

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

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

Université Ibn Khaldoun, Tiaret

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie



Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master académique

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**

Filière : **Biotechnologie**

Spécialité : **Biotechnologie microbienne**

Présenté par :

Madjoudj Fateh Gaia

Thème

**Extraction Des Composés Bioactifs De l'*Azolla pinnata* Et
Evaluation De Leur Activité Antioxydante**

Soutenu le **21/06/2021**, devant le jury composé de :

Président : Pr. Sassi Mohamed Prof Université de Tiaret

Examinatrice : Dr. Mezouer Djamila M.C.B Université de Tiaret

Encadrant : Dr. Ali-Nehari Abdelkader M.C.A Université de Tiaret

Année Universitaire 2020-2021

Dédicaces

*A la mémoire de ma tante Zahia et son mari Rachid et tante Dia et Yaya Thihyat
qui auraient aimé voir ce que je suis devenu.*

*Aucune dédicace très chère maman, ne pourra exprimer la profondeur des
sentiments que j'éprouve pour toi, vos sacrifices innombrables et votre dévouement
firent pour moi un encouragement.*

*Vous avez guetté mes pats, et m'avez couvé de tendresse, tes prière et ta
bénédictioin m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.*

*Vous m'avez aidé et soutenu même quand tous les gens me disait que j'étais
incapable pendant de nombreuses années avec à chaque fois une attention
renouvelée. Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous
procurer une longue vie*

A Mon cher grand père a Ma chère grand-mère

*Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de
formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.*

À mes tantes et oncles maternels et leurs conjoints

À mon père et mes tantes et oncles paternels et leurs conjoints

À mes cousins et cousines

*A mes chères amies qui ont étaiis toujours la dans le meilleur et dans le pris
moments*

À notre Groupe de music Originals

À notre Club C-Arts

Au membre du Groupe de music andalouse el Amel

Aux membres du club sportif des Vikings

Fateh Gaia

Remerciements

Avant tout, Je remercie Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de m'avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de m'avoir permis de Finaliser ce travail.

Je tiens d'abord à remercier très chaleureusement

*Mon encadreur **Mr Ali Nehari Abdelkader** pour tous ses efforts, sa sincérité et constante présence durant la réalisation de cette étude. Un grand homme, un grand chercheur et un grand frère.*

Merci.

*Mes chaleureux remerciements vont aux **Pr. Sassi M.** et*

***Dr. Mezouer** pour l'honneur d'accepter de juger mon travail.*

Mille mercis à tous les professeurs de l'équipe de formation de la spécialité Biotechnologie microbienne.

Je tiens à remercier aussi Mr Kouadria Tahar pour son aide

Ainsi que toutes les personnes qui ont Participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

ملخص

يوفر التركيب الكيميائي النباتي والأنشطة الدوائية للعديد من النباتات إمكانات طبية للبحث العلمي. كما تعتبر الكثير منها كمصادر غنية بمضادات الأكسدة. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم التأثير المضاد للأكسدة لمستخلصات أزولا بيناتا. أولاً ، تم تحليل التركيب الكيميائي الحيوي للمادة الجافة لأزولا. ولغرض زيادة مردود عمية الاستخلاص ؛ تم إجراء المعالجة بالموجات فوق الصوتية للعينات. كما قد تم اختيار طريقتين لاستخراج المركبات النشطة الموجودة في العينات (النقع والتغلي) ، باستخدام خمس مذيبات مختلفة : ماء ، ميثانول ، ماء / ميثانول (20:80) ، ماء / أسيتون (10:90) والكلوروفورم. ومن ثم تقييم قدرة المستخلصات المختلفة كمضادات الأكسدة باستخدام طريقة إرجاع الحديد (FRAP) . أظهرت النتائج أن أعلى مردود كان للمستخلص الميثانولي (26.5٪) ، بينما سجل أقل مردود لمستخلص الكلوروفورم بنسبة 6.2٪. وفقاً للنتائج التي تم العثور عليها ، فإن الزيادة في إرجاع الحديد تناسب طرداً مع التركيزات المستخدمة للمستخلصات المحصل عليها من الطريقتين (النقع والتغلي) بغض النظر عن طبيعة المحلول المستخدم (كلوروفورمي ، ميثانولي ، هيدروأسيتوني ، هيدرو ميثانولي أو مائي) .

كلمات دالة: أزولا بيناتا ؛ المركبات النشطة بيولوجيا ؛ التركيبة الكيميائية الحيوية:

النشاط المضاد للأكسدة: FRAP

RESUME

La composition phytochimique et les activités pharmacologiques de nombreuses plantes offrent un potentiel médicinal pour la recherche scientifique. Nombreuses entre elles, sont considérées comme des sources plus riches en antioxydants. Notre travail a pour objectif d'évaluer l'effet antioxydant des extraits de l'*Azolla pinnata*. D'abord, la composition biochimique de la matière sèche d'*Azolla* a été analysée. Et pour pouvoir augmenter le rendement en extraits ; un prétraitement des échantillons par ultrason a été réalisé. Deux méthodes ont été optées pour extraire les composés actifs présents dans les échantillons (macération et décoction), en utilisant cinq solvants de polarités différentes: eau, méthanol, eau/méthanol (20:80 ; v/v), eau/acétone (10:90 ;v/v) et le chloroforme. La capacité antioxydante des différents extraits a été évaluée en utilisant la méthode de réduction de fer (FRAP). Les résultats ont révélé que le rendement le plus élevé a été noté pour l'extrait méthanolique (26,5 %), cependant, les plus faibles valeurs ont été notées pour l'extrait chloroformique de l'ordre de 6,2 %. Selon les résultats trouvés, l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées de nos extraits des deux méthodes d'extraction utilisées macération et décoction quelque soit l'extrait (Chloroformique, méthanolique, Hydroacétonique, Hydrométhanolique ou aqueux).

Mots clés : *Azolla pinnata* ; composés bioactifs ; composition biochimique ; pouvoir antioxydant ; FRAP

Abstract

The phytochemical composition and pharmacological activities of many plants offer medicinal potential for scientific research. Many of them are considered to be rich sources of antioxidants. Our work aims to assess the antioxidant effect of *Azolla pinnata* extracts. First, the biochemical composition of *Azolla*'s dry matter was analyzed. And to be able to increase the yield of extracts; ultrasonic pretreatment of the samples was carried out. Two methods were chosen to extract the active compounds present in the samples (maceration and decoction), using five solvents of different polarities: water, methanol, water/methanol (20:80; v/v), water/acetone (10:90; v/v) and chloroform. The antioxidant capacity of the different extracts was evaluated using the iron reduction method (FRAP). The results revealed that the highest yield was noted for the methanolic extract (26.5%), however, the lowest values were noted for the chloroform extract of the order of 6.2%. According to the results found, the increase in iron reduction is proportional to the concentrations used of our extracts of the two extraction methods used maceration and decoction whatever the extract (Chloroformic, methanolic, Hydroacetic, Hydromethanolic or aqueous).

Keywords: *Azolla pinnata*; bioactive compounds; biochemical composition; antioxidant power; FRAP

Tables des Matières

Tables des matières.....	ix
Résumés.....	xi
Liste des Tableaux.....	xii
Liste des Figures.....	xii
Liste des Abréviations.....	vi

1^{ère} partie : Introduction Générale

Introduction	1
--------------------	---

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériel & Méthodes

I. Matériel et Méthodes.....	5
I. 1. Matériels et produits	5
I. 2. Matériel végétal	6
I. 3. Préparation des échantillons.....	8
I. 4. Caractérisation biochimique de l' <i>Azolla pinnata</i>	8
I. 4.1. Teneur en cendre	9
I. 4.2. Teneur en matières grasses.....	9
I. 4.3. Teneur en protéines.....	10
I. 4.4. Teneur en glucides.....	10
I. 5. Valorisation des extraits bioactifs de l' <i>Azolla pinnata</i>	11
I. 5. 1. Prétraitement par Ultrason de l' <i>Azolla pinnata</i>	12
I. 5. 2. Extraction des composés bioactifs.....	13
I. 5. 3. Evaluation du pouvoir antioxydant.....	14
I. 5. 3. 1. Pouvoir réducteur du Fer.....	14
I.6. Analyses statistiques.....	16

Chapitre 2 : Résultats et discussions

II. Résultats et Discussions	18
II. 1. Identification de l'espèce d' <i>Azolla</i> récoltée	18
II. 2. Caractérisation biochimique de l' <i>Azolla pinnata</i>	18
II. 2.1. Détermination du taux de l'humidité	19
II. 2.2. Détermination de la teneur en cendre	19
II. 2.3. Détermination de la teneur en matières grasses	19
II. 2.4. Détermination de la teneur en protéines.....	19
II. 2.4. Détermination de la teneur en glucides.....	20
II. 3. Valorisation des extraits l' <i>Azolla pinnata</i>	21
II. 3.1. Extraction des composés bioactifs	21
II. 3.1.1. Rendements des extractions.....	21
II. 3. 2. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits obtenus	22
Conclusion	27
Références bibliographiques	29
Annexes	35

