



UNIVERSITE MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بو عريريج
Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية
Département des Sciences Biologiques



UNIVERSITE MOHAMED EL BACHIR EL IBRAHIMI
BORDJ BOU ARRERIDJ

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Alimentaires

Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité alimentaire

Intitulé

**Etude physico-chimique , phytochimique , et activité antioxydante
d'une fougère aquatique (Azolla Pinnata)**

Présenté par :

Aissaoui Khadidja / Ben Malek Wassila

Le : 11/06/2024

Devant le Jury :

Président : M. ZIAD Abdelaaziz

Université de B.B.A

Encadreur : M. Belhadj Mohamed Tayeb

Université de B.B.A

Co-Encadreur : M. Touati Nourddine

Université de B.B.A

Examineur : Mme. Boutana Wissem

Université de B.B.A

Année universitaire : 2023/2024

Résumé

Azolla Pinnata est une plante fougère aquatique appartenant à la famille des Salviniaceae. Largement utilisée en Asie depuis longtemps. Dans le cadre de la contribution à la valorisation de cette plante fourragère, nous avons mené dans le présent travail l'analyse physico-chimique, phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante de différents extraits d'*Azolla Pinnata*. L'analyse physicochimique a relevé que la plante est riche en métabolites primaires soit 17,61% de protéines, 2,32% de matière grasse, 25,37% de glucides et 12,04% de fibres. L'extraction a été réalisée par macération sous agitation en utilisant le méthanol 70% et décoction par l'eau distillée. Les rendements obtenus sont respectivement 40,37% ; 18,37%. La quantification des polyphénols totaux, des flavonoïdes et des tanins condensés dans les deux extraits par des méthodes colorimétriques montrent la richesse également de cette espèce en métabolites secondaires. L'activité antioxydante est évaluée par différents tests (DPPH, CAT). L'extrait méthanolique montre la plus grande capacité de piégeage du radical DPPH avec une IC50 de 0,185 mg/ml ; suivi par l'extrait aqueux avec IC50 de 0,95 mg/ml.

Au terme de ce travail, nous pouvons dire que l'*Azolla Pinnata* peut être l'une des meilleures alternatives pour l'alimentation animale, elle a la capacité de grossir plus rapidement avec un coût de production minimum, et même peut servir d'excellent substrat pour l'application pharmaceutique.

Mots clés : *Azolla Pinnata*, paramètres physico-chimiques, antioxydant, activité antioxydante.

المخلص

نبات الأزولا بيناتا هو نبات سرخس مائي ينتمي إلى الفصيلة السالفينية يستخدم على نطاق واسع في آسيا منذ فترة طويلة. وكجزء من مساهمتنا في تطوير هذا النبات العلف، أجرينا تحليلاً فيزيائياً وكيميائياً نباتياً وقمنا بتقييم النشاط المضاد للأكسدة لمختلف مستخلصات نبات الأزولا بيناتا. كشف التحليل الفيزيائي الكيميائي أن النبات غني بالمستقلبات الأولية، أي (17.61%) بروتينات و(2.32%) دهون و(25.37%) كربوهيدرات و(12.04%) ألياف. تم الاستخلاص عن طريق النقع مع التحريك باستخدام الميثانول (70%) والمغلي بالماء المقطر. كانت المحصولات التي تم الحصول عليها 40.37% و18.37% على التوالي، و أظهر القياس الكمي للبوليفينول الكلي و الفلافونويد و العفص المكثف في المستخلصين باستخدام طرق القياس اللوني ان هذا النوع غني ايضا بالمستقلبات الثانوية. و أظهر المستخلص الميثانولي اكبر قدرة على اجتياز جذر DPPH مع تركيز IC50 قدره 0,185 ملغ/مل يليها المستخلص المائي مع تركيز IC50 قدره 0,95 ملغ/مل .

في نهاية هذا العمل، يمكننا القول أن نبات الأزولا بيناتا يمكن أن يكون أحد أفضل البدائل لتغذية الحيوانات، كما أن لديه القدرة على النمو بشكل أسرع مع أقل تكلفة إنتاج، ويمكن أن يكون بمثابة مكثف ممتاز للاستخدامات الصيدلانية.

الكلمات المفتاحية: أزولا بيناتا، الاعدادات الفيزيائية الكيميائية، مضاد الاكسدة، نشاط مضاد للأكسدة .

Abstract

Azolla Pinnata is an aquatic fern belonging to the Salviniaceae family, widely used in Asia for many years. As part of our contribution to the valorization of this fodder plant, we carried out a physicochemical and phytochemical analysis and evaluated the antioxidant activity of various Azolla Pinnata extracts. Physicochemical analysis revealed that the plant is rich in primary metabolites, 17.61% protein, 2.32% fat, 25.37% carbohydrates and 12.04% fiber. Extraction was carried out by stirring maceration using methanol 70% and decoction with distilled water. Yields obtained were respectively 40.37%; 18.37%. Quantification of total polyphenols, flavonoids and condensed tannins in both extracts by colorimetric methods show that this species is also rich in secondary metabolites. Antioxidant activity was assessed by various tests (DPPH, CAT), with the methanolic extract showing the greatest capacity to trap the DPPH radical, with an IC₅₀ of 0.185 mg/ml, followed by the aqueous extract with an IC₅₀ of 0.95 mg/ml.

At the end of this work, we can say that Azolla Pinnata can be one of the best alternatives for animal feed, it has the ability to grow faster with minimum production cost, and even can serve as an excellent candidate for pharmaceutical application.

Keywords: Azolla Pinnata, physicochemical parameter, antioxidant, antioxidant activity .

Remerciement

Avant tout, Nous remercions Allah, le tout puissant de nous a donné la force, le courage, la santé et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre encadreur M.BELHADJ MOHAMED TAYEB qui nous a offert par ses compétences scientifiques et pédagogiques et ses qualités humaines, les moyens de mener à bien de ce travail. Nous tenons également à le remercier pour la confiance et le soutien permanent. Merci pour nous avoir accordé votre temps, Merci d'avoir été très patient avec nous.

Nous adressons notre sincère remerciement aux membres de jury, Mme.Boutana.W et M.ZAIDI qui ont accepté de juger notre travail.

Nous remercions notre Co-encadrant M.N.TOUATI pour les efforts qu'il a consentit afin de nous aider à réussir notre travail et lui exprimons notre gratitude et notre profond respect.

On tient à remercier sincèrement M.MEKHOUKH Nasreddine pour sa disponibilité tout au long de ce travail, pour nous avoir guidées dans ce travail, sa patience, ses orientations, ses encouragements et surtout ses conseils judicieux qui nous ont permis de mener à terminer ce travail.

Un très grand merci à nos parents Merci pour tout, pour le soutien infailible dans les moments les plus compliqués, pour les encouragements depuis toujours, par ce travail, on tient à vous rendre hommage, car vous le mérites.

Au personnel du laboratoire de biochimie et de microbiologie pour leur aide en particulier Nos remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

À l'aide de dieu "Allah" tout puissant Qui m'a tracé le chemin de ma vie, J'ai pu réaliser ce travail.

Je dédie ce travail à ma famille spécialement aux personnes les plus chères au monde. Mes chers parents qui sont la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie. Qui m'ont apportés leur appui durant toutes mes années d'études, pour leur sacrifices et soutien et qui m'ont donné la tendresse, la confiance, le courage et la sécurité.

À ma très chère sœur ; Soumia

A mes très chers frères; Mohemed, Bachir

À mon binôme Khadidja qui a partagée avec moi les moments difficiles pour réaliser ce travail.

A mes amis qui ont toujours cru en moi et qui m'ont toujours encouragé et avec qui j'ai passé des années inoubliables. Je remercie toutes les personnes que je n'ai pas pu citer leurs noms ici, et qui ont participé de pré ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Ben Malek Wassila

Dédicace

Je dédie ce modeste travail en signe de respect, de reconnaissance et de gratitude :

A ALLAH le tout puissant de m'avoir donné le courage, la santé et m'a accordé son soutien durant les périodes les plus difficiles.

A mon père qui m'a donné le courage pour continuer mon trajet d'étude et qui m'a redonné la confiance lorsque la motivation n'était plus au rendez-vous.

A ma maman qui était la source d'amour, le motif et le grand soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie.

A mes chères sœurs Chahrazed et Lidya et mon frère Walid , pour leurs tendresse et leurs permanentes présences à mes côtés.

A toutes ma famille.

A ma chère binôme Wassila pour son soutien moral et avec laquelle j'ai passé des bons moments au cours de mon parcours à l'université.

A tous les enseignants de notre faculté qui m'ont toujours guidé tout au long de mon parcours éducatif. A toutes les personnes que je porte dans mon cœur.

A ceux qui me connaissent de près ou de loin.

Aissaoui Khadidja

Table des matières

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Partie bibliographique

1. Taxonomie,distribution géographique.....	4
2. Description	5
3. Forme d'utilisation de l'azolla	5
4. Conditions de culture.....	6
5. Utilisation d'Azolla.....	7
6. Avantages d'Azolla	8
7. Inconvénients d'Azolla	9

Partie expérimentale

1. Matériels et produits	12
2. Méthodes.....	13
2.1.1 Analyses physico-chimiques	14
2.1.2. Détermination de taux d'humidité (H%).....	14
2.1.3. Détermination de taux de cendre (Tc%).....	14
2.1.6. Détermination de la Teneur en Fibres.....	15
2.1.4. Détermination de Teneur en lipides	15
2.1.5. Détermination de la teneur en glucides.....	16
2.1.6. Détermination de la teneur en protéines	18
2.2. Analyses phytochimiques.....	19
2.2.1. Préparation des extraits	19
2.2.2. Dosages des polyphénols totaux	21
2.2.3. Dosages des flavonoïdes totaux	21
2.2.4. Dosage des tanins condensés	22
2.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante	22
2.2.6. Activité anti radicalaire	22
2.2.7. Capacité antioxydant totale.....	23

Résultats et discussions

1. Résultats et discussion de l'étude physicochimique	25
---	----

1.1.	Taux d'humidité.....	25
1.2.	Taux de cendre.....	25
1.3.	Teneur en fibre.....	25
1.4.	Teneur en lipides.....	25
1.5.	Teneur en glucides.....	26
1.6.	la teneur en protéine.....	26
2.	Résultats et discussion de l'étude phytochimique.....	28
2.1.	Rendements d'extraction.....	28
2.3	Résultats de dosage des flavonoïdes totaux.....	29
2.4	Résultats de dosage des tanins.....	30
3.	Résultats et discussion de l'activité antioxydante.....	31
3.1.	Activité scavenger à l'égard du radical libre DPPH.....	31
3.2.	Capacité antioxydante totale.....	32
IV.	Conclusion	35

Les références bibliographique

Les Annexes

Liste des tableaux

Tableau I : Matériels et produits utilisés dans différentes analyses	12
Tableau II : Résultats du rendement d'extraction par le méthanol et l'eau distillée de la poudre d'Azolla Pinnata	28
Tableau III : Teneur en phénols totaux dans l'extrait méthanolique et aqueux de l'Azolla Pinnata	29
Tableau IV : Teneur en flavonoides totaux dans l'extrait méthanolique et aqueux de l'Azolla Pinnata	30
Tableau V : Teneur en tanins dans l'extrait méthanolique et aqueux de l'Azolla Pinnata .	30

Liste des figures

Figure 2 : Morphologie d'une fronde d'Azolla	05
Figure 3 : Echantillonnage de l'Azolla Pinnata (Photo originale)	13
Figure 4 : Préparation de la matière sèche de l'Azolla Pinnata	14
Figure 5 : Préparation de l'extrait méthanolique	19
Figure 6 : Préparation de l'extrait aqueux	20
Figure 7 : Evaluation de la teneur en glucides des différents concentrations	27
Figure 8 : Résultats de l'analyse des paramètres physico-chimique	27
Figure 9 : Extrait méthanolique sec de l'Azolla Pinnata	28
Figure 10 : Histogramme montrant l'activité scavenger des différents extraits d'Azolla Pinnata	32
Figure 11 : Histogramme de la capacité antioxydante totale de l'extrait d'Azolla Pinnata	33
Figure 12 : Evaluation de la capacité antioxydante totale de l'extrait d'Azolla Pinnata	33

Liste des abréviations

A.Pinnata : Azolla Pinnata
BHT : Hydroxy toluène butylé.
Ca : Calcium
Cd : Candle
Co : Colbate
DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
EAA : Equivalent acide ascorbique.
EC : Equivalent catéchine.
EQ : Equivalent quercétine.
ES : Extrait sec.
EX : Extrait.
g : Gramme.
H₂SO₄ : Acide sulfurique.
HCl : Chlorure d'hydrogène.
IC₅₀ : 50% Concentration inhibitrice.
M : Molarité (1mol/l).
Mg : magnésium
Mn : manganèse
min : Minute.
ml : Millilitre.
mm : Millimètre.
MS : Matière sèche.
Mo : molybdate
N : Normalité.
N₂ : Azote
Na₂CO₃ : Bicarbonate de sodium.
NaCl : Chlorure de sodium.
NaOH : Hydroxyde de sodium.
P : potassium
PH : Potentiel d'hydrogène.
Ph : phosphore
RE : Rendement
SM : Solution mère.
TAC : Capacité antioxydant totale.
UV : Ultra-violet.
v/v : Volume / volume.

