

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 :

Aroussi Malika

Benattou Fatima Zohra

Bendjilali Zohra

Thème

**Etude Du Pouvoir Antibactérien Des Composés Bioactifs
Issus De l'Azolla Et Optimisation Des Conditions De Leur
Extraction**

Soutenu le **29/06/2021**, devant le jury composé de :

Président	:	Dr. Bensaid Med Ouassini	M.C.A	Université de Tiaret
Examineur	:	Dr. Rahmoune Bilal	M.C.A	Université de Tiaret
Encadrant	:	Dr. Ali-Nehari Abdelkader	M.C.A	Université de Tiaret
Co-encadrant	:	Mr. Bouattou Khaled	Doctorant	Université de Tiaret

Année Universitaire 2020-2021

Dédicaces

*Tout au début, je tiens à remercier le bon dieu
de m'avoir donné du courage et de la patience
afin de réaliser ce modeste travail que je dédie à :*

*Mes parents **Abed kader** et **kaltoum***

*Mon adorable frère (**Omar**) et sœurs (**Fatima, Yacmin, Chahinaz et
Fayrouz**)*

*Mes oncles (**Tayeb, Larbi**)*

*A toute la famille **Aroussi**.*

*Mes copines : **Masouda et Hanan**.*

*Mes collègues : **Benattou Fatima Zohra, Bendjillali Zohra**.*

A toute la promotion master de biotechnologie microbienne 2020/2021

A tous ceux qui m'ont soutenu et aidé pour la réalisation de ce travail.

Malika

Dédicaces

*A la mémoire de mon père qui aurait aimé voir ce que
je suis devenue.*

*A ma mère pour son sacrifice, ses multiples soutiens,
et pour son affection quotidienne, merci d'être
présente dans toutes circonstances.*

Je pris le tout puissant de vous donné une longue vie

Ma très chère grand-mère (fraiha).

A mes sœurs (Chaima Maroua Ines et la plus belle Achwak)

A l'ensemble de ma respectueuse famille

Mes copines : Salima et Naoul

Mes collègues : Aroussi Malika , Bendjillali zohra et ses familles

A toute la promotion de Biotechnologie microbienne 2020 / 2021

*Quoi que je fasse ou je dise, je ne saurai point vous exprimer mon amour et
mon affection*

Fatima

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A ma famille spécialement aux personnes les plus
chères au monde*

*mon père **abdelkader**, ma mère **Khadija***

*et ma grande mère **seti** qui sont le bonheur de ma vie.*

*Qui m'ont apportés son appui durant tous mes années d'études et qui mon
donner la tendresse, la confiance, le courage et la sécurité.*

*A mes cher frères : **Saad, Mohamed et Abdelhak***

*A ma belle-sœur : **Fatima***

*A mes meilleure amies qui m'ont toujours ouvert les portes de
L'espoir surtout **Meghnia et Fatima***

*A mes collègues : **Aroussi Malika et Benattou Fatima Zohra***

*A mes ami(e)s de la promotion de biotechnologie microbienne **2020/2021***

A mes amies les plus proches sans exception

Zohra

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, le Miséricordieux, de nous Avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de Finaliser ce travail.

*Nous tenons d'abord à remercier très chaleureusement **Mr Ali Nehari Abdelkader** qui nous a fait Confiance et nous a permis de bénéficier de son encadrement, de nous avoir encouragé, orienté, conseillé et aidé, nous le remercions vivement pour sa disponibilité, sa patience et sa grande générosité, tout le long de notre travail,*

*Mes chaleureux remerciements vont aux **Dr. Bensaid M.O.** et **Dr. Rahmoun B.** pour l'honneur d'accepter de juger notre travail.*

*Enfin, nous tenons également à remercier vivement **Mr Boudiaf Ismail** pour sa générosité de nous fournir les échantillons de notre travail.*