Liste des abréviations

ABTS	: Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethyl benzothiazoline -6- sulfonique
BCB	: Blanchiment du β -carotène
°C	: Degré Celsius
DMSO	: DiMéthyl SulfOxide
DPPH	: 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle
DPPH (%)	: Pourcentage de réduction du DPPH.
FRAP	: Ferric reduction antioxydant power
IC50	: La concentration d'extrait à 50 % d'inhibition
MS	: Matière sèche
MTT	: bromure de 3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium
ORAC	: Oxygen Radical Absorbance Capacity
PBS	: Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate salin)
pH	: Potentiel d'hydrogène
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute medium
T	: Température
TRAP	: Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Matériel et produits utilisés dans les différentes analyses	P.05
Tableau 2 :	Composition biochimique des échantillons analysés d' <i>Azolla pinnata</i>	P.18
Tableau 3 :	Rendement d'extraction par les différents solvants utilisés	P.22

Liste des figures

Figure 1 :	Protocole expérimental	P.06
Figure 2 :	Photographie du site de l'échantillonnage de l' <i>Azolla pinnata</i> dans la région de Honaine, Wilaya de Tlemcen	P.07
Figure 3 :	Echantillonnage de l' <i>Azolla pinnata</i>	P.08
Figure 4 :	Préparation de la matière sèche de l' <i>Azolla pinnata</i>	P.08
Figure 5 :	Traitement par Ultrason	P.12
Figure 6 :	Extraction des composés bioactifs	P.14
Figure 7 :	Evaluation de l'activité antioxydante des différents extraits	P.15
Figure 8 :	Courbe d'étalonnage du glucose utilisée dans le dosage des glucides	P.20
Figure 9 :	Photos des extraits dans les différents solvants	P.22
Figure 10 :	Effet antioxydant des extraits d' <i>A. pinnata</i> issus par macération et de vitamine C par la FRAP	P.24
Figure 11 :	Effet antioxydant des extraits d' <i>A. pinnata</i> issus par décoction et de vitamine C par la FRAP	P.24

Introduction Générale

Introduction générale

Le monde végétal représente une source inépuisable de composés actifs capables de synthétiser par voie métabolique des molécules bioactives afin de faire face aux stress biotiques et abiotiques. Ces molécules grâce à leurs activités biologiques sont une réponse concrète à plusieurs maladies qui touchent l'humanité. Ces maladies mettent en exergue le rôle néfaste des processus oxydatifs de type radicalaire dans la genèse et le suivi d'un nombre de plus en plus croissant de maladies mortelles. Les radicaux libres en général et les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en particulier sont impliqués dans plusieurs pathologies humaines allant au cancer tout en passant par les maladies cardio-vasculaires, l'arthrite rhumatoïde, le diabète (Packer et Weber, 2001).

Le stress oxydant se définit comme un déséquilibre de la balance entre le système de défense des antioxydants et la production des ERO (Power *et al*, 2010). Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense des antioxydants est surmené par l'augmentation des oxydants. Ainsi, ce stress est impliqué dans de très nombreuses pathologies comme facteur déclenchant ou associé à des complications (Favier, 2003). Il peut être associé à l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite, la cataractogénèse, l'hyperoxie, l'hépatite, l'attaque cardiaque, les vasospasmes, les traumatismes, les accidents vasculaires cérébraux, les pigments d'âge, les dermatites, les dommages de la rétine, les parodontites et les cancers (Cohen *et al.*, 2000). Néanmoins, la plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge car le vieillissement diminue les défenses antioxydantes et augmente la production mitochondriale des radicaux (Favier, 2003).

Les antioxydants font aujourd'hui l'objet de nombreuses études afin d'apporter des solutions au stress oxydant, source de ces maladies, et constituent aussi un grand intérêt dans de nombreux domaines cosmétique, agroalimentaire et pharmaceutique. Ils peuvent neutraliser les radicaux libres qui causent un dommage oxydatif au niveau des molécules biologiques de notre organisme plus particulièrement les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

Toutefois, il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre le stress oxydant et les infections bactériennes (Valko, *et al.*, 2006). Il semble donc important de trouver des alternatives à l'utilisation des antioxydants synthétiques et des antibiotiques classiques. Aussi, de nos jours, la sécurité des produits chimiques conservateurs utilisés en industrie alimentaire a été remise en cause. Ainsi, la peroxydation des lipides produite au cours des processus de fabrication et de stockage des aliments, sous l'effet des radicaux libres oxygénés conduit à des modifications de goût, d'odeur et de couleur. D'où la perte de la qualité et de la sécurité des aliments (Sharma, *et al.*, 2012).

Malgré son ancienneté, l'étude de la chimie des plantes a été toujours d'une brûlante actualité. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives. Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans les différentes industries à savoir l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie. Parmi ces composés on peut citer, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les terpènes et les flavonoïdes (Bahorun *et al.*, 1996).

Actuellement, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques, antioxydante demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine traditionnelle. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (Sokmen *et al.*, 2004).

Azolla est une fougère aquatique qui flotte librement à la surface du plan d'eau douces des régions tropicales, subtropicales, tempérées chaudes de l'Afrique, l'Asie et des Amériques (Costa *et al.*, 2009). C'est une ptéridophyte plantae appartenant à la famille des Salviniacées (Wagner, 1997). Il a été traditionnellement utilisé comme engrais vert pour les rizières des zones humides pour la fixation de l'azote atmosphérique (N₂) à l'aide d'une cyanobactérie (Lumpkin et Plucknett, 1980). Ils peuvent accumuler des éléments comme P et K et des minéraux de l'environnement. Elle pousse naturellement dans les milieux lenticules comme les étangs, les marécages, etc. Une plante d'azolla est souvent appelée fronde. Chaque fronde est constituée d'une tige principale dont la longueur maximale excède rarement 3-4 cm, flottant à la surface de

Introduction Générale

l'eau et couverte de petites feuilles alternes étroitement imbriquées et cachant ainsi la tige (Van Hove, 1989). Sa forme est plus ou moins circulaire ou triangulaire selon les espèces. Les espèces de l'*Azolla* sont classées en deux sous-genres: *Euazolla* et *Rhizosperma*. Le sous-genre *Euazolla* a 5 espèces, à savoir; *A. caroliniana* Willd., *A. filiculoides* Lam., *A. mexicana* Presl., *A. microphylla* Kaulf. et *A. rubra* R.Br., tandis que le sous-genre *Rhizosperma* possède deux espèces : *A. nilotica* Decne. et *A. pinnata* R. Br. (Raja *et al.*, 2012).

Azolla pinnata a un appareil végétatif lui permettant de flotter à la surface de l'eau, dans l'atmosphère et dans l'eau via un réseau de racines filiformes. Dans les eaux douces stagnantes et tiédies par le soleil d'été, ces espèces forment des noyaux de populations qui par bourgeonnement s'étendent et croissent jusqu'à recouvrir la totalité d'un plan d'eau. Elles peuvent former un tapis d'un à deux centimètres d'épaisseur ne laissant plus passer la lumière. Elles sont alors une cause d'anoxie, lorsqu'elles meurent toutes ensemble en hiver dans les zones froides (Serag *et al.*, 2000). Selon Alalade *et al.* (2006), la farine de l'*Azolla pinnata* contient 21,4% de protéines brutes, 12,7% de fibres brutes, 2,7% d'extrait à l'éther, 16,2% de cendres et 47 % de glucides. Comme toutes autres plantes aquatiques, la concentration en nutriments et donc la valeur alimentaire de l'*Azolla* dépendrait des conditions de culture (taux de minéraux, température et salinité de l'eau et durée d'ensoleillement), de la densité de la plantation et du stade de récolte (Arora et Singh, 2003).

L'*Azolla* est convenable pour la consommation humaine et pour supplément alimentaire à divers animaux comme ; poisson, canards, bétail, volaille etc. afin de réduire le coût de l'alimentation (Hassan *et al.*, 2009 ; Raja *et al.*, 2012).

La valorisation de molécules obtenues de l'*Azolla* est un potentiel économique important et un outil de l'émergence et du développement du nouveau concept de la chimie verte. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de recherche dont l'objectif est l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de l'*Azolla pinnata* récoltés de la région de Honaine – Wilaya de Tlemcen.

Introduction Générale

Pour pouvoir atteindre cet objectif, notre étude s'articule autour de quatre volets :

1. Récolte de l'*Azolla pinnata* et préparation de la matière sèche ;
 - ▣ Séchage et broyage.
 - ▣ Traitement par Ultrason
2. Caractérisation des échantillons récoltés ;
 - ▣ Connaître leur composition biochimique
3. Extraction des composés bioactifs ;
 - ▣ Macération et Décoction.
 - ▣ Evaluation des rendements
4. Valorisation des extraits bioactifs de l'*Azolla* ;
 - ▣ Evaluation du pouvoir antioxydant.

Partie expérimentale

Chapitre 1

Matériel & Méthodes

I. Matériel et Méthodes :

Notre travail a pour objectif d'évaluer l'effet antioxydant des extraits de l'*Azolla pinnata* récoltés de la région de Honaine – Wilaya de Tlemcen. Pour réaliser cet objectif, notre protocole expérimental s'articule sur quatre volets comme il est représenté dans la figure 1.

Les analyses et testes ont été réalisés au niveau du laboratoire de science alimentaire de la Faculté de science de la nature et de la vie, Université Ibn Khaldoun-Tiaret durant la période entre 12 Avril et 05 Juin 2021.

I. 1. Matériels et produits :

Le matériel utilisé pour réaliser cette étude est composé de verreries, d'équipements et d'appareils. Il comprend aussi un ensemble de réactifs et produits chimiques qui sont représentés dans le tableau 01.

Tableau 01: Matériel et produits utilisés dans les différentes analyses.