Introduction

Azolla pinnata est une fougère aquatique, flottant à la surface des eaux calmes, tempérées ou tropicales, dans les cressonnières, les rizières, les étangs et dans les canaux d'irrigation.

Elle abrite une cyanobactérie du genre *Anabaena* qui a la propriété de fixer l'azote, c'est-à-dire de transformer l'azote moléculaire de l'atmosphère en azote fixé assimilable par la plante (**Reynaud et Franche, 1985; Raelina, 1995**).

Azolla pinnata est une bonne source de protéines (21 à 23%) de haute qualité. Elle contient également presque tous les acides aminés essentiels, des vitamines, du bêta-carotène, des minéraux et des quantités appréciables de bio-polymères (**Kumar et Chander, 2017**).

Les composés phénoliques les plus abondants identifiés dans *Azolla* comprennent les anthocyanidines, les coumarines, les flavonols, les flavones et les tanins condensés. Il a été démontré que le mécanisme antioxydant déclenché par les composés phénoliques végétaux est bénéfique pour la santé humaine, notamment en réduisant le risque de développer des maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète de type 2 et des maladies neurologiques (**Tran et al., 2020**).

Les objectifs de la présente étude sont :

- L'analyse physicochimique de la plante taux d'humidité, taux de cendre, matière lipidique, matière protéique, matière glucidique, teneur en fibre ;
- L'extraction des substances actives par méthanol 70% et l'eau distillée ;
- Le dosage des polyphénols, des flavonoïdes, des tanins, des différents extraits de la plante ;
- L'évaluation des propriétés antioxydantes in vitro des différents extraits à travers deux tests : l'activité scavenger à l'égard du radical libre DPPH, et la capacité antioxydante totale (CAT) .

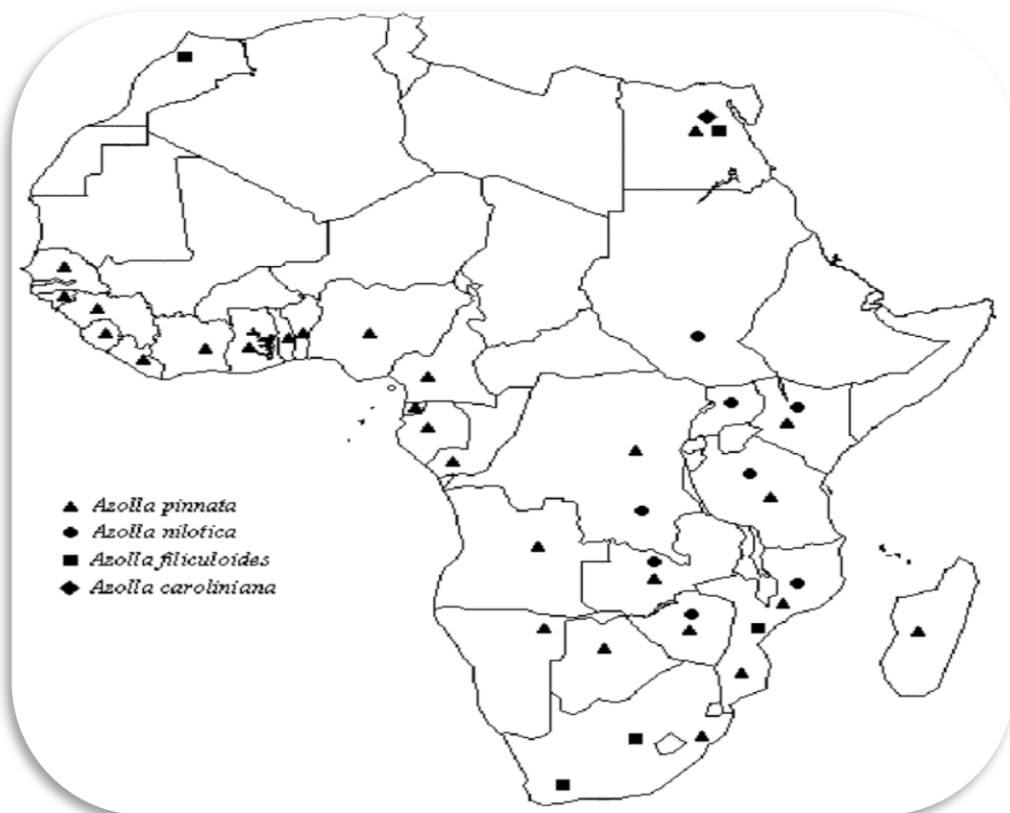
Partie bibliographique

Chapitre I

Présentation du partenaire plante *Azolla Pinnata*

1. Taxonomie, distribution géographique

Le genre *Azolla* appartient à la division des Ptéridophytes, ordre des Salviniales, famille des Azollaceae. Il existe 6 espèces, qui, en fonction de critères morphologiques (morphologie des formes végétatives - frondes - et des organes reproducteurs), sont divisées en deux sections : les *Euazolla* et les *Rhizosuerma*. La première section comprend quatre espèces originaires d'Amérique : *A. caroliniana*, *A. filiculoides*, *A. mexicana*, *A. microphylla* ; la seconde comprend deux espèces originaires d'Afrique et d'Asie : *A. nilotica* et *A. pinnata*. L'homme a, depuis le XIXe siècle, dispersé ces ptéridophytes, particulièrement *A. caroliniana* et *A. filiculoides*. La variété d'*A. pinnata* étudiée ici est localisée en Afrique subsaharienne. Elle a été dénommée en Asie var. *pinnata* par (BROWN et var, 1810). *africana* par (DESVAUX, 1827) en Afrique ; nous utiliserons cette dernière terminologie.

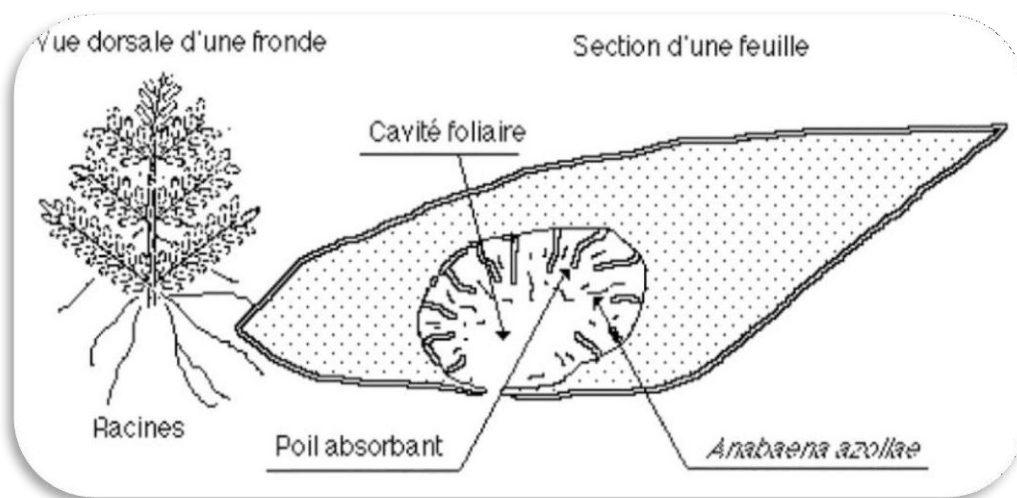


Carrapico F., Teixeira G., & Diniz M. A., 2000. *Azolla*: as a biofertilizer in Africa. Rev. Ciências Agrárias, XXIII: 120-138.

Figure 1 : distribution géographique d'*Azolla*

2.Description

Azolla pinnata est une petite plante ovale ou triangulaire au contour 1,5 à 2,5 cm de long, avec un axe principal plus ou moins droit avec des branches latérales pennées, progressivement plus longues vers la base, donc de forme grossièrement triangulaire. Les branches basales deviennent elles-mêmes pennées, faussement dichotomiques, finissent par se fragmenter lorsque l'axe principal se décompose pour former de nouvelles plantes. Les racines, fibreuses à croissance descendante, ont de fines radicelles latérales, donnant un aspect plumeux dans l'eau. Feuilles minuscules, de 1 à 2 mm de long, alternes, sessiles, imbriquées se chevauchant sur deux rangs ,lame trapézoïdale séparée en lobe dorsal et ventral dorsal et ventral.



Roger PA, Garcia J-L (2001) Introduction à la microbiologie du sol. Polycopié de cours (Université de Provence, Université de la Méditerranée, Ecole Supérieure d'Ingénieurs de Luminy. 191pp

Figure 2 : Morphologie d'une fronde d'Azolla

3. Forme d'utilisation de l'azolla

L'azolla peut être utilisé sous 3 formes : fraîche, sèche et ensilée .

3.3.Azolla fraîche : D'après (**Van Hove ,1989**), ce mode de présentation n'exige aucune opération de transformation et n'entraîne aucune dénaturation des composants.

3.2.Azolla sèche : Le séchage (au soleil) mené dans de bonnes conditions ne modifie que peu la valeur nutritive de la plante. Le séchage doit s'effectuer dans un endroit bien aéré, non humide et bien étalé l'azolla en fine couche. La durée de séchage varie de 3 à 4 jours selon la température ambiante (**Van Hove ,1989**).

3.3. Azolla ensilée : (Ruben ,1987), a montré que l'ensilage de l'azolla peut être pratiqué surtout pour traiter la biomasse excédentaire produite et utilisée comme aliment pour les animaux. Le silo est ensuite couvert. La fermentation prend moins d'un mois et le produit peut se conserver 2ans.

4. Les conditions de culture

Les espèces d'Azolla présentent une croissance maximale en été, suivie du printemps. Ça peut croître rapidement avec un temps de doublement de 2 à 5 jours. Environ 40 à 55 kg d'Azolla frais peuvent être formés à partir d'inoculum de 8 kg en 15 jours dans des parcelles de riz avec 10 cm de profondeur d'eau. La parcelle nécessite des nutriments supplémentaires sous forme de 10 kg de bouse de vache et 100 g de super phosphate triple en trois fois à 4 jours d'intervalle **(Sebastian et al., 2021)**.

Selon **(Reynaud et Franche,1985)**, les conditions de la croissance d'Azolla sont hiérarchisées de la façon suivante :

- une bonne maîtrise de l'eau .
- une protection contre les hautes intensités lumineuses.
- des températures minimales de 15 °C la nuit, 25 °C le jour et maximales de 35 °C.
- un apport de phosphore à un degré moindre, de calcium, de magnésium et d'oligo-éléments .
- une protection antiparasitaire.

4.1. Eau

La croissance d'Azolla est favorisée par une couche d'eau n'excédant pas quelques centimètres : 5 à 10 cm. Cela favorise la nutrition minérale puisque les racines sont proches du sol **(Rahagarison, 2005)**.

L'humidité relative optimale serait de 85 à 90 %. À une humidité relative inférieure à 60 l'Azolla devient sèche et fragile et plus sensible aux conditions défavorables **(Dommergues et Diem, 1982)**.