ملخص

لطالما كانت دراسة كيمياء النبات من المواضيع اللافتة للانتباه رغم قدمها. ويرجع ذلك أساسًا إلى أن المملكة النباتية تمثل مصدرًا مهمًا لمجموعة كبيرة ومتنوعة من الجزيئات النشطة بيولوجيًا. يهدف هذا العمل إلى تقييم التأثير المضاد للبكتيريا لمستخلصات أزولا ، وهو سرخس مائي عائم سريع النمو. ولغرض زيادة مردود عملية 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. ثم دراسة الفعالية المضادة للبكتيريا للمستخلصات التي تم الحصول عليها من خلال طريقة انتشار الأقراص على وسط أجار صلب على ثلاث سلالات (المكورات العنقودية الذهبية؛ الإشريكية القولونية؛ الزائفة الزنجارية). أظهرت النتائج أن أعلى مردود كان للمستخلص الميثانولي (26.5٪) ، بينما سجل أقل مردود لمستخلص الكلوروفورم بنسبة 6.2٪. وفقًا للنتائج، أظهرت المستخلصات المختلفة نشاطًا مثبطًا على السلالات المختبرة.

كلمات دالة: أزولا ؛ المركبات النشطة بيولوجيا ؛ الموجات فوق الصوتية؛ نشاط مضاد للجراثيم؛ المكورات العنقودية الذهبية؛ الإشريكية القولونية؛ الزائفة الزنجارية

RESUME

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. Notre travail a pour objectif d'évaluer l'effet antibactérien des extraits de l'*Azolla* qui est une fougère aquatique flottante à croissance très rapide. D'abord, et pour pouvoir optimiser 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. L'activité antibactérienne des extraits obtenus a été étudiée par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solides sur trois souches (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). 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 %. Ainsi, les différents extraits ont montré une activité inhibitrice sur les souches testées.

Mots clés : *Azolla* ; Composés bioactifs ; Ultrason ; Activité antibactérienne ; *Staphylococcus aureus* ; *Escherichia coli* ; *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

Despite its age, the study of plant chemistry has always been very relevant. This is mainly because the plant kingdom represents an important source of a huge variety of bioactive molecules. Our work aims to evaluate the antibacterial effect of extracts of *Azolla*, which is a very fast growing floating aquatic fern. First, and to be able to optimize 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 antibacterial activity of the extracts obtained was studied by the method of diffusion of the discs on a solid agar medium on three strains (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). 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 around 6.2%. Thus, the various extracts showed inhibitory activity on the strains tested.

Keywords: *Azolla*; Bioactive compounds; Ultrasound; Antibacterial activity; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*

Tables des Matières

Résumés	vi
Tables des matières	xi
Liste des Abréviations	xii
Liste des Tableaux	xii
Liste des Figures	xiii

1^{ère} partie : Introduction Générale

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

Partie expérimentale

Chapitre 1 : Matériel & Méthodes

I. Matériel et Méthodes	6
I. 1. Objectif du travail.....	6
I. 2. Période et lieu du travail.....	6
I. 3. Matériels et produits	6
I. 3. 1. Matériel végétal	8
I. 3. 2. Matériel biologique.....	9
I. 3. 3. Milieux de culture.....	10
I. 4. Préparation des échantillons.....	10
I. 5. Prétraitement par ultrason.....	10
I. 6. Extraction des composés bioactifs de la matière sèche de l'Azolla	11
I. 6.1. Extraction par macération.....	12
I. 6.2. Extraction par décoction.....	12
I. 6.3. Calcul du rendement.....	13
I. 7. Valorisation des extraits bioactifs obtenus.....	15
I. 7. 1. Ré-identification des souches bactériennes et vérification de leur pureté	15
I.7. 2. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	14
I.8. Analyses statistiques.....	16

Chapitre 2 : Résultats et discussions

II. Résultats et Discussions	20
II. 1. Identification de l'espèce d'Azolla récoltée	20
II. 2. Extraction des composés bioactifs	20
II. 2.1. Rendements des extractions	20
II. 3. Résultats de la ré-identification des souches.....	23
II. 3.1. Etude morphologique	23
II. 3.2. Etude biochimique.....	23
II. 4. Valorisation des extraits bioactifs de l'Azolla	25
II. 4. 1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits obtenus	25
II. 4.1.1 Avec le mélange des extraits	25
II. 4.1.2. Avec les différents extraits	28
Conclusion	32
Références bibliographiques	34
Annexes	40