Verrières et autres	Appareillage	Réactifs et produits
• Ballon en verre	▣ Agitateur	- Acide sulfurique
• Béchers	▣ Autoclave	- NaOH
• Entonnoirs	▣ Bain Marie Balance	- N-Hexane
• Eprouvettes	analytique (KERN)	- Phénolphtaléine
• Erlenmeyer	▣ Buchi Unit K-355	- phénol
• Etiquettes	▣ Camera	- Solvant terpénique
• Fioles jaugées	▣ Centrifugeuse	
• Micropipettes	▣ Etuve (MEMMERT)	
• Papier aluminium	▣ Evaporateur rotatif	
• Papiers filtre		
• Papier ph	▣ Four à moufle	- Méthanol
• Portoires	▣ Plaques chauffantes	- Chloroforme
• Pots de prélèvement	▣ Réfrigérateur	- acide ascorbique
• Récipients en verre	▣ Spectrophotomètre	- acétone
• Spatules	▣ Soxhlet	- Formol
• Tubes à essai		- Lugol

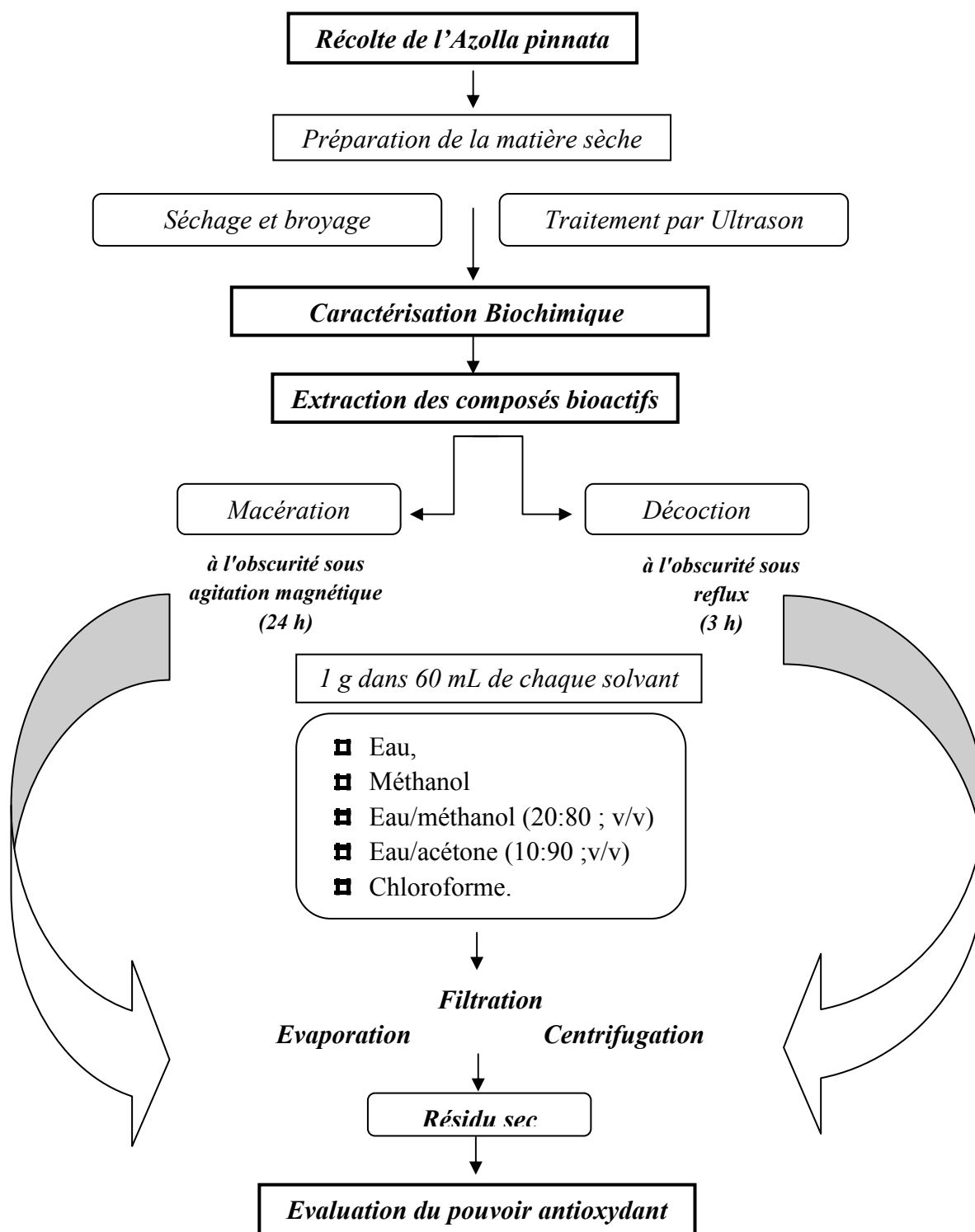


Figure 1: Protocole expérimental

1.2. Matériel végétal :

Le matériel biologique de notre étude est l'*Azolla pinnata* (Figure 2). 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 le 12 Avril 2021 au niveau de la région de Honaine – Wilaya de Tlemcen. Le prélèvement des échantillons se fait manuellement à partir des bassins de culture (Figure 3). Les échantillons doivent être transportés dans une glacière. Leur conservation doit se faire à 4°C et à l'obscurité au laboratoire jusqu'à la préparation pour l'analyse.



Figure 2 : Photographie du site de l'échantillonnage de l'*Azolla pinnata* dans la région de Honaine, Wilaya de Tlemcen (*Photo originale*)



Figure 3 : Echantillonnage de l'*Azolla pinnata* (Photo originale)

I.3 . Préparation des échantillons :

Les échantillons d'*Azolla* ont été soigneusement lavés avec de l'eau du robinet suivie d'un rinçage à l'eau distillée et d'un séchage à l'ombre pendant 7 jours. La poudre fine a été obtenue à partir de la matière séchée en utilisant un broyeur mélangeur de cuisine. La poudre végétale a été stockée sous dessiccateur afin de l'utiliser pour l'obtention des extraits.



Figure 4 : Préparation de la matière sèche de l'*Azolla pinnata* (Photo originale)

I. 4. Caractérisation biochimique de l'*Azolla pinnata*:

L'intérêt des Azollas se manifeste par la diversité de leurs compositions biochimiques. Cette biomasse se différencie principalement des autres végétaux par sa richesse en protéines, polysaccharides, vitamines, pigments et antioxydants (Alalade *et al.*,2006).

Dans notre travail, la caractérisation de quelques paramètres biochimiques de l'*Azolla pinnata* a été réalisée en déterminant la teneur en cendre, en matières grasses, en protéines et en glucides.

I.4.1 Teneur en cendre :

La teneur en matière minérale de la matière sèche préparée est déterminée après calcination selon la méthode standard (AOAC, 1995). Un (1) g d'échantillon sec est placé dans un creuset en porcelaine préalablement pesé. Le creuset est mis dans un four à mufles à 600°C pendant 6 heures. Après refroidissement à température ambiante à l'abri de l'humidité dans un dessiccateur, le creuset est pesé contenant le résidu. Le taux de cendres contenu dans l'échantillon se calcule de la manière suivante :

$$\text{Cendre (\%)} = \frac{m2}{m1} \times 100$$

D'où :

m1 : Masse initiale de l'échantillon.

m2: Masse du résidu après calcination.

La mesure de la différence entre le poids sec initial et le poids sec final permet de déduire la teneur en matière minérale de l'échantillon.

I.4.2 Teneur en matières grasses :

Le principe consiste à effectuer une extraction par un solvant organique à l'aide de dispositif Soxhlet d'une capacité de 250 ml. Trois (3) g d'échantillon sont pesés dans une cartouche en carton poreux, après introduction de 150 ml de n-hexane pur dans le ballon à col rodé, la cartouche est déposée dans l'extracteur et les trois parties de l'appareil sont assemblées. L'hexane est alors porté à ébullition pendant 6 h sur des plaques chauffantes jusqu'à obtention d'un maximum d'hexane dans l'extracteur. La matière grasse extraite est mesurée après élimination du solvant en utilisant un évaporateur rotatif sous vide pour évaporer le n-hexane à 35°C pendant 60 minutes. La teneur en lipides est ainsi déduite (Kherraf, 2018).

Le taux de matière grasse est calculé par la formule suivante :

$$\text{MG (\%)} = \frac{P1 - P2}{ME} \times 100$$

D'où :

- MG% : Taux de la matière grasse.
- P1 : Poids du ballon après évaporation.
- P2 : Poids du ballon vide.
- ME : la masse de la prise d'essai

I.4.3. Teneur en protéines :

La détermination de la teneur en protéines totales a été effectuée par la détermination de l'azote total selon la méthode de Kjeldhal qui est une méthode officielle et standard (AOAC, 1995). Un (1) g de la matière sèche est introduit dans des tubes prévus à cette analyse. Une pastille de minéralisation et 15 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés dans les tubes. Ensuite, les tubes coiffés de leurs capteurs de fumée sont mis à chauffer progressivement jusqu'à 450°C. Après une heure et 30 min et lorsque la solution est devenue de couleur vert pâle, la minéralisation a été arrêtée. Après refroidissement des tubes, les capteurs de fumée sont rincés avec de l'eau distillée récupérée dans les tubes. Le contenu des tubes est installé dans une unité de distillation automatisée (Unité de Distillation et Titration UDK 152).