4.2. Température

La température optimale pour la croissance d'Azolla se situe entre 20 et 30 °C. Certaines souches ont pu survivre temporairement à des températures de -5 et 45 °C. D'autres souches sont très affectées par une température inférieure à 10 °C, mais peuvent supporter des valeurs dépassant 35 °C, comme le cas de nombreux écotypes d'Azolla Pinnata **(Rasoloarivony, 2003)**. Cependant, des températures supérieures à 37 °C affecteront sérieusement la multiplication d'Azolla **(Amroune, 2020)**.

4.3.pH

Habituellement, Azolla préfère un milieu proche de la neutralité ou acide. Pour une bonne croissance, le pH optimal du milieu varie de 4,5 à 7,5. Le pH du milieu de 5 à 8 favorise la croissance et la fixation de l'azote chez *A.Pinnata*. Azolla est particulièrement tolérant en ce qui concerne le pH du milieu (**Sebastian et al., 2021 ; Ntendele bikela, 2007**).

4.4.Lumière

Le taux de croissance d'Azolla augmente avec l'intensité lumineuse jusqu'à environ 50 cd ou 50 % de l'intensité lumineuse naturelle maximale. Au-delà de ce niveau, le taux de croissance reste constant ou diminue lentement selon des interactions mal définies avec d'autres paramètres écologiques (**Van Hove, 1989**). La couleur de l'Azolla passe au rouge brunâtre en raison de l'exposition à une forte luminosité en saison estivale, et il devient vert lors du retour de l'ombre. La photopériode optimale pour la croissance d'Azolla est d'environ 20 heures (**Sebastian et al., 2021**).

5.5.Nutriments

Le besoin en minéraux d'Azolla comprend les macroéléments (P, K, Ca, Mg et Mn) et les microéléments (Fe, Mo, Co). Les carences en ces éléments entraînent les diminutions des croissances (**Becking, 1979**).

Mais la caractéristique la plus remarquable dans ce domaine nutritionnel est l'indépendance totale à l'égard de la source d'Azote. Azolla croit parfaitement en absence d'azote combiné (**Amroune, 2020**). Molybdate et Colbate favorise la capacité de fixation d'azote d'Azolla (**Sebastian et al., 2021**). De tous les éléments essentiels, c'est le phosphore qui limite le plus souvent la croissance d'Azolla. Une déficience en phosphore (< 0,2 % de la matière sèche) s'accompagne d'une diminution d'activité de la nitrogénase et de la teneur en azote de l'Azolla (**Raolina, 1995**).

5.Utilisation d'Azolla

5.1.Fertilisation du sol

L'intérêt agronomique de l'Azolla est son utilisation en tant que fertilisant azoté, notamment en riziculture irriguée. En Chine et au Viêt-Nam, l'usage d'Azolla en agriculture date de plusieurs siècles sinon de millénaires . En général, 10 tonnes d'Azolla par hectare contiennent 20 – 30 kg de N azote , et au moins 70 % de cette quantité provient de la fixation biologique de l'azote atmosphérique (N₂) (**Rasoloarivony, 2003**).

Ces applications ne sont pas les seules possibles, et des recherches sont entreprises en vue d'évaluer le potentiel d'utilisation d'Azolla comme engrais verts pour des cultures sur terre ferme après fanage ou compostage (**Rahagarison, 2005**).

5.2. Alimentation humaine

Plusieurs auteurs ont mentionné dans leurs travaux l'utilisation de l'azolla dans l'alimentation de l'homme. Plusieurs recettes à base d'Azolla sont fort agréables : potage, boulettes de viande et d'Azolla, frites ou cuites à l'eau, etc. Pourtant il faut prendre des précautions pour s'assurer que la culture se fait dans des conditions d'hygiène satisfaisantes (**Raoelina, 1995**).

5.3.L'utilisation d'Azolla en alimentation animale

Cette fougère est utilisée depuis de nombreuses années dans toute l'Asie et dans certaines régions d'Afrique pour nourrir les porcs, les canards, les poulets, les bovins, les poissons, les moutons et les chèvres et les lapins (**Rajesh, 2020**).

Azolla Pinnata est recommandée comme supplément protéique non conventionnel potentiel pour le bétail pendant la période de disette (**Kumar et Chander, 2017**).

5.4.L'utilisation thérapeutique

L'Azolla pinnata est une petite fougère aquatique flottante utilisée en médecine traditionnelle, les malgaches l'utilisent comme calmant et comme somnifère. Mélangé à de la citronnelle, une tisane à base d'Azolla permet de trouver rapidement le sommeil (**MadaFlora, 2008**).

5.5. Production de la bioénergie

La productivité très élevée de la biomasse a fait d'Azolla une plante puissante pour la production de biodiesel. Cette plante ayant des niveaux suffisants de cellulose/hémicellulose, d'amidon et de lipides, ressemblant à des combinaisons de cultures bioénergétiques terrestres et de microalgues utilisées pour la production de biodiesel (**Sebastian et al., 2021**).

6. Avantages d'Azolla

Héberge une algue symbiotique bleu-vert, l'Anabaena azolle, qui est responsable de la fixation et de l'assimilation de l'azote atmosphérique. Peut doubler de taille tous les jours dans des conditions optimales de nutriments et de température de l'eau.

Source d'azote et de minéraux pour la fabrication du compost 25-30% de protéines, et faible en lignine, ce qui le rend digestible pour de nombreux animaux, ainsi que nutritif riche

en acides aminés essentiels, en vitamines (vitamine A, vitamine B12 et bêta-carotène), en intermédiaires de croissance et en minéraux comme le calcium, le phosphore, le potassium, le fer, le cuivre, le magnésium, etc.

Appétissant pour les canards, poulets, porcs, vaches, chèvres, moutons et lapins (et probablement beaucoup d'autres espèces).

Peut augmenter la production laitière des vaches de 15 à 20 %. L'azolla est un nutriment qui empêche la prolifération des algues dans les barrages agricoles, ce qui permet de conserver une eau plus utilisable pour le bétail. Peut être facilement récolté à l'aide d'une épuisette ou cultivé dans des anneaux flottants fermés qui peuvent être tirés jusqu'au bord pour faciliter la récolte. **(BRADLEY, 2012)**

7.Inconvénients d'Azolla

Étant donné qu'il s'agit d'une plante aquatique, l'azolla peut boucher les conduites d'eau et les pompes provenant des barrages agricoles si ce barrage est entièrement colonisé par l'azolla.

L'azolla morte dans une masse d'eau peut réduire la teneur en oxygène de l'eau pendant un certain temps. **(BRADLEY, 2012).**

Partie expérimentale

Chapitre II

Matériel & méthodes

II. Matériel et méthodes

Notre travail a pour objectif de valoriser la plante *Azolla pinnata*, Pour réaliser ce but, notre protocole expérimental compte sur des analyses et des testes ont été réalisés au niveau de laboratoire de la faculté de science de la nature et de la vie, université Mohamed El Bachir El Ibrahim à Boredj Bou Arreridj.

1. Matériels et produits

Les matériels et les produits utilisés dans notre travail sont illustrés dans le (Tableau I).

Tableau I : Matériel et Produits utilisés dans différentes analyses.

<i>Verreries et autre</i>	<i>Appareillage</i>	<i>Réactifs et produits</i>
Ballon en verre	Agitateur	Acide Sulfurique
Béchers	Bain Marie	hydroxyde de sodium
Entonnoirs	Balance analytique	N-Hexane
Eprouvettes	Etuve	Phénolphtaléine
Erlen meyer	Evaporateur rotatif	Phénol
Etiquettes	Four à moufle	Méthanol
Fioles jaugées	Plaque chauffante	Molybdate d'ammonium
Micropipettes	spectromètre	Phosphate de Sodium
Papier aluminium	Soxhlet	Folin ciocalteu
Portoirs		Glucose
Pots de prélèvement		Carbonate de Sodium
Récipients en verre		Vanilline
Spatules		Quercitine
Tubes à essais		Rouge de Méthle
Creusets		DPPH
Papier whatman		
Cartouche en cellulose		
Boîte en pétri		

1.1. Matériel biologique

Le matériel biologique de notre étude est l'Azolla pinnata (Figure 3). Il s'agit de petites fougères aquatiques flottantes originaires du sud-est asiatique à l'Afrique de l'Est. Elle appartient à la famille des Salviniaceae. La récolte des échantillons de l'Azolla a été faite au niveau de Wilaya Tizi Ouzou . Le prélèvement des échantillons se fait manuellement à partir des bassins de culture .

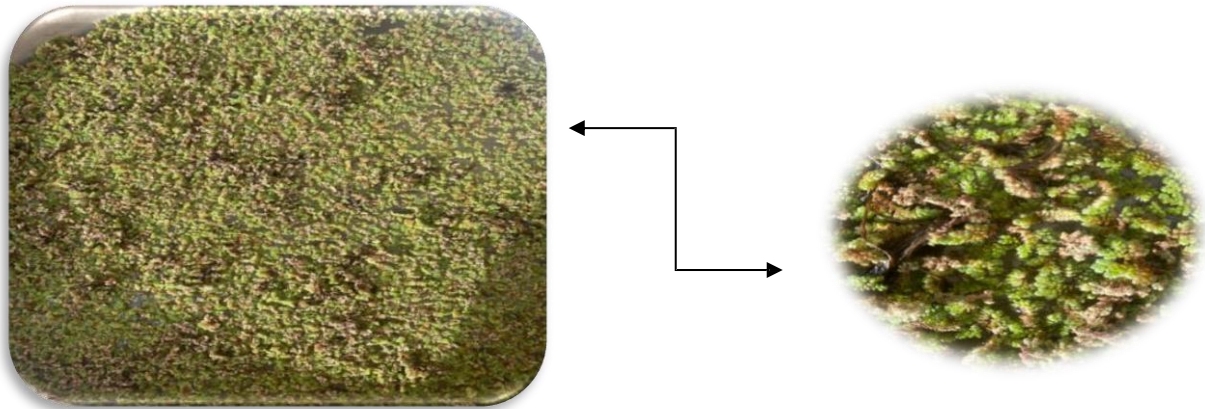


Figure 3 : Echantillonnage de l'Azolla Pinnata (Photo originale).

2. Méthodes

A propos de l'analyse des paramètres physico-chimiques , on a déterminé le taux d'humidité ,cendre par la méthode (AOAC ,2000) , la teneur en protéines par la méthode de (BIPEA ,1976) , teneur en lipides par la méthode de (BIPEA, 1976) et le taux de fibre par la méthode (Weende ,1967) .

A propos de l'analyse phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante , on a déterminé la teneur en polyphénols en utilisant le protocole décrit par (Singleton et Rossi ,1965), flavonoides par (Jain et al., 2011) ,tanins condensés par (Sun et al .,1998) , et pour l'activité antioxydante on a utilisés deux testes : l'activité antiradicalaire au DPPH selon la méthode décrite par (Bruits et Bucar ,20020) et la capacité antioxydante totale selon le protocole (d'Oyaizu,1986) .

2.1. Analyses physico-chimique

2.1.1. Préparation de l'échantillons

Suite à la récolte de l'Azolla, les échantillons ont été proprement lavés suivie d'un séchage a l'air libre pendant 3 jours , puis mises à l'étuve pendant 48 heures à température 40°C puis la broyé .



Figure 4 : Préparation de la matière sèche de l'Azolla Pinnata (photo original)

2.1.2. Détermination de taux d'humidité (H%)

L'humidité de la poudre a été déterminée par la méthode de séchage à l'étuve selon (AOAC,2000). Une quantité de 2 g de poudre de plante est met dans un creuset en porcelaine préalablement taré. Le creuset et son contenu sont ensuite placés dans une étuve universelle (Memmert) à $103 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 24 h. Après refroidissement dans un dessiccateur renfermant un desséchant (gel de silice), le creuset a été pesé. L'expérience a été répétée 3 fois. L'humidité est calculée comme suite ;

$$H\% = [(m - m') / m] \times 100\%$$

Où ;

- m : masse de l'échantillon en poudre avant le séchage.
- m' : masse de l'échantillon en poudre après le séchage.

2.1.3. Détermination de taux de cendre (Tc%)

La détermination de la teneur en cendres est basée sur la destruction de toute matière organique sous température élevée à 550°C (Linden ,1981).