Liste des abréviations

°C	: Degré Celsius
DMSO	: DiMéthyl SulfOxide
GN	: Gélose nutritive
IC50	: La concentration d'extrait à 50 % d'inhibition
MH	: Mueller Hinton
MS	: Matière sèche
MT	: Métronidazole
OX	: Oxacilline
PE	: Pénicilline

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Matériel et produits utilisés dans les différentes analyses	P.06
Tableau 2 :	Classification des différentes souches bactériennes testées	P.09
Tableau 3 :	Rendement d'extraction par les différents solvants utilisés	P.21
Tableau 4 :	Résultats de l'observation microscopique des souches bactériennes	P.24
Tableau 5 :	Diamètre des zones d'inhibition du mélange des extraits obtenus par le mélange des extraits	P.25
Tableau 6 :	Résultats de l'antibiogramme du mélange des extraits	P.27
Tableau 7 :	Diamètre des zones d'inhibition pour chaque extrait des différents solvants	P.28
Tableau 8 :	Résultats de l'antibiogramme des différents extraits	P.29

Liste des figures

Figure 1 :	Protocol expérimental	P.07
Figure 2 :	Site de l'échantillonnage de l' <i>Azolla pinnata</i> dans la région de Honaine, Wilaya de Tlemcen	P.08
Figure 3 :	Echantillonnage de l' <i>Azolla</i>	P.09
Figure 4 :	Préparation de la matière sèche de l' <i>Azolla pinnata</i>	P.10
Figure 5 :	Traitement par Ultrason	P.11
Figure 6 :	Etapas d'extraction des composés bioactifs	P.14
Figure 7 :	Extraits dans les différents solvants	P.22
Figure 8 :	Observation macroscopique des souches cliniques sur des milieux sélectifs	P.23
Figure 9 :	Résultat du test de catalase	P.24
Figure 10 :	Diamètre des zones d'inhibition avec les différentes concentrations du mélange des extraits	P.26
Figure 11 :	Diamètre des zones d'inhibition avec les différentes d'extraits	P.28

Introduction Générale

Introduction générale

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Environ 25-30% de tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) (Djeridane *et al.*, 2010).

Les bactéries sont ubiquitaires dans notre environnement. Leur mode de vie principal est sous forme de bio film. Les bactéries au sein de ces bio films, qu'elles soient pathogènes ou non, sont capables de s'adapter et de résister à de nombreux stress. La présence de ces communautés bactériennes, capables de persister sur les surfaces, représente, un problème préoccupant dans certains domaines, notamment dans les environnements médicaux ou ceux des industries agroalimentaires (Marion, 2017). Elles désignent des organismes cellulaires simples, dépourvus de chlorophylle, et visibles uniquement au microscope. Elles sont des éléments, qui n'appartiennent ni au règne végétal, ni au règne animal et qui d'habitude trouvées en très grand nombre parce qu'ils peuvent se multiplier rapidement (Bruyère, *et al.*, 2008). Ce sont des procaryotes : leur ADN est contenu dans un seul chromosome qui n'est pas contenu dans un noyau. Les trois formes basiques, toutes présentes dans le sol, sont les coques (sphériques ou de forme ovale), les bacilles (en forme de bâtonnet) et les bactéries de forme spiralée. Pour l'essentiel, la bactérie se reproduit par division cellulaire, c'est-à-dire qu'une cellule se sépare en deux et donne deux cellules qui elles-mêmes se diviseront et ainsi de suite. (Jeff et Wayne, 2008). Les bactéries pathogènes spécifiques désignent des germes qui déclenchent une infection caractéristique chez un sujet sain (Bruyère, *et al.*, 2008).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Billing et Sherman, 1998).

En effet, le développement de la résistance des micro-organismes aux divers antibiotiques préoccupent les spécialistes en médecine. Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes de la résistance bactérienne (Boukhatem, 2017).

Au cours de ces dernières années, la recherche de nouveaux procédés basés principalement sur l'utilisation de molécules extraites de façon naturelle a connu un regain d'intérêt dans la plupart des recherches scientifiques. De ce fait, il est intéressant d'étudier des plantes, dont le but est d'exploiter de nouveaux composés comme alternatives aux produits chimiques (Labioud, 2015).