Le taux de protéines brutes a été déterminé en multipliant la quantité d'azote par le facteur (5,95), qui est un facteur utilisé pour la conversion de l'azote en protéine dans les fougères aquatiques (Lopez et al. 2010).

I.4.4. Teneur en glucide :

Pour la teneur en glucide, on a utilisé la méthode décrite par Albalasmeh et al., (2013) en utilisant le phénol et l'acide sulfurique, pour déterminer la teneur en glucides dans la matière sèche de l'azolla. Elle est considérée comme la méthode colorimétrique la plus utilisée pour la détermination de la teneur en glucides dans des solutions aqueuses. Le principe de base de cette méthode est la production de dérivés de furfural par déshydratation de glucides par réaction avec

de l'acide sulfurique concentré. Une autre réaction entre les dérivés du furfural et le phénol développe une couleur détectable.

L'absorbance de la solution a été mesurée à 490 nm. Le glucose a été utilisé comme solution de référence pour la courbe d'étalonnage dans les mêmes conditions opératoires à des concentrations comprises entre 0 et 0,5 mg/mL.

La concentration des glucides est exprimée en milligramme équivalent de glucose par gramme d'extrait (mg EG/mg ES) et elle est calculée selon l'équation suivante :

$$[\text{Glucides}] = (A \times F) \div C$$

D'où :

A : Concentration des glucides (mg/mL) déterminée à partir de courbe étalonnage ;

C : Concentration de l'extrait ;

F : Facteur de dilution.

I. 5. Valorisation des extraits bioactifs de l'*Azolla pinnata* :

L'*Azolla* est l'une des sources alimentaires qui pourrait constituer un bon ingrédient pour l'alimentation animale. La teneur plus élevée en protéines brutes (plus de 20%) et la présence d'acides aminés essentiels (haute teneur en lysine), de vitamines comme A et B et de minéraux comme le calcium, le phosphore, le potassium et le magnésium ont fait d'*Azolla* un complément alimentaire utile pour le bétail, la volaille, lapin et les poissons (Rajesh, 2020).

Dans cette étude, on a essayé d'étudier la possibilité d'utiliser les extraits bioactifs de la matière sèche de l'*Azolla pinnata* comme des antioxydants. Pour se faire, nous avons procédé d'abord à l'extraction des composés bioactifs en utilisant les solvants organiques et une solution aqueuse. Les composés bioactifs y compris les lipides des plantes sont stockés au sein des cellules qui peuvent être protégées par une épaisse paroi. Ainsi, leur extraction nécessite donc une étape visant à fragiliser les parois cellulaires afin de les rendre accessibles aux solvants. Pour ce faire, plusieurs traitements sont possibles : le broyage, les ultrasons (Kim et al., 2013), les

micro-ondes (Koberg et al., 2011), les chocs osmotiques, la lyse enzymatique, etc (Cho et al., 2013).

Dans notre étude, pour pouvoir augmenter le rendement en extraits ; un prétraitement des échantillons par ultrason a été réalisé.

I. 5.1. Prétraitement par Ultrason de l'*Azolla pinnata* :

Cette partie du travail vise à étudier la possibilité d'améliorer le rendement de l'extraction des composés bioactifs pour une éventuelle production industrielle. Elle consiste à étudier l'impact d'un traitement par ultrason sur l'amélioration du rendement de l'extraction par la comparaison de deux échantillons identiques de la même espèce végétale avec ou sans traitement par ultrason. Les ultrasons sont des ondes mécaniques à une intensité entre 20 et 100 kHz ils sont utilisés pour l'extraction des arômes et bien d'autres molécules des plantes. L'extraction par ultrasons donne des rendements plus élevés, des extraits de haute qualité avec un composé complet.

Après le séchage et le broyage des échantillons de l'*Azolla*, 30 g ont été mis dans des flacons en verre et on les a exposé aux ultrasons pendant 3 à 4 min (Figure 5).



Figure 5 : Traitement par Ultrason (Photo originale)

I. 5.2. Extraction des composés bioactifs :

L'acétone et le méthanol sont les principaux solvants utilisés pour l'extraction des pigments. Le méthanol a quelques avantages pour l'extraction, tels que la volatilité inférieure par rapport à l'acétone, et produit également des pics avec une résolution plus élevée par rapport aux pigments extraits dans l'acétone. Le solvant d'extraction idéal des lipides marins doit non seulement satisfaire les critères mentionnés précédemment mais aussi posséder un point d'ébullition faible afin de faciliter son élimination (Dejoye Tanzi, 2013).

Dans cette étude, deux méthodes ont été optées pour extraire les composés actifs présents dans les échantillons (macération et décoction), en utilisant cinq solvants de polarités différentes: eau, méthanol, eau/méthanol (20:80 ; v/v), eau/acétone (10:90 ;v/v) et le chloroforme (Figure 6).

Pour la macération, un (1) g de la matière sèche a été macéré dans 60 mL de chaque solvant, à l'obscurité et sous agitation magnétique pendant 24h, à la température ambiante (25°C). Ces extractions ont pour but d'essayer de couvrir tout le spectre de polarité des différentes molécules de l'Azolla. Tous les extraits ont été ensuite filtrés en utilisant du papier filtre Whatman (grade 1) et évaporés sous pression réduite dans un évaporateur rotatif afin d'obtenir un résidu sec. Les extraits aqueux ont été centrifugés et le surnageant récupéré a été filtré (Djamai, 2019).

Pour la méthode de décoction, un (1) g de la matière sèche a été mélangé avec 60 mL de chaque solvant, et soumise sous reflux dans l'obscurité pendant 3 heures.

Le rendement d'extraction est calculé à partir de l'équation suivante :

$$R (\%) = \frac{Me}{Mt} \times 100$$

D'où :

Me : Masse d'extraits ;

Mt : Masse totale de la matière sèche ;

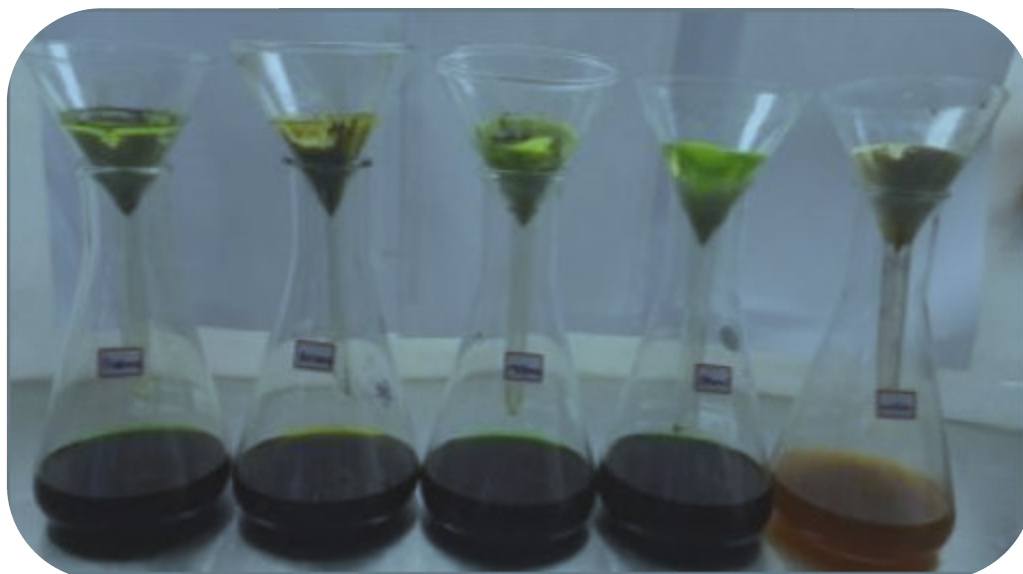


Figure 6: Extraction des composés bioactifs (Photo originale)

I. 5.3. Évaluation du pouvoir antioxydant :

L'évaluation de l'activité antioxydante des différents extraits obtenus à partir de la matière sèche peut se faire par plusieurs méthodes. On cite la méthode par le piégeage du radical libre DPPH, la méthode de blanchiment du β -carotène (BCB), la méthode de réduction de fer (FRAP),...etc.

I. 5.3.1. Pouvoir réducteur du fer :

Dans la présente étude, la capacité antioxydante des différents extraits a été évaluée en utilisant la méthode de réduction de fer (FRAP). Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{2+}) dans les extraits d'*Azolla* est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu *et al.*, (1986).

▣ Principe :

L'évaluation est basée sur la réaction de réduction du (Fe^{+3}) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium en (Fe^{+2}), la réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{+3}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{+2}). Ainsi, l'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotomètre à 700 nm. Le protocole expérimental utilisé est celui de Yildirim *et al.*, 2001.

■ Dosage :

Un ml de chaque extrait à différentes concentrations (de 0,1 à 2,5 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction. Les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote (2,5 ml) de surnageant est combiné avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ (Chlorure ferrique) à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant les extraits par les différents solvants. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Singleton et Rossi., 1965). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.



Figure 7: Evaluation de l'activité antioxydante des différents extraits (Photo originale)

I. 6. Analyses statistiques :

L'analyse statistique est effectuée en utilisant le logiciel statistique informatisé STATISTICA. Tous les analyses et dosages des échantillons ont été réalisés en triplet dans un ordre aléatoire et des moyennes ont été considérées (sous forme de moyenne \pm écart type).