Incinérer une prise d'essai de 2 g dans un four de calcination à 550°C pendant 6 heures jusqu'à combustion totale de la matière organique et obtention d'une coloration blanchâtre. Refroidir le creuset dans le dessiccateur et le peser.

La teneur en cendres exprimée en pourcentage massique de l'échantillon rapportée à la matière telle qu'elle est donnée par la relation suivante :

$$TC \% = (m_2 - m_0 / m_1 - m_0) \times 100$$

Où :

- TC: taux de cendres (%).
- m₀ : masse du creuset vide (g).
- m₁: masse du creuset et de la prise d'essai (g)
- m₂ : masse du creuset et du résidu (g)

2.1.6. Détermination de la Teneur en Fibres

Les fibres alimentaires sont des polymères glucidiques d'origine végétale ,associée ou non ,dans la plante ,à la lignine ou à d'autres constituants non glucidiques (polyphénols, phytosterols ,saponosides..) (**AFSSA, 2008**) . Les fibres sont déterminées par la méthode de (**Weende ,1967**) qui consiste en une double hydrolyse acido-basique à chaud dans un but de solubiliser la quasi-totalité du contenu cellulaire à l'exception des fibre alimentaires et des sel minéraux (**Gaouar, 2011**).

✓ La technique est faite comme suit:

- Un mélange d'1g d'échantillon préalablement séché à 105°C / 3 h et broyé, et de 150ml d'acide sulfurique (1,25%) a été porté à ébullition pendant 30 min, le résidu est ensuite filtré et lavé 3 fois avec l'eau distillé chaude.

- 150ml de l'hydroxyde de potassium (1,25%) ont été ajoutés au résidu et le mélange a été bouilli une deuxième fois durant 30 min, et reçoit alors le triple lavage par l'eau distillée chaude, suivi d'un autre par l'eau distillée froide (**AOAC ,2000**).

-Un lavage final a été réalisé à 3 reprises par 25 ml d'acétone; par la suite, on sèche à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

- Le résidu composé de fibres et de minéraux, est calciné dans un four à moufle pendant 3 h à 550°C (**AOAC,2000**).

La formule suivante permet d'estimer le taux de fibres (AOAC,2000):

$$\text{FB}(\%) = \text{P1} \times \text{P2} / \text{PO} \cdot 100$$

Dont:

- ✓ FB (%): taux de fibres brutes (%).
- ✓ P1: poids du creuset après étuvage (g).
- ✓ P2: poids du creuset après incinération(g).
- ✓ PO: prise d'essai (g).

2.1.4. Détermination de la Teneur en lipides

Les lipides sont insolubles dans l'eau et très solubles dans les solvants organiques, tel l'éther de pétrole et l'hexane. La plupart des méthodes de dosage des lipides exploitent ces propriétés physiques pour extraire les lipides des aliments ou végétaux dans le but de mesurer leur concentration .

a- Méthode Soxhlet : La méthode Soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments ou végétaux solides déshydratés (**BIPEA, 1976**). C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse à la fin de l'extraction .

b- Principe de la méthode : L'échantillon solide (poudre de la plante 4g) est pesé et placé dans une capsule de cellulose. L'échantillon est extrait en continu par l'hexane à ébullition qui dissout graduellement la matière grasse. Le solvant contenant la matière grasse retourne dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Seul le solvant peut s'évaporer de nouveau, la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, l'hexane est évaporé, généralement sur un évaporateur rotatif, et la matière grasse est pesée. Les capsules de cellulose sont perméables au solvant et à la matière grasse qui y est dissoute. Ces capsules sont jetables. La teneur en fraction lipidique est calculé selon la règle ;

$$\checkmark \text{ Lipides } (\%) = (\text{P1} - \text{P2}) / \text{ME} \times 100\%$$

- P1 : poids du ballon après évaporation.
- P2 : poids du ballon vide.
- ME : masse de la prise d'essai.

2.1.5. Détermination de la teneur en glucides

La détermination de la quantité en oses repose sur le dosage des sucres totaux par la méthode de (Dubois ,1956) appelée aussi méthode phénol / acide sulfurique.

➤ Principe

Le dosage des monosaccharides constitutifs des polysaccharides nécessite la rupture de toutes les liaisons glycosidiques par hydrolyse d'acide (l'acide sulfurique).

L'analyse repose sur des techniques colorimétriques; le principe des dosages colorimétriques se base sur la condensation par estérification d'un chromogène (phénol, orcinol, anthrone), avec les produits de déshydratation des pentoses, hexoses, et acides uroniques. En milieu acide fort et à chaud, ces oses se déshydratent respectivement en des dérivés du furfural, 5-hydroxy-méthylfurfural et de l'acide 5-formylfuroïque.

Les chromophores ainsi formés de couleur jaune orange absorbent dans le domaine du visible proportionnellement avec la quantité des sucres présents (Ruiz, 2005).

La teneur en sucres est exprimée en $\mu\text{g/ml}$ de α -D-Glucose à partir d'une courbe d'étalonnage.

➤ Mode opératoire

❖ Préparation des échantillons

Le dosage des glucides a été réalisé selon le protocole du (Dubois et al., 1956)

- Peser 0,5 g d'échantillon dans un bêcher, ajouter 20 ml d'acide sulfurique à 0,5 N puis placer l'ensemble dans une étuve à 105°C pendant 3 heures.

- Transvaser quantitativement le contenu du bêcher dans une fiole de 500 ml (ajuster le volume par de l'eau distillée jusqu'à 500 ml), puis filtrer la solution et la conserver à 4°C.

❖ Préparer l'essai

- Dans un tube en pyrex (2 cm θ), déposer avec précaution 1 ml d'essai, ajouter 1 ml de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) concentré.

- Après agitation (au vortex), le tube est maintenu dans l'étuve pendant 5 min à 100°C, puis laissé dans l'obscurité pendant 30 min.

- Enfin, lire la densité optique à une longueur d'onde de 490 nm.

❖ Préparation de l'étalon

Pour chaque série de détermination, une gamme d'étalonnage est nécessaire ; une solution mère (SM) de α -D-glucose de concentration 100 $\mu\text{g/ml}$ est préparée comme suit ;

-Préparer une solution de glucose de 0,01 g / 100 ml (100 $\mu\text{g/ml}$).

-A partir de cette solution mère préparer des dilutions de différentes concentrations 20 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 80 $\mu\text{g/ml}$, et 100 $\mu\text{g/ml}$.

-Prendre 1 ml de chaque concentration (2 essais pour chaque concentration) et ajouter 1 ml de phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique à 98% à l'aide d'une burette.

-Après agitation (au vortex), les tubes sont maintenus pendant 5 min à 100°C, puis à l'obscurité pendant 30 min.

-Lire la densité optique de chaque concentration à 490 nm, après tracer la courbe d'étalonnage.

➤ Expression des résultats

A partir des densités optiques de la courbe d'étalonnage, on peut obtenir la teneur en sucres de l'échantillon. La courbe d'étalonnage :

The diagram consists of a rectangular box with a light gray background. On the left side, the text $DO=f(C)$ is written in black. A thick black arrow points from this text to the right side of the box, where the text $DO = \epsilon \times C$ is written in black.

Dont :

ϵ : La pente.

C : La concentration de α D Glucose en $\mu\text{g/ml}$.

La teneur en sucres est exprimée en $\mu\text{g/ml}$ de α -D-glucose, elle est convertie par rapport à 100 g de matière sèche.

2.1.5. Détermination de la teneur en protéines

Le dosage des protéines a été effectué selon la méthode de (BIPEA ,1976) utilisant un distillateur Kjeldahl; cette méthode est basée sur le dosage de l'azote total, qui est ensuite converti en taux de protéines.

La minéralisation de 1 g d'échantillon par 20 ml d'acide sulfurique se fait en présence d'un catalyseur composé de 10 g sulfate de potassium (K_2SO_4) et de 2 g d'oxalate de potassium ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$) dans un digesteur type Buchi 430 (Digester Germany), pendant 5 h.

Ensuite, une distillation est effectuée dans un distillateur type Buchi 320 (Germany), après addition de 70 ml de solution de soude (NaOH) à 40% au minéralisat. Le distillat est recueilli dans 15 ml d'une solution tampon d'acide borique préparée par dissolution de 40 g d'acide borique dans 1000 ml d'eau distillée et 10 ml d'une solution de rouge de méthyl 0,05% comme indicateur coloré .

Le titrage du distillat se fait avec l'acide sulfurique 0,1 N. Les taux d'azote total et de protéines brutes sont obtenus avec des formules :

Où ;

$$\text{Taux d'azote total (\%)} = V(\text{H}_2\text{SO}_4) \times N(\text{H}_2\text{SO}_4) \times 0,014 \times 100\%$$

- ✓ $V(\text{H}_2\text{SO}_4)$ = volume H_2SO_4 de la chute de burette.
- ✓ $N(\text{H}_2\text{SO}_4)$ = normalité de l'acide sulfurique.
- ✓ 0,014 = coefficient affecté à la concentration de la solution normale d'azote (14/1000).
- ✓ P = poids de l'échantillon.

Conversion du taux d'azote en taux de protéines 100 g de protéines correspond à 16 g d'azote dans la majorité des cas.

On utilise un facteur de conversion basé sur le taux moyen d'azote des protéines.

$$\checkmark F = 100 / 16 = 6,25$$

2.2. Analyses phytochimique

2.2.1. Préparation des extraits

Dans cette étude, deux méthodes ont été optées pour extraire les composés actifs présents dans notre échantillon : macération par le méthanol et décoction par l'eau distillée.

✓ La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire le principe actifs. c'est une extraction qui se fait à température ambiante (**Lagnika, 2005, Mahmoudi, 2012**)

Cette méthode d'extraction à été effectuée selon le protocole décrit par (**Hamia et al 2014**), avec quelques modifications :

- Dans une fiole, introduire 10 g d'échantillon;
- Ajouter 100 ml du solvant (méthanol à 70% v/v);
- Laisser le mélange en contacte durant 24 h à température ambiante (avec agitation occasionnelle);
- Filtrer le mélange par un tissu puis sur papier whatman N° 1;
- Répéter l'extraction deux fois sur le retentât dans les mêmes conditions
- Les trois filtrats obtenus sont mélangés et séchés à l'étuve portée à 40°C jusqu'à l'obtention d'un extrait sec qui sera conservé à 4°C pour servir aux différents tests.

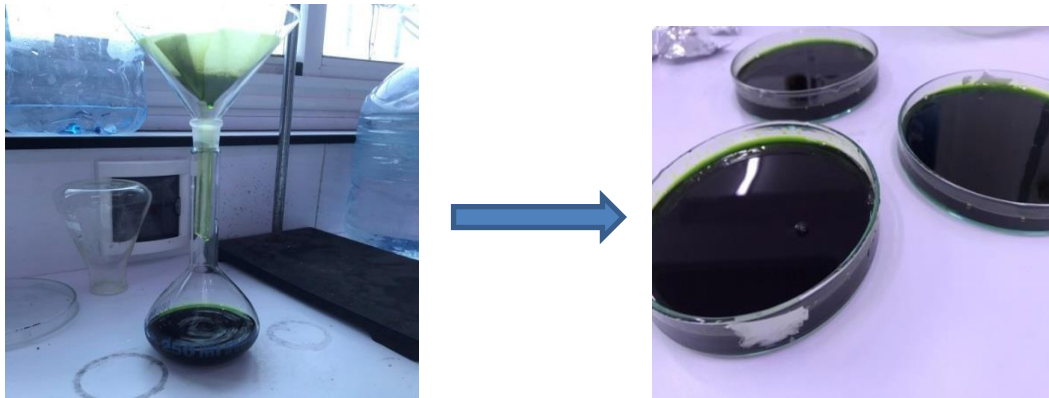


Figure 5 : Préparation de l'extrait méthanolique

✓ La décoction est l'opération dans laquelle le solide est plongé dans le solvant liquide mis en ébullition. Il s'agit d'une opération brutale qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide et parfois indispensable (**Ley bros et Frémeaux, 1990**).

