 2007**, « 1000 plantes aromatiques et médicinales » Ed- Terres, p208.
- 28- Leduc C., Coonishish J., Haddad P., Currier A., 2006**, « Plants used by Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany » *J. Ethnopharmacol.*; 105: 55-63.
- 29- Lesely B., 1997**, « Plantes aromatiques et médicinales » Larousse Bordas, Paris.
- 30- Mappa D., 2010**, « Les productions légumières » Ed-Educagri, p28.
- 31- Neffati M. et Sghaier A., 2014**, « Développement et valorisation des plantes aromatique médicinales au niveau des zones désertiques de la région MENA (Algérie, Egypte, Jordanie, Maroc et Tunisie) » OSS, p24
- 32- O'Hare S, Atterwill CK. 1995**. Methods in molecular biology: In vitro toxicity testing protocols. Humana press INC, Totowa - New Jersey, p326, (29-31).
- 33- OMS., 2003**, « Directives OMS sur les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques de récolte (BPAR) relatives aux plantes médicinales », p17, Genève.
- 34- Ould El Hadj M., Hadj-Mahammad M., Zabeirou H., 2003**, « place des plantes spontanées dans la médecine traditionnelle de la région de Ouargla (Sahara Septentrional Est) » *Courrier du savoir*, n°3, pp47-51, Algérie.
- 35- Ozenda P., 1977**, « Flore du Sahara » Ed, CNRS, Paris, France, P622.

- 36-Park NI., 2011,** « An efficient protocol for genetic transformation of watercress (*Nasturtium officinale*) using *Agrobacterium rhizogenes* ». *Mol Biol Rep. Nov*;38(8):4947-53
- 37-Pharmacopée européenne.,2002** 4^{ème} édition. Conseil de l'Europe. Strasbourg. 2060p.
- 38-Pharmacopée européenne., 2008** Tome I. Conseil de l'Europe. Strasbourg.3343p.
- 39-Pousset J.L., 2004,** « Plantes médicinales d'Afrique » Ed- Edisud, p287.
- 40-Quezel P. et Santa S., 1962,** « Nouvelle flore de l'Algérie et régions désertiques méridionales » Tome I. Centre national de la recherche Scientifique, Paris, p1090.
- 41-Scimeca D. et Tétou M., 2004,** « Votre santé par les plantes : le guide phyto utile pour toute la famille » Ed- Alpen, p183.
- 42-Scimeca D. et Tétou M., 2005,** « Votre santé par les plantes : le guide familial pour prévenir et guérir tous les maux quotidiens » Ed- Alpen, p137.
- 43-Schauenberg P. et Paris F., 2005,** « Guide des plantes médicinales (analyse, description et utilisation de 400 plantes) » Ed- Delachaux et Niestlé, p395.
- 44-Stelljes ME. 2008.** Toxicology for Nontoxicologists. Government Institutes : an imprint of The Scarecrow Press, Inc., United States of America. p 207, (61-63)
- 45-Togola, A.,2002** Etude de la phytochimie et de l'activité antipaludique de *Alchornea cordifolia* *Schmach.*. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bamako. Mali. (2002). p 100.
- 46-Talbi H, A. Boumaza, K. El-mostafa, J. Talbi, A. Hilali., 2014,** « Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.) » *Environ. Sci.* 6 (4) (2015) 1111-1117.
- 47-Tawaha, K. Alali, F. Gharibeh, M, Mohammed, M., 2007** « Antioxydant activity and total phenolic content of selected jordanian plant species » *Food chemistry*.
- 48-Treki, A.S., Merghem, R. et Dehimat, L. 2009.** Etude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne d'une Labiée: *Thymus hirtus*. *Sciences & Technologie*, 29: 25-29
- 49-Voustina N., Payne A.C., Hancock R.D., et al., 2016,** « Characterization of the watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.; Brassicaceae) transcriptome using RNASeq and identification of candidate genes for important phytonutrient traits linked to human health» *BMC Gynomic* DOI : 10.118 6/ S12864-2704-4.
- 50-Wichtl M. et Anton R., 2003,** « plantes thérapeutiques, traditions, pratique officinale, science et thérapeutique » 2^{ème} édition, Tec et Doc, p692.
- 51-William BJ. 2007.** The original of the soxhlet extractor. *Journal of chemical education*. Vol 84.pp:1913-1915.
- 52-Wang M, Li J, Rangarajan M. Shao Y. Lavoie EJ, Huang TC et Ho CT. 1998.** Antioxidant phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agricultural and food chemistry* .Vol 46.pp:4869-4873