Chapitre 2

Résultats & Discussions

II. Résultats et Discussions :

Dans cette partie, nous allons présenter et interpréter les résultats obtenus des différents dosages et analyses réalisés afin d'évaluer la qualité biochimique de la matière sèche des Azollas récoltés d'une part, et d'évaluer le pouvoir antioxydant de leurs extraits d'autre part.

II.1. Identification de l'espèce d'*Azolla* récoltée:

Il existe au moins huit espèces d'*Azolla* dans le monde; *Azolla caroliniana*, *Azolla circinata*, *Azolla japonica*, *Azolla mexicana*, *Azolla microphylla*, *Azolla nilotica*, *Azolla pinnata* et *Azollarubra* (Malek et al, 2008). L'espèce collectée « *Azolla pinnata* » a été identifiée et authentifiée par Dr. Ali Nehari A., Maître de Conférences en Biotechnologie en basant sur des critères généraux comme la pigmentation et la structure biologique.

II. 2. Caractérisation biochimique de l'*Azolla pinnata*:

La composition biochimique de l'*Azolla pinnata* analysée dans notre étude ainsi que celle trouvée par d'autres études à titre comparatif sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2: Composition biochimique des échantillons analysés d'*Azolla pinnata*.

	Nos résultats	Résultats	
		Van Hove, 1995	Alalade et al. (2006)
Humidité (%)	2,12 ± 0,15	-	-
Cendres (%)	12,33 ± 0,32	10 - 20	16,2%
Lipides (%)	1,85 ± 0,17	3 - 6	2,7
Protéines (%)	32,5 ± 0,13	51 - 58	21,4
Glucides (%)	3,37 ± 0,21	3 - 5	47 %

(Moyenne ± écart-type ; n = 3)

II.2. 1. Détermination du taux de l'humidité :

Le taux d'humidité de la matière sèche a été trouvé au voisinage de $2,12 \pm 0,15$ %. Une valeur nettement supérieure à celle trouvée par Kherraf. (2018) dans la matière sèche lyophilisée. Ce qui explique l'efficacité de la lyophilisation comme méthode de conservation. Il est à signaler que pour la détermination de l'humidité et par conséquent la teneur en matière sèche, 2 g d'échantillon ont été pesés pour déterminer le poids humide, puis placés dans une étuve à une température de 90°C jusqu'à obtention d'une masse sèche constante (AOAC, 1990).

II.2.2. Détermination de la teneur en cendre :

Les analyses effectuées ont révélé que *l'Azolla pinnata* renferme un taux de cendres au voisinage de $12,33 \pm 0,32$. Cette richesse en minéraux change en fonction des paramètres de culture (Camacho Rodríguez *et al.*, 2009).

Une teneur trop élevée en cendres dans les aliments est généralement indésirable; cependant, les cendres peuvent contribuer à satisfaire la dose journalière recommandée de minéraux dans la nutrition humaine (Sánchez-Machado *et al.*, 2004).

II.2.3. Détermination de la teneur en matières grasses :

La teneur en matière grasse dans les fougères aquatiques dépend de l'espèce et est affectée par des conditions de culture telles que les nutriments, la salinité, les périodes d'intensité lumineuse, la température, le pH et même l'association avec d'autres micro-organismes (Li *et al.*, 2007). Dans notre travail, nous avons trouvé un taux de $1,85 \pm 0,17$ g /100g de matière sèche totale. Une valeur inférieure plus ou moins proche à celle trouvée par Alalade *et al.* (2006). Mais elle reste inférieure aux valeurs mentionnées par Van Hove, (1995) entre 3 et 6 % (Tableau 1).

II.2.4. Détermination de la teneur en protéine :

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). Ainsi, les Azollas représentent une source alternative des protéines et de divers acide aminés qui est due à son contenu élevé, plus de 20% de la matière sèche (Alalade *et al.*,

2006). Aussi, la teneur en acides aminés essentiels est de plus ou moins 55% du total (Van Hove, 1995). La teneur en protéines a été calculée par la méthode de Kjeldahl en utilisant le facteur de conversion de l'azote 5,95. La multiplication de la quantité d'azote trouvée par ce facteur, nous a donné une valeur de $32,5 \pm 0,13$ g/100g qui est nettement inférieure à celle rapportée par Van Hove, (1995) (50 – 58%), mais supérieure à celle trouvée par Alalade *et al.*, (2006) (21,4 %).

II.2.5. Détermination de la 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 ($3,37 \pm 0,21$) identique à celui rapporté par Van Hove, (1995). Mais inférieure à la valeur présentée par Alalade *et al.*, (2006). Comme toute la composition biochimique, le taux des glucides peut être affecté par le changement des paramètres de culture (Azote, température, pH, CO₂, ..).

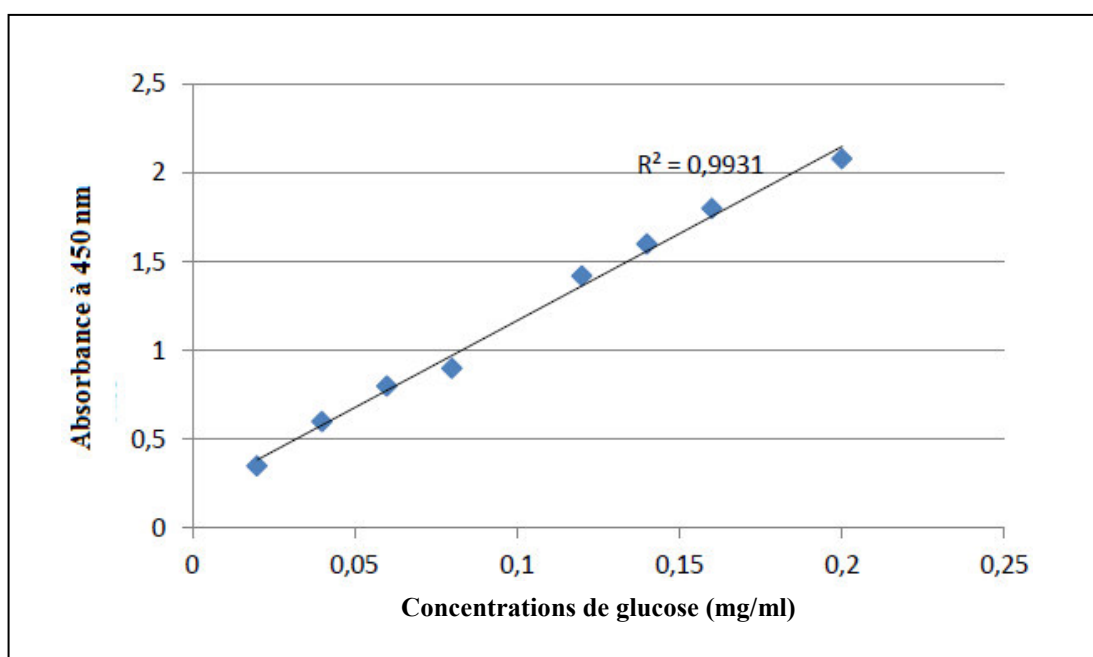


Figure 8 : Courbe d'étalonnage du glucose utilisée dans le dosage des glucides.

II. 3. Valorisation des extraits bioactifs de l'*Azolla pinnata* :

Le deuxième volet de notre étude a été consacré à étudier la possibilité d'utiliser les extraits bioactifs de la matière sèche de l'*azolla* comme des antioxydants.

II. 3.1. Extraction des composés bioactifs :

L'extraction des composés bioactifs est une opération très délicate. D'une part, car elle nécessite une procédure susceptible à décomposer la paroi cellulaire afin d'extraire les composés bioactifs qui sont renfermés dans la cellule et d'autre part, tout en minimisant les risques de les endommager. Pour cela, un traitement avec ultrasons a été réalisé pour faciliter l'opération d'extraction. Aussi, nous avons utilisé des solvants, qui ont la capacité de pénétrer à la paroi cellulaire, avec une polarité correspondante aux molécules cibles.

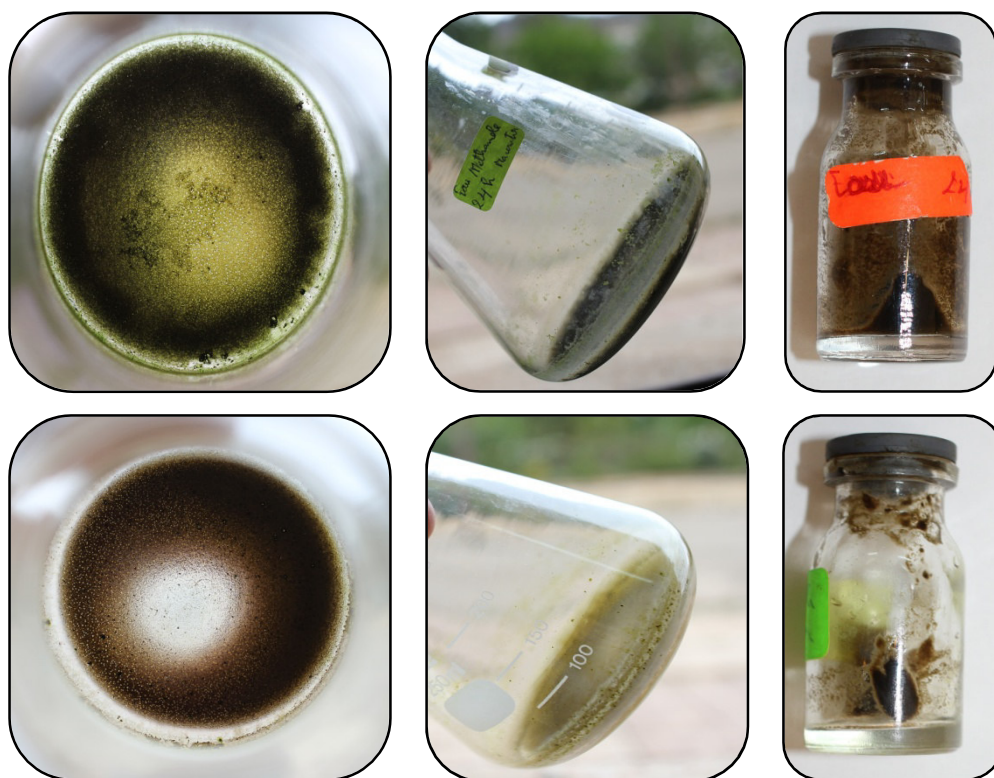
II. 3. 1. 1. Rendements des extractions :