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par (**KONKON et al., 2006**) en y apportant quelques modifications:

- Dans une fiole, introduire 10 g d'échantillon;
- Ajouter 200 ml eau distillée puis agiter manuellement et doucement;
- Chauffer le mélange dans un bain-marie bouillant pendant 30 minutes.
- Laisser le mélange refroidir à la température ambiante;
- Filtrer sur un papier filtre Wathman n°1;
- Répéter la procédure deux fois sur le retentât dans les mêmes conditions ;
- Les trois filtrats obtenus sont placés dans un seul récipient.

Les trois filtrats obtenus sont mélangés et séchés à l'étuve portée à 40°C jusqu'à l'obtention d'un extrait sec qui sera conservé à 4° C pour servir aux différents tests.

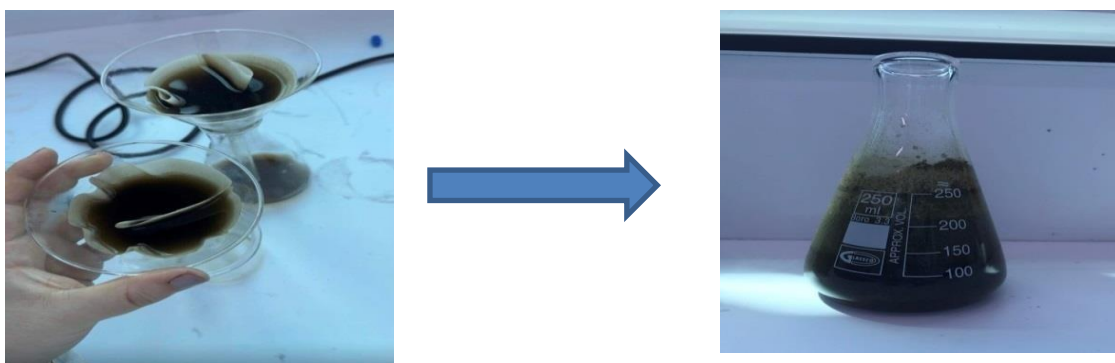


Figure 6 : Préparation de l'extrait aqueux

2.2.2. Dosages des polyphénols totaux

➤ Principe

L'estimation de la teneur en composés phénoliques extractibles totaux a été effectuée par spectrophotométrie UV-Visible selon la méthode au réactif de Folin Ciocalteu.

➤ Mode opératoire

Dans un tube à essai, on introduit 0.2 mL de l'extrait aqueux, 0.8 mL de la solution de Na₂CO₃ à 7.5% et on agite. 1 mL de la solution de Folin Ciocalteu (10 mL du réactif Folin Ciocalteu +90 mL d'eau distillée) y est additionné.

L'ensemble est incubé à une température ambiante pendant deux heures. La lecture est effectuée contre un blanc sans extrait à 760 nm.

➤ Préparation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique :

Une gamme étalon a été établie de 0.01 à 0.2 mg/mL avec l'acide gallique pour calculer la concentration des composés phénoliques dans chaque extrait. Les résultats sont exprimés en équivalent-mg d'acide gallique/g d'extrait.

La concentration des polyphénols a été déterminée par la formule suivante ;

$$T = Cx (Vx D) / Ps$$

T: teneur en phénols totaux.

C: concentration des polyphénols en équivalent d'acide gallique déduit de la courbe.

V: Volume de l'extrait.

D: facteur de dilution.

Ps: poids de la matière sèche.

2.2.3. Dosages des flavonoïdes totaux

➤ Principe

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par la méthode de (Zhishenet al.,1999) avec le trichlorure d'aluminium (AlCl₃). En présence de trichlorure d'aluminium, les flavonoïdes sont capables de former un complexe acide stable de couleur jaunâtre absorbant dans le visible à 510 nm, grâce à la présence des groupements ortho-dihydroxyles sur les noyaux A ou B et les groupements hydroxyles libres en position C-3 et C-5 ou le groupement cétonique en position C-4 des flavonoïdes.

➤ **Mode opératoire**

Dans un tube à essai, on introduit 1 mL de l'extrait méthanolique. 1 mL de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol) est ajouté. Le mélange est vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation, l'absorbance est lue à 430 nm.

➤ **Préparation de la courbe d'étalonnage de la quercétine**

Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant de la quercétine comme contrôle positif. Une gamme de 10 concentrations de quercétine allant de 40 à 2.5 $\mu\text{g/mL}$ a été préparée à partir d'une solution mère à 400 $\mu\text{g/mL}$. La teneur en flavonoïdes est exprimée en ($\mu\text{g Eq/g}$ d'extrait).

2.2.4 .Dosage des tanins condensés

➤ **Principe**

Nous avons adopté la méthode à la vanilline avec l'HCl. Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des TCs et la formation de complexes rouges cela s'explique par la propriété des tanins à se transformer en anthocyanidols de couleur rouge par réaction avec la vanilline. La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de vanilline décrite par (Julkunen-Titto, 1985) .

➤ **Mode opératoire**

Un volume de 50 μl de chaque extrait a été ajouté à 1500 μl de la solution vanilline/méthanol à 4 %, puis mélangé vigoureusement. Ensuite, un volume de 750 μl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) a été additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc. Différentes concentrations comprises entre 0 et 1000 $\mu\text{g/ml}$ préparées à partir d'une solution mère de la catéchine, permettront de tracer la courbe d'étalonnage.

2.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits des plantes a été réalisée par cinq techniques chimiques (la capacité antioxydante totale, la réduction de fer, le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical hydroxyle et le blanchiment du β -carotène

Dans ce travail, deux tests sont réalisés pour évaluer l'activité antioxydante in vitro de la plante étudiée à savoir : l'activité antiradicalaire au DPPH, et la capacité antioxydante totale .

2.2.6. Activité anti radicalaire

La capacité des extraits de l'Azolla Pinnata de réduire le radical libre stable 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) a été évaluée selon la méthode décrite par (**Burits et Bucar ,2000**).

Le DPPH a été dissout dans 100 ml de méthanol pour préparer une solution mère, la solution étalon a été préparée en diluant la solution mère de DPPH avec du méthanol pour obtenir une absorbance de $(0,98 \pm 0,02)$ à 517 nm. Un volume de 100 µl de chaque extrait à différentes concentrations a été ajouté à 2,5 ml de solution méthanolique de DPPH diluée.

Le mélange a été agité et maintenu à l'obscurité pendant 30 min, l'absorbance de la solution résultante a été mesurée à 517 nm. Un contrôle est préparé en remplaçant la solution d'extrait par le méthanol .

Le blanc pour chaque extrait est préparé en mélangeant 2,5 ml de méthanol avec 100 µl de solvant d'extraction. Toutes les opérations sont réalisées en triplicata.

L'acide ascorbique est utilisé comme antioxydant de référence. Le pourcentage de l'activité scavenger du radical DPPH de chaque extrait est calculé comme suit :

$$\text{Activité scavenger du radical DPPH}\cdot(\%) = [(Ac - (At - Ab) / Ac)] 100\%$$

Où

Ac : Absorbance du contrôle; c'est l'absorbance du solvant avec seulement le DPPH.

At : Absorbance du test; c'est l'absorbance de la solution de DPPH. contenant l'extrait.

Ab : Absorbance du blanc ; c'est l'absorbance de la solution de l'extrait sans le DPPH.

Les résultats sont exprimés en IC50 qui est la concentration qui induit 50% d'activité scavenger du radical DPPH.

2.2.7. Capacité antioxydant totale

La capacité antioxydante totale des extraits de l'Azolla Pinnata a été évaluée par le test du phosphomolybdène selon la procédure décrite par (**Prieto et al. ,1999**). Une aliquote de 0,3 ml de chaque extrait ou étalon a été mélangée avec 3 ml du mélange réactionnel (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium).

Ensuite, les mélanges ont été incubés à 95°C pendant 90 min et l'absorbance a été enregistrée à 695 nm.

L'activité antioxydante a été exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec (mgEAG/g d'ES).

Le BHT et le BHA ont été utilisés comme standards de référence dans les mêmes conditions.

Chapitre III

Résultats et discussions

1. Résultats et discussion de l'étude physicochimique

1.1. Taux d'humidité

D'après les résultats obtenus, la plante étudiée présente un taux d'humidité de $(6,41 \pm 0,13\%)$, une valeur supérieure à celle trouvée par (**Madjoudj,2021**) avec $(2,12\%)$. Cette teneur lui confère une longue durée de conservation de la poudre.

Il convient de noter également qu'un taux d'humidité trop élevé favorise le développement de micro-organismes (**Hélène, 2014**).

1.2. Taux de cendre

Dans la présente étude, la plante présente un taux de cendre de $(19,31 \pm 0,23)\%$. Ce résultat est conforme aux normes décrites dans l'encyclopédie (**Feedipia, 2019**), en accord avec celui de (**Van Hove,1995**) et proche aux résultats évoquées par (**Alalade et al.,2006**) avec $(16,2\%)$.

L'*Azolla* est très riche en minéraux, Elle contient les macro et les microéléments Cette richesse en minéraux change en fonction des paramètres de culture (**Camacho Rodriguez et al., 2009**).

1.3. Teneur en fibre

En ce qui concerne la cellulose Weende ou fibres brutes, nos échantillons renferment un taux de $(12,04 \pm 0,4\%)$ conforme aux normes décrites dans l'encyclopédie (**FEEDEPIA,2019**), Et en accord avec ceux de (**Alalade et al.,2006**) mais supérieur à ceux de (**Samanta et Tamang.,1995**).

D'après (**Ramlu et Rao.,2003**), la teneur en fibres est modulée par la localisation géographique, la constitution génétique, l'état du sol, les conditions agronomiques et climatiques de la culture, mais aussi par la méthode de dosage utilisée.

Du point de vue nutritionnel, les fibres alimentaires ont plusieurs effets bénéfiques sur la santé, notamment l'augmentation du bol fécal, la diminution de la cholestérolémie et du taux de LDL (Lipoprotéine de basse densité) plasmatique et la diminution de la glycémie et de l'insulinémie post-prandiale (**Bruneton, 1999**).

1.4. Teneur en lipides

La teneur en matière grasse dans les fougères aquatiques dépend de l'espèce et est affecté par des conditions de culture telles que les nutriments, la salinité, la température, le pH et même l'association avec d'autres micro-organismes (**Li et al., 2007**).

Dans notre étude , les résultats du dosage de la fraction lipidique ont montré une teneur moyenne de $(2,32 \pm 0,21\%)$ Ce résultat est conforme aux normes mentionnées dans l'encyclopédie (FEDEEPIA ,2019) , en accord avec celui de (Vanhove ,1995) et conforme aux résultats mentionnés par (Alalade et al .,2006) .

Plusieurs paramètres influent sur le taux de lipides comme la granulométrie, l'humidité ,la nature du solvant et la méthode d'extraction utilisée (Gaouar ,2011).

1.5. Teneur en glucides

Il a été rapporté que les hydrates de carbone ont un rôle de structure car ils rentrent dans la composition de la paroi cellulaire. Ce sont aussi une matière de réserve énergétique de la cellule. Il a été trouvé un taux de glucides $(25,37 \% \pm 0,29)$ inférieur à ceux rapportés par (Alalade et al.,2006) avec (47%), mais largement supérieur à celui de (Van Hove ,1995) avec (3-5%) .

Comme toute la composition biochimique, le taux des glucides peut être affecté par le changement des paramètres de culture (Azote, température, pH, CO₂.....).