Les résultats de l'extraction par les deux méthodes et dans les différents solvants utilisés (eau, méthanol, eau/méthanol (20:80 ; v/v), eau/acétone (10:90 ;v/v) et le chloroforme) sont présentés dans le tableau 3. A travers ces résultats d'extraction de la matière sèche de l'*Azolla*, on a pu constater que le rendement le plus élevé a été noté pour l'extrait méthanolique (26,5 % (g/g), cependant, les plus faibles valeurs ont été notées pour l'extrait chloroformique de l'ordre de 6,2 % (g/g). Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par Kherraf, (2018) et Djamai, 2019.

Il est à noter que le choix de ces solvants était basé sur les résultats de plusieurs travaux précédents qui ont montré que le rendement d'extraction augmente de manière significative avec l'utilisation d'éthanol aqueux ou du méthanol aqueux par rapport à des extractions aux solvants organiques purs (Kherraf, 2018; Mussatto *et al.*, 2011; Vazquez *et al.*, 2008). Chaouche, (2014), a expliqué ce comportement par le fait que la présence de l'eau déstabilise les parois cellulaires ; ce qui va favoriser la pénétration profonde dans la matrice cellulaire, et par conséquent, le solvant va être en liaison avec une quantité plus grande de soluté, favorisant ainsi un bon rendement d'extraction. Aussi, le rendement d'extraction dépend de la polarité et la nature des solvants utilisés (Franco *et al.*, 2008).

Tableau 3: Rendement d'extraction par les différents solvants utilisés.

Solvant Utilisé	Rendement d'extraction (%)	
	Macération	Décoction
Méthanol	23.8	26.5
Méthanol (80%)	13.07	14.7
Acétone (90%)	9.5	10.6
Chloroforme	6.2	7.4
Eau	14.3	12.5

**Figure 9 :** Photos des extraits dans les différents solvants (*Photos originales*).

II. 3.2. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits obtenus :

Un antioxydant est défini comme une substance qui, ajoutée à faible dose à un produit naturellement oxydable à l'air, est capable de ralentir ou d'inhiber le phénomène d'oxydation. Cette définition peut être élargie et le terme « antioxydant » englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Pokorny *et al.*, 2001).

Dans cette étude, l'évaluation de l'effet antioxydant des différents extraits obtenus de la matière sèche par macération et décoction a été réalisée à travers le test FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et productible. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes dans les extraits organiques et aqueux, afin de tester et de déterminer la concentration d'extrait le plus actif. La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+} /complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm. Par des dilutions en cascade des différents extraits à tester (0,1 à 10mg/ml), ainsi que des substances de référence, l'acide ascorbique. Pour chaque concentration, nous mesurons les densités optiques à 700 nm. Les résultats obtenus ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats, représentés dans les figures 10 et 11, nous ont permis de remarquer que la réduction du fer est proportionnelle avec les concentrations utilisées. Une augmentation de l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Ozturk *et al.*, 2007 ; Su *et al.*, 2008, Liu *et al.*, 2009) . L'absorbance la plus importante indique le pouvoir de réduction le plus grand (Chung *et al.*, 2002).

Dans notre cas, les pouvoirs réducteurs des extraits issus par les deux méthodes et dans les cinq solutions ainsi que l'acide ascorbique déterminés par la méthode FRAP sont exprimés en densité optique selon les différentes concentrations. Selon les résultats trouvés, l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées de nos extraits des deux méthodes d'extraction utilisées macération et décoction quelque soit l'extrait (Chloroformique, méthanolique, Hydroacétonique, Hydrométhanolique ou aqueux). Safafar *et al.*, (2015) a reporté aussi que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées dans l'extrait de la microalgue ; *Nannochloropsis salina*.

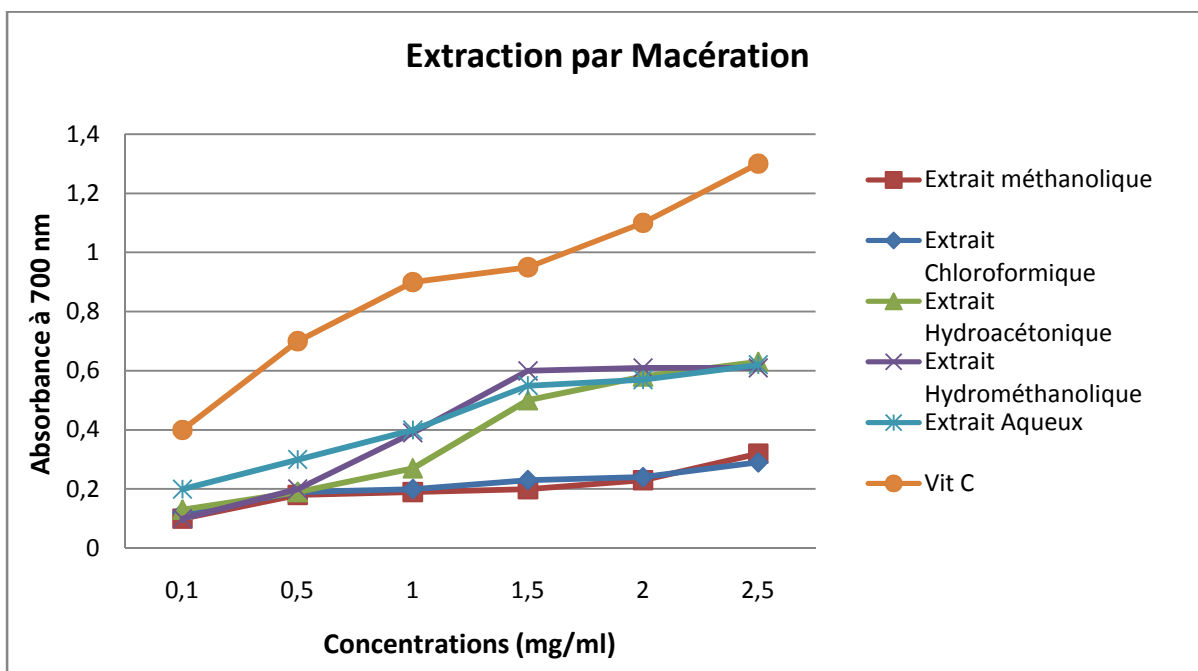


Figure 10 : Effet antioxydant des extraits d'*A. pinnata* issus par macération et de vitamine C par la FRAP (Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type)

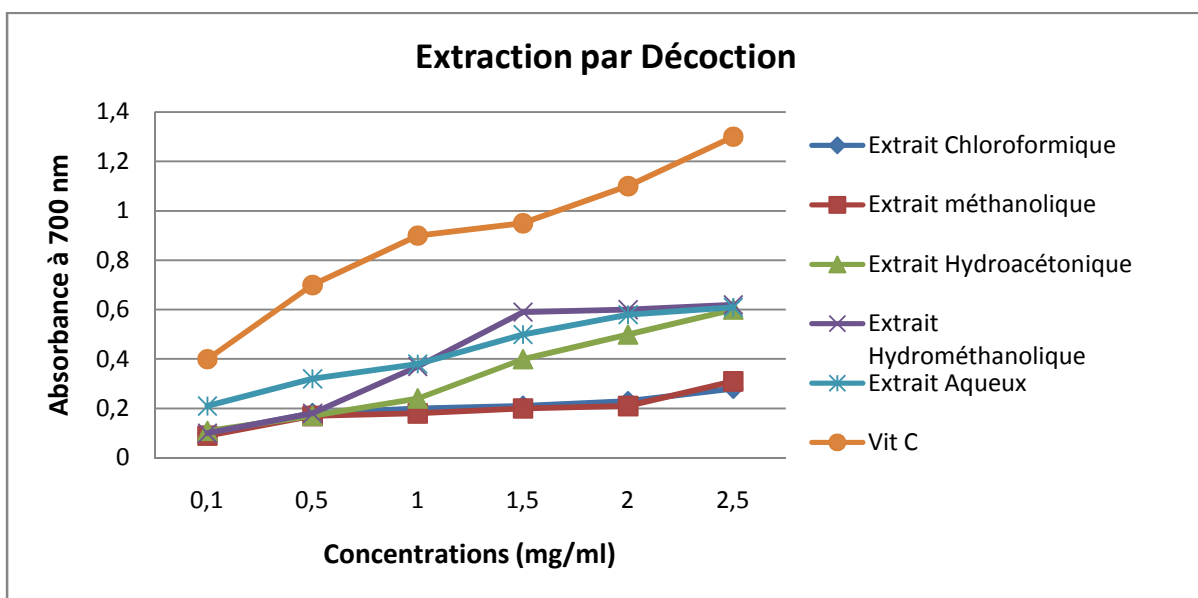


Figure 11 : Effet antioxydant des extraits d'*A. pinnata* issus par décoction et de vitamine C par la FRAP (Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type)

Le pouvoir réducteur des différents extraits peut être dû à leur capacité à donner des électrons. Le pouvoir réducteur peut être attribué principalement aux composés bioactifs associés à l'activité antioxydante tels que les composés phénoliques totaux, les flavonoïdes et autres antioxydants hydrophiles et hydrophobes qui sont de bons donneurs d'électrons et peuvent terminer la chaîne de réaction de radicaux libres et les convertir en produits plus stables (Chung *et al.*, 2002). Ce qui explique le potentiel réducteur des extraits testés.