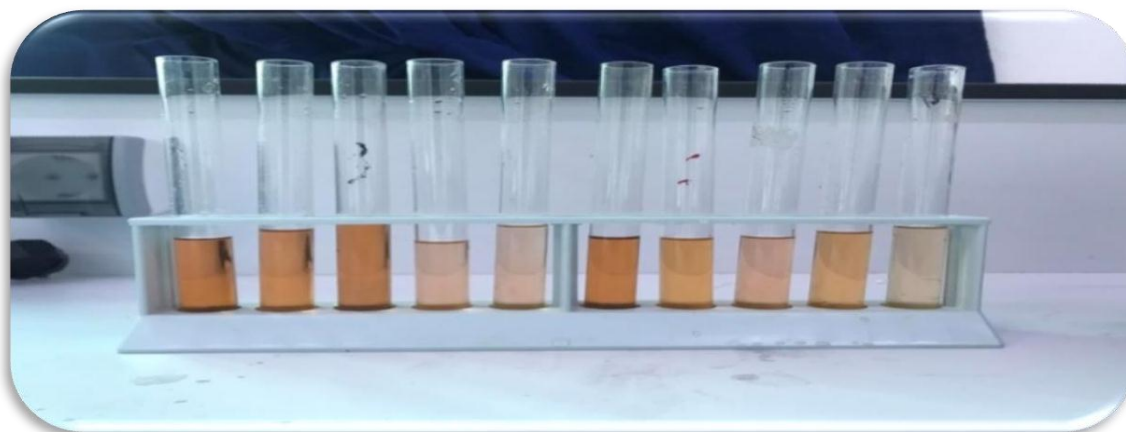


Figure 7 : Evaluation de la teneur en glucides des différents concentrations

1.6. Teneur en protéines

Les protéines représentent un élément indispensable dans la cellule, dont ils jouent un rôle capitale dans leur croissance, réparation ainsi que leur maintenance. Il est aussi un régulateur cellulaire et de défense contre les intrus qui menace la cellule (Djamai, 2019) .

Dans la présence étude les résultats du dosage de la fraction protéique ont montré une teneur moyenne de $(17,60 \pm 0,49)$.Ce résultat est également en accorde avec celui de (FEEDPEDIA, 2019) , proche à ceux de (Alalade et al .,2006) avec (21,4%) et de (Samanta et Tamang,1995) .

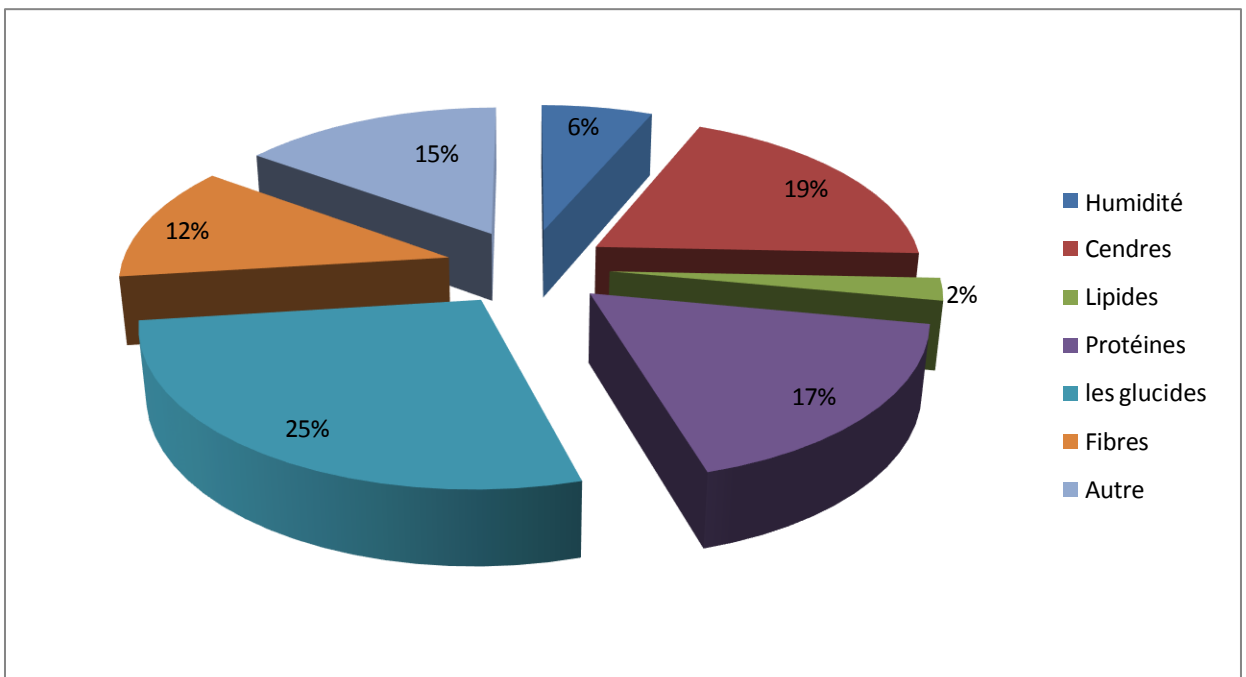


Figure 8 : Résultats de l'analyse des paramètres physicochimiques d'*Azolla pinnata*.

2. Résultats et discussion de l'étude phytochimique

2.1. Rendements d'extraction

Tableau II: Résultat du rendement d'extraction par le solvant méthanol aqueux de la poudre d'Azolla Pinnata .

	<i>Extrait méthanolique</i>	<i>Extrait aqueux</i>
Poids Sec (g)	10	10
RE (%)	40,37	18,37

Le taux le plus élevé a été détecté dans l'extrait méthanolique suivi par l'extrait aqueux . Les résultats obtenus sont proches à ceux rapportés par (**Madjoudj fateh Gaia, 2021**) qui a utilisé les mêmes méthodes d'extraction avec les mêmes solvants.

Il importe de noter que le rendement d'extraction dépend de la méthode d'extraction (à chaud ou à froid), des conditions de séchage (lieu, température et durée de séchage), du stade de croissance et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction ou fractionnement et de sa polarité, la taille des particules et le coefficient de diffusion du solvant (**Lee et al., 2003; Fella, 2006**).

Le méthanol est le solvant d'extraction le plus utilisé par excellence dans les extraits végétaux. selon (**Mahmoudi S et al., 2013**)



Figure 9 : Extrait méthanolique sec de l'Azolla Pinnata

2.2. Résultats du dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans notre alimentation. Ils sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (**Daglia, 2011**).

Tableau III: Teneur en phénols totaux dans l'extrait méthanolique et aqueux de l'Azolla Pinnata

<i>Teneur (mg/mg)</i> / <i>Extrait</i>	Extrait methanolique	Extrait aqueux
Teneur en phénols totaux (mg EAG / mg extrait)	127,42	107,28

EAG :équivalent acide galique

Les teneurs en polyphénols totaux des deux extraits varient entre (127,42±4,9 mg EAG/g) à (107,28±4,4 mg EAG/g).

La concentration la plus élevée des phénols a été mesurée dans l'extrait méthanolique , avec un taux (127,42mg EAG/g), par rapport à l'extraits aqueux , où nous enregistrons des teneurs de l'ordre de (107,28 mg EAG/g).

Les valeurs obtenues dans l'extrait méthanolique sont largement supérieures à celles mentionnées par (**Berbache et al.,2022**) qui ont rapporté des teneurs en polyphénols de (53,5mg /g DW).

2.3. Résultats de dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont considérés comme des pigments quasiment universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (Safer, 2018).

Tableau IV : Teneur en flavonoïde totaux dans l'extrait méthanolique et aqueux de l'Azolla Pinnata

<i>Teneur (mg/mg) Extrait</i>	Extrait méthanolique	Extrait aqueux
Teneur en flavonoïdes (mg de EQ / mg extrait)	16,17	12,47

EQ : equivalent Quercitine

D'après Les résultats présents dans le Tableau , montrent que les teneurs en flavonoïdes totaux varient entre les deux types d'extraits. L'extrait aqueux qui renferme des teneurs plus faibles ($12,47 \pm 0,29$ mg EQ/g) en comparaison à la concentration des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique ($16,17 \pm 0,31$ mg EQ/g) .

Les valeurs atteintes dans l'extrait méthanolique sont inférieures à celles obtenues par **(Berbache et al.,2022)** qui ont relevé des teneurs en flavonoïdes de (46mg EC/g) .

La variation de la teneur en flavonoïde est associée avec le type de cultivar, les méthodes d'extraction , de dosage, et les conditions environnementaux **(Maataoui et al; 2006)** .

2.4 Résultats de dosage des tanins

Les tannins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...), ce sont des substances de saveur astringente ayant la propriété de tanner la peau et de se combiner aux protéines animales par des liaisons hydrogènes, ils sont solubles dans l'eau et caractérisés par leur astringence **(Safer, 2018)**.

Tableau V : Teneur en tanins dans l'extrait méthanolique et aqueux de l'Azolla Pinnata .

<i>Teneur (mg/mg) Extrait</i>	Extrait méthanolique	Extrait aqueux
Teneur en tanins (mg de EC/ mg extrait)	100,66	87,66

D'après les résultats présents dans le tableau, le taux le plus élevé a été détecté dans l'extrait méthanolique ($100,66 \pm 4,04$ mg EC/g), suivi par l'extrait aqueux ($87,66 \pm 1,91$ mg EC/g)

Les valeurs obtenues dans l'extrait méthanolique sont également supérieures à celles évoquées par **(Berbache et al., 2022)** qui ont rapporté des teneurs en tanins de 16 mg EC/g.

Grâce à leur astringence les tanins sont utilisés comme anti diarrhéiques, vasoconstricteurs et hémostatiques, mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes **(Paris et Hurabielle., 1981)**.

Ils sont également largement employés dans l'industrie du cuir surtout dans les vernis et les peintures **(Paris et Hurabielle., 1981)**.

3. Résultats et discussion de l'activité antioxydante

Plusieurs études ont montré que l'effet antioxydant des sources naturels est dû à leurs teneurs en composés phénoliques **(Yang et al., 2002)**, et que les groupements hydroxyles dans les composés phénoliques et flavonoïdes sont responsables de leurs pouvoirs antioxydants **(Heignen et al., 2001; Heim et al., 2002)**. Pour les flavonoïdes, les formes aglycones sont plus actives que les formes glycosylées **(Shahidi et Naczk, 2004)**. Donc y a des relations entre les structures chimiques des composés phénoliques et leur capacités antioxydantes, l'activité de ces molécules à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leur structures, les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'-4' dihydroxy sur le cycle B et/ou un groupement 3OH sur le cycle C **(Amic et al., 2003 ; Marfak, 2003 ; Sokol-Letowska, 2007)**.

2.2. Activité scavenger à légard du radical libre DPPH

Les résultats obtenus révèlent que l'extrait méthanolique semble être le plus actif avec une IC50 de ($0,35 \pm 0,02$ mg/ml), suivi de l'extrait aqueux avec une valeur d'IC50 de ($0,95 \pm 0,01$ mg/ml).

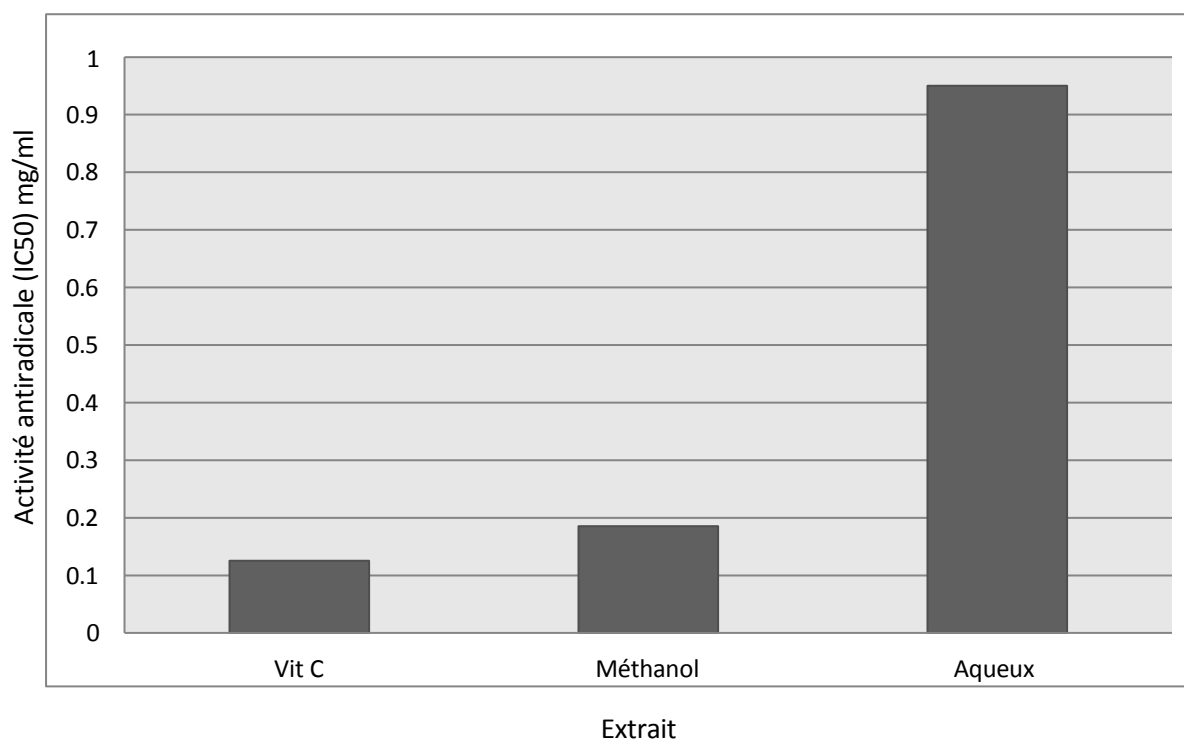


Figure 10 : Histogramme montrant l'activité scavenger des différents extraits d'Azolla Pinnata à l'égard du radical DPPH

Dans ce test, la vitamine C a été utilisée comme antioxydant standard à des fins comparatives. Elle a montré une très forte activité antiradicale avec une IC50 de $(0,125 \pm 0,004 \text{ mg/ml})$.

2.3. Capacité antioxydante totale

Les résultats obtenus ont montré que l'activité antioxydante totale varie également en fonction des différents extraits.

L'extrait le plus actif est l'extrait méthanolique ($37,14 \pm 0,14 \mu\text{g EAA / mg}$), puis l'extrait aqueux ($20,14 \pm 0,04 \mu\text{g EAA / mg}$).

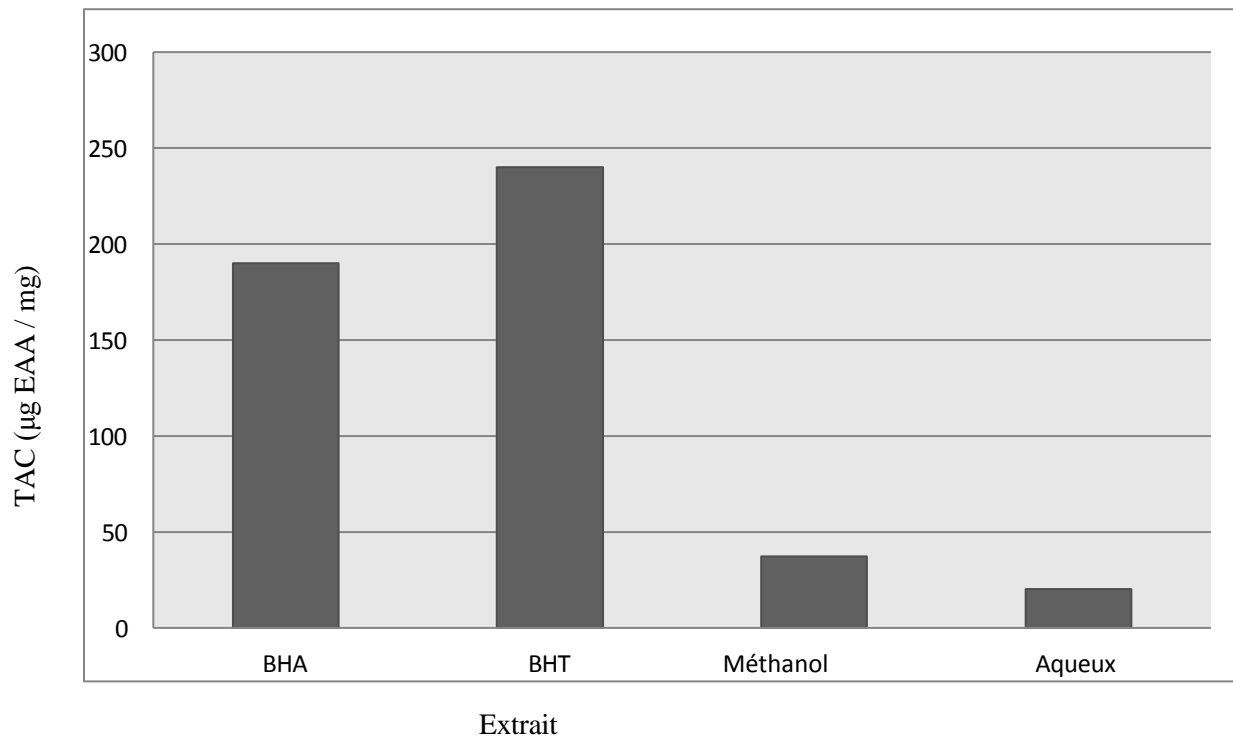


Figure 11 : Histogramme montrant totale de la capacité antioxydante totale extraits d'Azolla Pinnata.

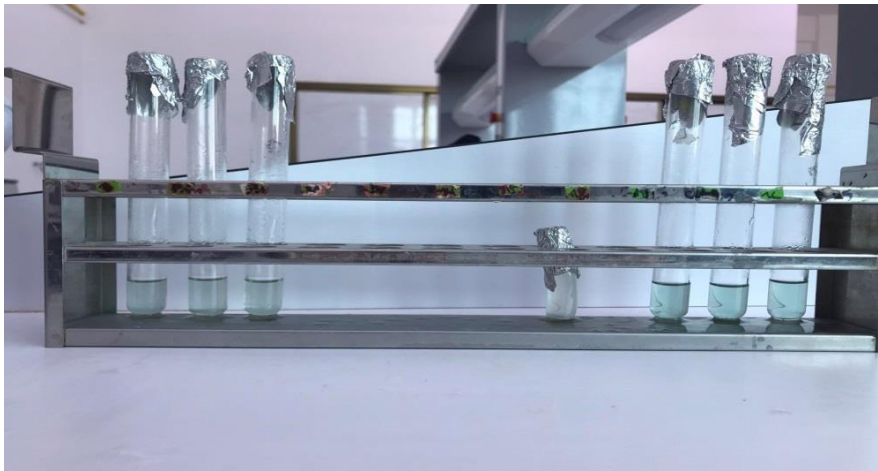


Figure 12 : Evaluation de la capacité antioxydante totale des extraits d'Azolla Pinnata .

Conclusion

IV. Conclusion

Notre étude, vise à la valorisation d'une plante fougère, *Azolla Pinnata* utilisée depuis longtemps par les agriculteurs principalement en Asie pour nourrir leurs animaux et comme engrais vert. L'ensemble des travaux présentés dans ce mémoire s'articule autour de deux parties:

La première partie est consacrée à une étude bibliographique sur les généralités d'*Azolla Pinnata*

La deuxième partie constitue une contribution à une meilleure connaissance des propriétés physico-chimiques et phyto-chimiques de cette plante, ainsi que sur l'étude de certaines de ses propriétés biologiques, à savoir l'activité antioxydante de différents extraits (méthanolique et aqueux).

L'analyse des paramètres physico-chimiques de l'*Azolla Pinnata* renferment un taux d'humidité de 6,19 % ; un taux de cendre de 19,31 % ; une teneur en protéines de 17,60% , en matière grasse de 2,32 % ; un taux de glucide de 25,37 % et une teneur en fibre de 12,04%.

Pour ce qui est des résultats d'extraction de la matière sèche d'*Azolla Pinnata*, nous avons pu constater que le rendement le plus élevé a été noté pour l'extrait méthanolique (40,37%) suivi par l'extrait aqueux (18,37%) .

L'analyse quantitative des extraits étudiés montrent une richesse en polyphénols, flavonoïdes et en tanins dans cette plante. Les résultats de l'activité antioxydante montrent que les extraits exercent une bonne capacité de piégeage des radicaux libres et une activité antioxydante totale satisfaisante.

La composition de l'*Azolla pinnata* en fait donc l'un des aliments de substitution les plus économiques et les plus efficaces pour le bétail, d'autant plus qu'il est facile à digérer par le bétail en raison de sa teneur élevée en protéines et de sa faible teneur en lignine, ainsi sa richesse en composés phénoliques.

Tous ces résultats indiquent bien que les composés phénoliques présents dans l'*Azolla pinnata* pourraient être utilisés comme des antioxydants. Néanmoins, des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires de cet effet. Donc il serait intéressant d'explorer d'autres aspects tel que :

- Orienter l'étude vers d'autres activités biologiques telles que les activités anti-inflammatoires , anti-bactériennes , anticancéreuses et antifongiques.
- Compte tenu de sa richesse en minéraux , il est envisageable de formuler un médicament à base de cette plante .
- Étude de l'efficacité de ces extraits dans le domaine alimentaire afin d'établir leurs utilisation comme agents antioxydants naturels dans la sécurité alimentaire .
- Il est très important d'extraire et de tester les activités biologiques des huiles essentielles de cette plante.

Par le biais de ce travail, nous espérons avoir apporté notre modeste contribution à la valorisation de la plante *Azolla pinnata*.

Références bibliographique

Références bibliographique

AFSSA. Table CIQUAL. Composition nutritionnelle des aliments. (2008).Gaouar,N. (2011). Etude de la valeur nutritive de la caroube de différentes variétés Algérienne. Thèse de magistère en Nutrition. Université Abou Bakr Belkaid. Tlemcen, 95p

AFSSA. Table CIQUAL. Composition nutritionnelle des aliments. (2008).Gaouar,N. (2011). Etude de la valeur nutritive de la caroube de différentes variétés Algérienne. Thèse de magistère en Nutrition. Université Abou Bakr Belkaid. Tlemcen, 95p

Amroune N. 2020. Alimentation du lapin: valorisation de l'Azolla dans l'alimentation des lapins etude bibliographique. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de master. 40 p

AOAC. (2000). Official Methods of Analysis (13th edn). Association of Official Analytical Chemist: Washington, DC. Agron. Fr (1), p12.

Asian J. Adv. Basic Sci. (2017). 5(2). 65-68.

Azolla Pinnata Var. Pinnata, Dakar: ORSTOM. 15p

Becking J.H. Environmental requirements of Azolla for use in tropical rice production, Nitrogen and rice symposium proceedings. (1979). 345-373.

BIPEA. (1976). Bureau interprofessionnel d'études analytique, Recueil des Méthodes d'Analyse des Communautés Européennes. BIPEA: Genevilliers; 51-52.

Burits M., Bucar F. (2000). Antioxidant Activity of Nigella Sativa Essential Oil, Phytotherapy.Res., 5(14), 323-328. [http://doi.org/10.1002/1099-1573\(200008\)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q](http://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5<323::AID-PTR621>3.0.CO;2-Q).

Developements in plant and soil science. (1982). 5. 329p.

Dommergues Y.R., Diem H.G.Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity. **Dubois**

M.K.A., Gilli Y.K., Hamilton P.A. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances Anal And chem, 28:350-356.

FEEDIPEDIA 2019 . <https://www.bing.com/plante;Azolla>

Jain D.P., Pancholi S.S ., Rakesh Patel R. (2011). Synergistic antioxidant activity of green tea with some herbs. J. Adv. Pharm. Technol. Res. 2, 177–183

Kumar G. and Chander H. A Study on the Potential of Azolla pinnata as Livestock Feed Supplement for Climate Change Adaptation and Mitigation

Kumar G. and Chander H. A Study on the Potential of Azolla pinnata as Livestock Feed Supplement for Climate Change Adaptation and Mitigation. Asian J. Adv. Basic Sci. (2017). 5(2). 65-68.

MadaFlora 2008. <https://www.madaflora.com/vertu-des-plantes.php>

Ntendele Bikela A. 2007. Essai comparatif de la qualité fertilisante d'*Azolla cristata* et d'autres fumures (fiente, lisier et urée). Mémoire licence. Institut supérieur pédagogique de la Gombe Kinshasa.

Madjoudj Fateh Gaia (2021).Extraction des composés bioactifs de l'*Azolla pinnata* et évaluation de leur activité antioxydante. Memoir de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master en science biotechnologie.