Conclusion

Conclusion

Dans notre travail, nous avons réalisé une caractérisation biochimique de l'*Azolla pinnata* qui est une fougère aquatique qui flotte librement à la surface du plan d'eaux douces. Ainsi qu'une contribution à la valorisation d'un de leurs différents intérêts potentiels. Après la récolte des Azollas et préparation de la matière sèche, leur caractérisation a été réalisée en déterminant la teneur en cendre, en matières grasses, en protéines et en glucides. Les extraits obtenus par la suite, ont été testés en termes du pouvoir antioxydant.

Les résultats de la composition biochimique des échantillons analysés ont montré un taux d'humidité au voisinage de $2,12 \pm 0,15$ %. Elles renferment un taux de cendres de $12,33 \pm 0,32$; une teneur en matière grasse de $1,85$ g /100g ; une teneur en protéines de $32,5 \pm 0,13$ g/100g et un taux de glucides au voisinage de $3,37 \pm 0,21$. Il a été constaté que la composition biochimique est conditionnée par la qualité de l'eau, et elle peut être affectée par le changement des paramètres de culture (Azote, température, pH, CO₂, ..).

Pour ce qui est des résultats d'extraction de la matière sèche des Azollas, nous avons pu constater que le rendement le plus élevé a été noté pour l'extrait méthanolique ($26,5$ % (g/g), cependant, les plus faibles valeurs ont été notées pour l'extrait chloroformique de l'ordre de $6,2$ % (g/g) dans les deux méthodes d'extraction utilisées.

Quant au volet valorisation, il est bien connu que les différentes espèces d'*Azolla* ont un potentiel important dans une grande variété d'applications puisqu'elles pourraient contenir différents composés bioactifs. La lecture des résultats a clairement montré que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées de nos extraits, qui signifient la contribution des antioxydants donneurs des électrons, présents dans les différents extraits. Ce qui va permettre leurs utilisations dans les domaines de la santé et de l'alimentation.

Les résultats obtenus à l'issue de ce travail confirment l'intérêt d'étudier les différentes possibilités de la valorisation des Azollas pour les utiliser comme sources des produits d'intérêt dans les différents secteurs économiques.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour Isoler les molécules contenues dans les extraits actifs de l'*Azolla pinnata* afin de les tester *in vivo*, sur différents modèles biologiques, dans le but de chercher des applications possibles dans les domaines de la santé et de l'agro-alimentaire.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

1. Alalade OA, Iyayi EE, (2006). Chemical composition and the feeding value of Azolla (*Azolla pinnata*) Meal for egg-type chicks. *International Journal of Poultry Science*, vol. 5, no. 2. pp.137-141.
2. Albalasmeh, A. a, Berhe, A. A., & Ghezzehei, T. a. (2013). A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydr Polym*, 97(2), 253–261.
3. AOAC (1990) . Official methods of analysis. Washington, DC, USA: Association of official analytical chemists.
4. AOAC (1995) . Official methods of analysis. Washington, DC, USA: Association of official analytical chemists.
5. Arora et Singh, (2003). Comparison of biomass productivity and nitrogen fixing potential of *Azolla* Spp. *Biomass and Bioenergy* 24 175- 178
6. Bahorun T. (1997). Substances Naturelles actives. La flore Mauricienne .une source d’approvisionnement potentielle Food and Agricultural Research council Mauritiias, 83-94.
7. Camacho Rodríguez J., Cerón-García M.C., Fernández-Sevilla J.M, González López C.V,&Molina-Grima E.(2009). Effective and low-cost culture media for *Nannocloropsis gaditana* & *Isochrysis galbana* biomass optimized for aquaculture. Chemical Engineering Department, University of Almería, Almería, Spain.
8. Chaouche,T (2014). Contribution à l’étude des activités anti oxydantes et antimicrobiennes des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat. Université Abou-Bakr-Belkaid, Tlemecen, Algérie.
9. Cho, H.-S., Oh, Y.-K., Park, S.-C., Lee, J.-W., Park, J.-Y., (2013). Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy* 54, 156–160.
10. Chung Y.C., Chang C.T., Chao W.W., Lin C.F., et Chou S.T., (2002) Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (50): 2454–2458p
11. Cohen J H, Kristal A R and Stanford J L (2000). Fruit and vegetable intakesand

Références Bibliographiques

- prostate cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 61-68.
12. Costa ML, Santos MCR, Carrapico, F, Pereirac, AL, 2009. Azolla-Anabaena's behaviour in urban wastewater and artificial media-Influence of combined nitrogen. *Water Resource*. 43, 3743-3750.
 13. Dejoye Tanzi, C. (2013). Eco-Extraction et Analyse de lipides de micro-algues pour la production d'algo-carburant. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. France
 14. Djamai, W. (2019). Valorisation des microalgues par extraction et séparation des molécules bioactifs. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen. Faculté des sciences, Algérie.
 15. Favier, A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*, p108-115.
 16. Franco, D.; Sineiro, J.; Rubilar, M.; Sánchez, M.; Jerez, M.; Pinelo, M.; Costoya, N.; Núñez, M.J. (2008). Polyphenols from plant materials: Extraction and antioxidant power. *Electron J. Environ. Agric. Food Chem*. 7, 3210–3216.
 17. Hasan MR, Chakrabarti R, (2009). Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small-scale aquaculture: A review. *FAO Fisheries and Aquaculture technical paper*, 531. FAO, Rome, Italy
 18. Kherraf A. (2018). Caractérisation physicochimique et évaluation du potentiel antioxydant, antimicrobien et antiinflammatoire de la microalgue *Nannochloropsis gaditana*. These de doctorat. Université Djillali Liabes faculté des sciences de la nature et de la vie Sidi bel Abbes, 74.
 19. Kim, Y.-H., Park, S., Kim, M.H., Choi, Y.-K., Yang, Y.-H., Kim, H.J., Kim, H., Kim, H.-S., Song, K.-G., Lee, S.H., (2013). Ultrasound-assisted extraction of lipids from *Chlorella vulgaris* using [Bmim][MeSO₄]. *Biomass and Bioenergy* 56, 99–103.
 20. Koberg, M., Cohen, M., Ben-Amotz, A., Gedanken, A., (2011). Biodiesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology* 102, 4265–4269.
 21. Li, H.-B., Cheng, K.-W., Wong, C.-C., Fan, K.-W., Chen, F., & Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of

Références Bibliographiques

- selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771–776.
22. Liu L., Sun Y., Laura T., Liang X., Ye H. et Zeng X. (2009). Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from *Ilex Kudingcha*. C.J. Tseng, *food chemistry*, 112 : 35-40.
 23. López CV, García Mdel C, Fernández FG, Bustos CS, Chisti Y, Sevilla JM. (2010). Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresour Technol.*101(19):7587-91.
 24. Malek M.A, Khan M.J, Islam K.M.S (2008). Amélioration nutritionnelle de la paille de riz ensilée grâce à la supplémentation en urée, mélasse, farine de graines de soja et plantes aquatiques. *Indian J. Anim. Sei.*, Vol : 78 (12), P 1404-1407.
 25. Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA, (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, 83(15): 173-179.
 26. Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44(6), 307–315.
 27. Ozturk M., Aydogmus-Ozturk F., Duru M.E. et Topçu G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extract of rhubarb (*Rheumribes*): an edible medicinal plant. *Food chemistry*, 103: 623-630.
 28. Packer L and Weber S U (2001). The role of vitamin E in the emerging field of Nutraceuticals. In: Kramer K, Hoppe P and Packer L. *Nutraceuticals in health and disease prevention*. New York (Marcel Dekker), p: 27-43.
 29. Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M (2001). *Antioxidants in food, Practical applications*. Woodhead Publishing Limited.
 30. Power SK, Smuder AJ, Kavazisan, H. (2010). Experimental guides lines for studies designed to investigate the impact of antioxidant supplementation on exercise performance *international journal of sport nutrition and exercise metabolism* 20:2-14
 31. Raja W, Rathaur P, John SA, Ramteke PW, (2012). *Azolla-Anabaena Association and Its Significance In Supportable Agriculture*. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, 40 (1), 1–6
 32. Rajesh S. (2020). Production of azolla as livestock feed supplement in India. *Pashudhanpraharee. Indian Dairy & Poultry industry*.43 P.