Mahmoudi S., Kali M., Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Revue Nature et Technologie.* (2013). 5(2). 35-40.

Prieto P., Pineda M., Aguilar M.M. (1999). Spectrophotometric quantitation of Antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem*, 269: 337-341

Raeolina B.A. 1995. L'utilisation de l'*Azolla* dans l'alimentation Du poulet de chair. Mémoire de fin d'étude, université d'Antananarivo

Rahagarison. 2005. Etude bibliographique de l'*Azolla* ou la <<<< ramilamina >> plante fertilisatrice d'Azote (N₂). 301p

Rajesh S., Production of azolla as livestock feed supplement in India. *Pashudhan praharee.* Indian Dairy & Poultry industry. (2020). 43p.

Rasoloarivony R. 2003. Contribution a l'étude de l'influence des conditions climatiques sur la sporulation d' *azolla*, en pépinière, dans la région d'Antananarivo. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat de troisieme cycle option : physiologie végétale. 173p.

Rebache A.,Radaoui N.,Triche F (2022).effet de stress salin sur la culture d'*Azolla pinnata* .Memoir de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de master en science agronomique.

Ruiz G. (2005). Extraction, détermination structurale, et valorisation chimique de phycocolloides d'algues rouges. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences et Techniques, discipline: Chimie appliquée, chimie de substances naturelles. Université de Limoges. France. 258p.

Reynouda P.A., Franche C. 1985. *Azolla Pinnata* Var. *Pinnata*, Dakar: ORSTOM. 15p

Schramm M., Rakotonaivo G. 1987. Contribution à l'étude préliminaire de l'Utilisation de l'*Azolla* comme Engrais Vert en Riziculture Malgache, Antananarivo : Académie Malgache. Colloque international sur l'amélioration de la riziculture par les méthodes biologiques. 9 p.

Sebastian A., Deepa P. and Narasimha Vara P.M. 2021. *Azolla* Farming for Sustainable Environmental Remediation. In: Narasimha Vara Prasad M. Handbook of Assisted and

Amendment-Enhanced Sustainable Remediation Technology. First Edition. ED John Wiley & Sons Ltd. 517-532pp

Shebis Y., Iluz D., Kinel-Tahan Y., Dubinsky Z., Yehoshua Y. (2013). Natural antioxidants: function and sources

Sun B., Ricardo-da-Silva J. M., Spranger I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. Journal of agricultural and food chemistry, 46(10), 4267- 4274.

Tran T.L.N., Miranda A.F., Abeynayake S.W. and Mouradov A. Differential Production of Phenolics, Lipids, Carbohydrates and Proteins in Stressed and Unstressed Aquatic Plants, *Azolla filiculoides* and *Azolla pinnata*. Biology. (2020). 9. 342; doi:10.3390/biology9100342. Oleffe, 52 p.

Van Hove C. *Azolla et ses emplois multiples* (publié à la demande de la FAO) Saint- Etienne, Biologique, E, Oleffe, 1989, 52 p

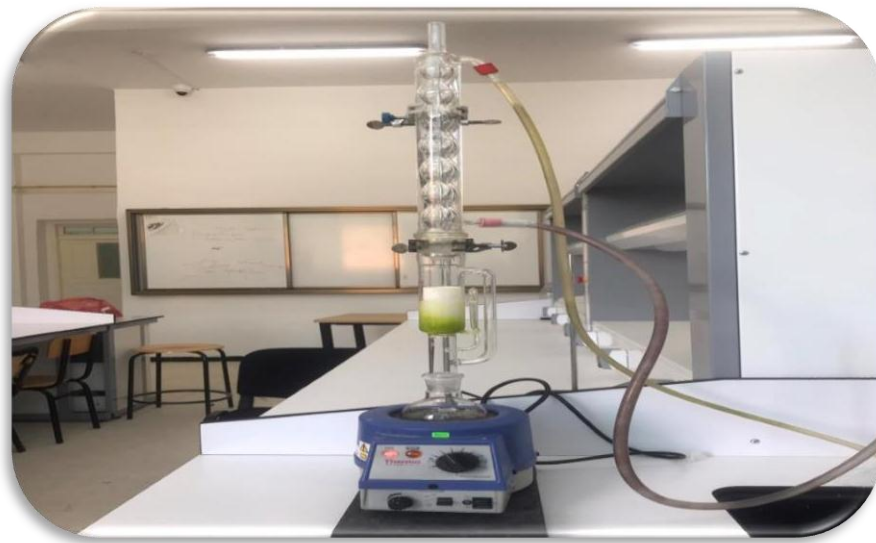
VHOVE, C., (1989). *Azolla et ses emplois multiples* (Publié à la demande de la FAO).

Vara P.M. 2021. *Azolla Farming for Sustainable Environmental Remediation*. In: Narasimha Vara Prasad M. *Handbook of Assisted and Amendment-Enhanced Sustainable Remediation Technology*. First Edition. ED John Wiley & Sons Ltd. 517-532pp. Saint- Etienne Biologique, E.

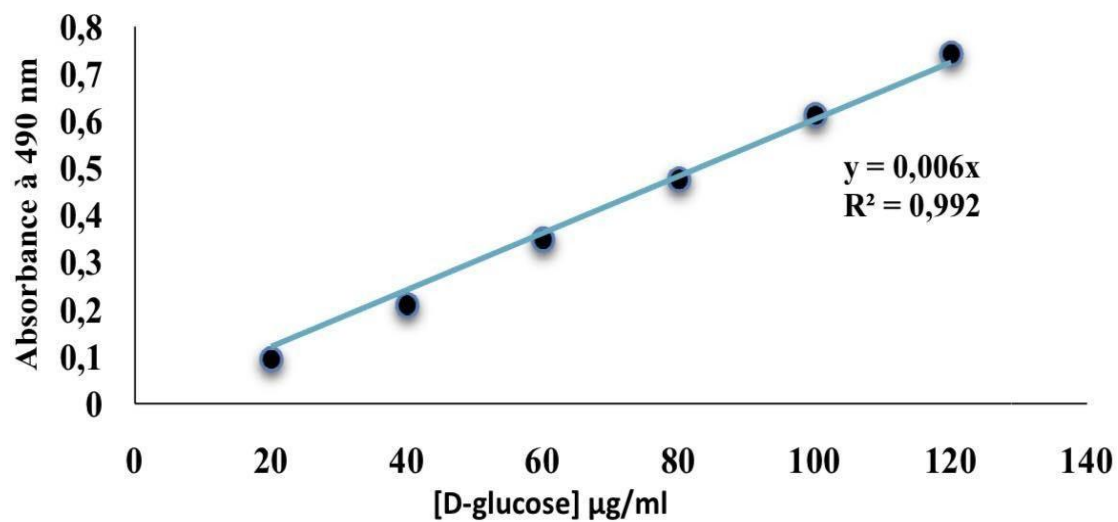
Les annexes



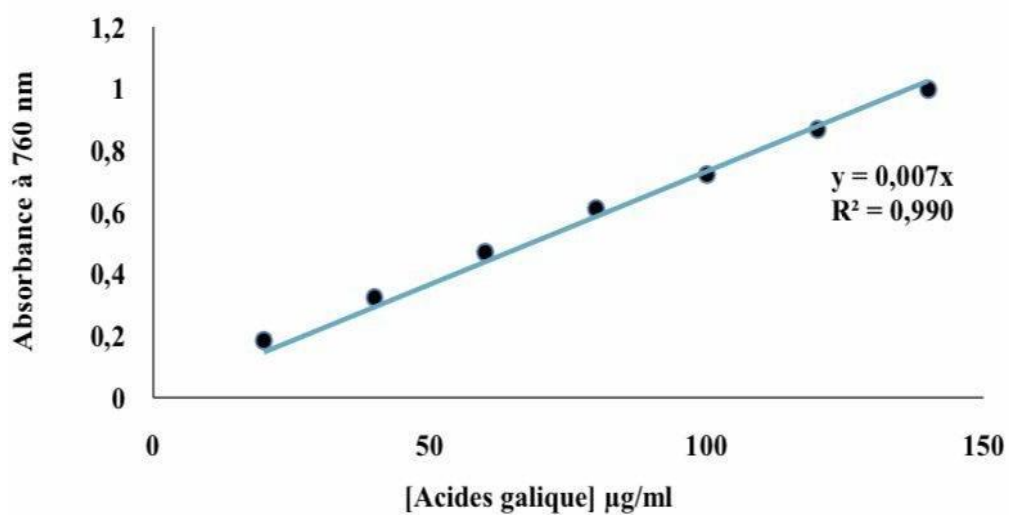
Annexe 1 : Distillateur de kjeldhal



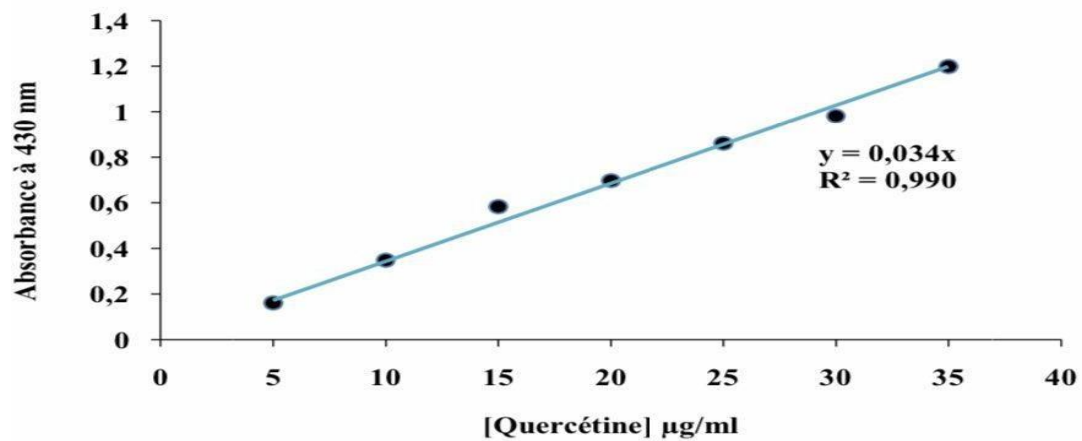
Annexe 2 :Extracteur de soxhlet



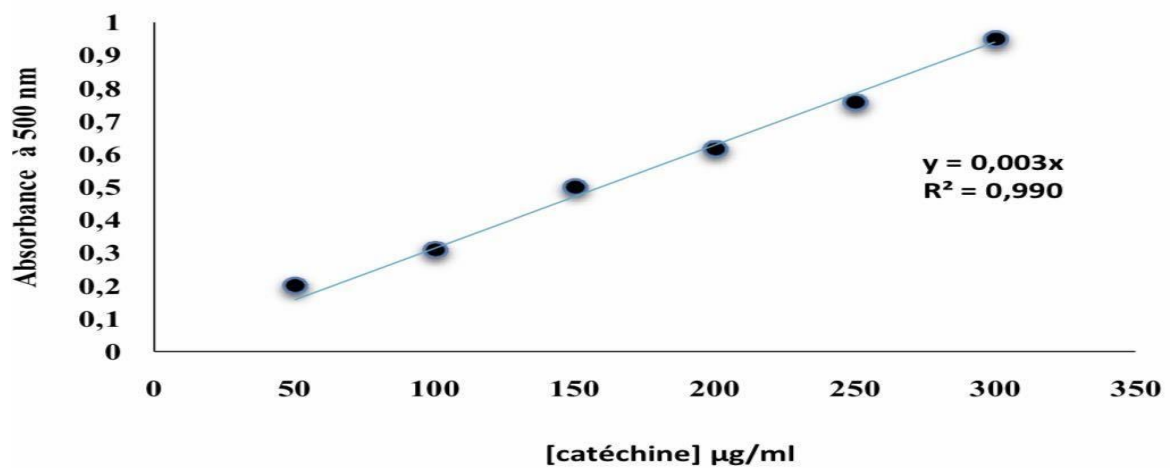
Annexe 4 : Courbe d'étalonnage du D-glucose



Annexe 5 : Courbe d'étalonnage de l'acide galique .



Annexe 5 : Courbe d'étalonnage de la quercitine .



Annexe 6 : Courbe d'étalonnage de la catéchine