Références Bibliographiques

33. Safafar, H., van Wagenen, J., Møller, P., Jacobsen, C. (2015). Carotenoids, Phenolic Compounds and Tocopherols Contribute to the Antioxidative Properties of Some Microalgae Species Grown on Industrial Wastewater. *Marine Drugs*, 13(12), 7339–7356.
34. Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, López-Hernández J, Paseiro-Losada P (2004). Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.* 85: 439–444
35. Serag MS, El-Hakeem A, Badway M, Mousa MA, (2000). On the Ecology of *Azolla filiculoides* Lam. in Damietta District, Egypt. *Limnologica* 30: 73-81.
36. Sharma, P., A. B. Jha, R. S. Dubey et M. Pessaraki (2012). "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions." *Journal of Botany* 2012: 1-26
37. Singleton V. L., Rossi Joseph A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic.* January 1965 16: 144-158
38. Sokmen A., Gulluce M., Askin Akpulat H., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M. and Sahin F,(2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*; 15: 627-634.
39. Su M.S., Shyu Y.T. et Chein P.J. (2008). Antioxidant activities of citrus herbal product extracts, *food chemistry*, 11: 892-896. 42.
40. Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic et M. Mazur (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chemico-Biological Interactions* 160(1): 1-40.
41. Van Hove C. (1995). L'intégration de l'Azolla dans le système agropiscicole à Madagascar. *Proceeding du séminaire l'Aménagement des écosystèmes agropiscicoles d'eau douce en milieu tropical, Belgique : Académie royale des sciences d'outre-mer*, pp 403-411
42. Van, H. C. (1989). *Azolla and its multiple use with emphasis on Africa*. Food and Agriculture Organization, Rome., 21:112-116.
43. Vazquez G, Fontenla E, Santos J, Freire MS, Gonzalez-Alvarez J, Antorrena G, (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell

Références Bibliographiques

- and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial crops and products*, 28(3): 279-285.
44. Wagner, G.M. (1997). *Azolla: a review of its biology and utilization*. *The Botanical review...*, 63: 1-26.
45. Lumpkin, T.A., Plucknett, D.L. (1980). *Azolla: botany, physiology and use as green manure*. *Economic Botany...*, 34: 111–53.
46. Yildirim A, Mavi A et Kara A, (2001). *Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Pp411- 420.

Annexes

Annexe 1

Fiche technique de l'Azolla

Azolla, espèces / variétés

Azolla caroliniana



- Nom commun : Mousse des fées, fougère aquatique de Caroline
- Végétation : Les frondes vertes mesurent de 5 à 10 mm de long.
- Qualités : Formant un épais tapis jusque 4 cm d'épaisseur, la mousse des fées est facilement récoltée.

Azolla filiculoides



Jardin Botanique National, Ville de May
Daly/CC BY NC 2.0/Photo

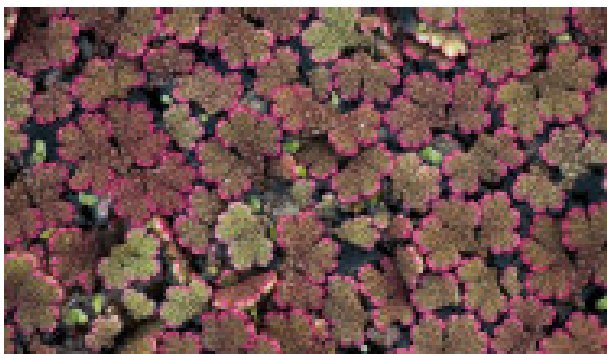
- Nom commun : Fausse fougère
- Végétation : Les frondes mesurent de 10 à 20 mm.
- Qualités : Excellente fixatrice d'azote de l'air avec une activité intense de la cyanobactérie symbiotique.

Azolla pinnata



- Nom commun : Fougère flottante
- Végétation : Les frondes, jusque 25 mm de long, brunissent ou rougissent avec une forte lumière.
- Qualités : Système racinaire très fourni. Ramifications plus abondantes.

Plantation de l'Azolla



Laurent Follonier/CC BY NC SA 3.0/Photo

Une eau acide et douce est appréciée, mais l'Azolla tolère aussi d'autres conditions de culture. L'ensoleillement peut être très intense mais elle accepte de croître dans l'ombre, en dessous d'un couvert végétal aérien, par exemple.

Quand planter l'Azolla ?

L'Azolla hivernant, l'implantation commence en eau relativement chaude, lorsque la température nocturne de l'eau ne descend plus en dessous de 12-15 °C, mais mieux vaut viser 15 à 18 °C de température minimale. Cette fougère est un végétal tropical qui apprécie la chaleur.

Où la planter ?

La fougère aquatique flottante demande quelques dizaines de centimètres d'eau douce chaude : un bassin de jardin assez chaud ou un aquarium tropical conviennent bien.

Comment la planter ?

Déposer librement quelques fougères à la surface d'un plan d'eau douce chaude, cela suffit.

Attention : les eaux avec du courant ou des vagues rapides brisent la plante !

Culture et entretien de l'*Azolla*



Centre National de Recherche, Ville de May (Chang) CC BY-NC-SA 4.0/PLN

Un plan d'eau peut être intégralement revêtu d'une couche dense d'*Azolla*, laquelle forme un tapis de « velours » qui évince les autres plantes.

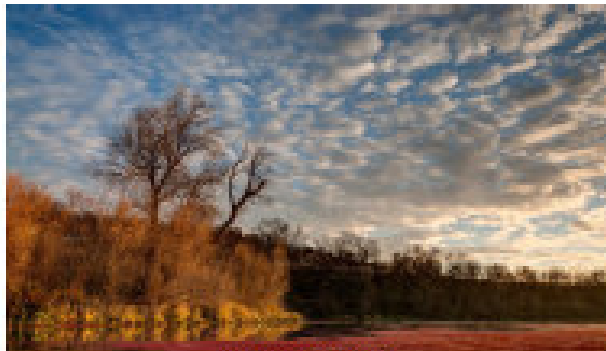
La mousse des fées peut survivre à des températures d'eau de 3 °C l'hiver, avec une croissance d'été optimale entre 25-30 °C. Toutefois, il s'agit d'une plante gélive à considérer comme une annuelle sous nos latitudes. Il est également possible de la conserver en intérieur dans un simple bac d'eau douce pour la réimplanter au printemps suivant.

Taille de l'*Azolla*

Il n'y a pas de taille à proprement parler à faire avec l'*Azolla*. Sa multiplication pouvant la conduire à devenir

envahissante, au point de totalement recouvrir le plan d'eau, il faut ôter quelques sujets afin d'éclaircir.

Maladies, nuisibles et parasites



En: Wiki/CC BY-NC-SA 3.0/PLN

La fougère aquatique ne craint pas grand-chose des autres végétaux, surtout avec la cyanobactérie symbiotique

soignée, mais le charançon *Stanopalmus rufinosus* est utilisé comme agent de lutte biologique pour gérer *Azolla filiculoides* ; il attaque également *A. pinnata*.

Récolte

Quand et comment récolter ?

L'*Azolla* est parfois considérée comme une peste des cours d'eau parce que ses tapis denses réduisent l'oxygène dans l'eau.

L'espèce *Azolla caroliniana* forme des tapis denses (3 à 4 cm de frondes superposées) très faciles à récolter, en particulier en Asie où la fougère est utilisée tant comme engrais que comme nourriture pour la volaille.

Récoltez-la de mai à octobre.

Multiplication de l'*Azolla*

La plante se reproduit par voie végétative quand les « branches » se détachent de l'axe principal, ou sexuellement quand les sporocarpes disposés sur les

feuilles libèrent des spores. Il n'y a donc rien à faire pour observer l'*Azolla* se multiplier.

Conseils écologiques

Comme toute plante flottante, l'*Azolla* est une merveilleuse plante pour les alevins car elle sert d'incubateur à infusoires, souvent la première nourriture vivante de nombreux poissons. Outre ce support alimentaire, elle sert aussi d'abri à de nombreux petits poissons, les cachant des prédateurs.

En Asie, les riziculteurs conservent parfois cette plante dans leurs rizières, car elle génère l'azote précieux par sa cyanobactérie symbiotique. La plante peut être cultivée

dans un sol humide, puis labourée et enfouie, afin de générer une bonne quantité d'engrais riche en azote.

La plante a la capacité d'absorber une certaine quantité de pollution par les métaux lourds, tels que le plomb, et divers autres contaminants de l'eau.

Bon à savoir : l'*Azolla* contient environ 25 à 30 % de protéines et peut être ajoutée à l'alimentation des poulets.

Un peu d'histoire...

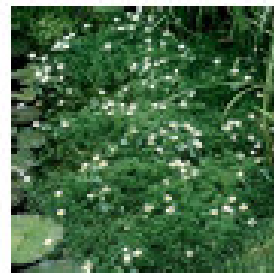
Les *Azolla*, ou mousses des fées, sont exploitées en Asie depuis des centaines d'années dans les rizières pour leur capacité à dégager de l'azote une fois mélangées à la terre, mais aussi pour leur capacité d'épuration de divers polluants (incluant certains métaux lourds) de l'eau.

On a découvert des enregistrements fossiles de mousses des fées datant des dernières périodes interglaciaires en plusieurs lieux d'Europe.

Plantes du même type



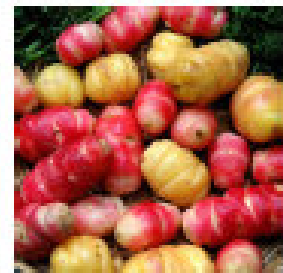
Glyceria maxima



Hottonia palustris



Verveine
citronnelle



Oca du Pérou

1. Pensée : Feuille composée de deux rangs de folioles disposés le long de la nervure centrale.