Les molécules bioactives sont des constituants extra nutritionnels participant dans les activités physiologiques ou cellulaires chez les humains et les animaux en fournissant des activités biologiques ; antioxydants, anti-inflammatoires, anti-cancérigènes protègent contre les troubles métabolique (Kris-Etherton *et al*, 2002). Ils représentent une gamme diversifiée de molécules non nécessaires pour la vie des cellules mais jouant un rôle majeur dans l'interaction entre les cellules et l'environnement (Verpoorte et Alfermann, 2013).

Le règne végétal, représentant une source importante d'une grande variété de molécules bioactives qui ont été mises à profit dans l'industrie alimentaire, en cosmétologie et en pharmacie (Bahorun *et al* ., 1996).

L'*Azolla* est l'une des sources alimentaires qui pourrait constituer un bon ingrédient pour l'alimentation animale. *Azolla* est une fougère aquatique flottante à croissance rapide à la surface de l'eau. C'est un bio-engrais courant dans la culture du riz (Chander et Kumar, 2017). 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).

L'*Azolla* comme plante aquatique de très bonne valeur nutritive qui pourrait être une bonne source de protéines et de fibres, sa teneur en protéines est proche de celle du soja (Liu *et*

Introduction Générale

al., 2010). De même, Comparativement aux autres plantes aquatiques (*Ipomea aquatica* et *Lemna minor*), l'Azolla contient approximativement la même quantité de protéines (27,5 % en moyenne), mais elle est plus riche en parois végétales (47,3% en moyenne). En terme d'acide aminé L'Azolla contient en moyenne 5 g lysine/100 g protéines et a un profil relativement bien équilibré (Leterme *et al*, 2009).

L'utilisation d'Azolla en alimentation animale est utilisé 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).

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).

Ainsi, selon Chander *et Kumar*, 2017, l'Azolla produit plus de 4 à 5 fois des protéines d'excellente qualité par rapport à la luzerne. En outre, la production de biomasse est de près de 4 à 10 fois supérieure que la luzerne.

L'Azolla se trouve naturellement dans les étangs, les fossés et les zones humides des régions tempérées et tropicales chaudes du monde entier. Il nécessite de la lumière pour la photosynthèse et pousse bien à l'ombre partielle. Généralement, *Azolla* a besoin de 25 à 50 % de lumière. Elle flotte comme une petite masse verte compacte et plate. Dans des conditions idéales, il croît de manière exponentielle, doublant sa biomasse tous les trois jours (Chander *et Kumar*, 2017).

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 d'évaluation de l'effet antibactérien des extraits des Azollas récoltées de la région de Honaine – Wilaya de Tlemcen. Ainsi que l'optimisation de leur extraction.

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

1. Récolte de l'Azolla et préparation de la matière sèche ;
 - ❑ Séchage et broyage.
 - ❑ Prétraitement par Ultrason
2. Extraction des composés bioactifs et optimisation des conditions d'extraction
 - ❑ Macération et décoction aux différents solvants
 - ❑ Comparaison des rendements d'extraction avec et sans prétraitement.
 - ❑ Comparaison des rendements d'extraction des différents solvants
3. Valorisation des extraits bioactifs des Azollas ;
 - ❑ Evaluation de l'effet antibactérien

Partie expérimentale

Chapitre 1

Matériel & Méthodes

I. Matériel et Méthodes :

I.1. Objectif du travail

L'objectif de notre travail est l'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits de l'Azollas récoltés de la région de Honaine – Wilaya de Tlemcen. Ainsi que l'optimisation des conditions de leur extraction. Le protocole expérimental qui montre les différentes étapes du travail est représenté dans la figure 1.

I.2. Période et lieu de travail

Les analyses et testes ont été réalisés au niveau du laboratoire de science alimentaire et de microbiologie 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.3. 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	- Eau distillée
• Bêchers	☑ Étuve	- Méthanol
• Entonnoirs	☑ Centrifugeuse	- Acétone
• Eprouvettes	☑ Balance électrique	- Chloroforme
• Erlen meyer	☑ Ultrason	- Diméthylsulfoxyde
• Etiquettes	☑ Réfrigérateur	- (DMSO) à 1 %
• Fioles jaugées		- Papier filtre Whatman
• Micropipettes		
• Papier aluminium		
• Papiers filtre		
• Boîtes de pétri		

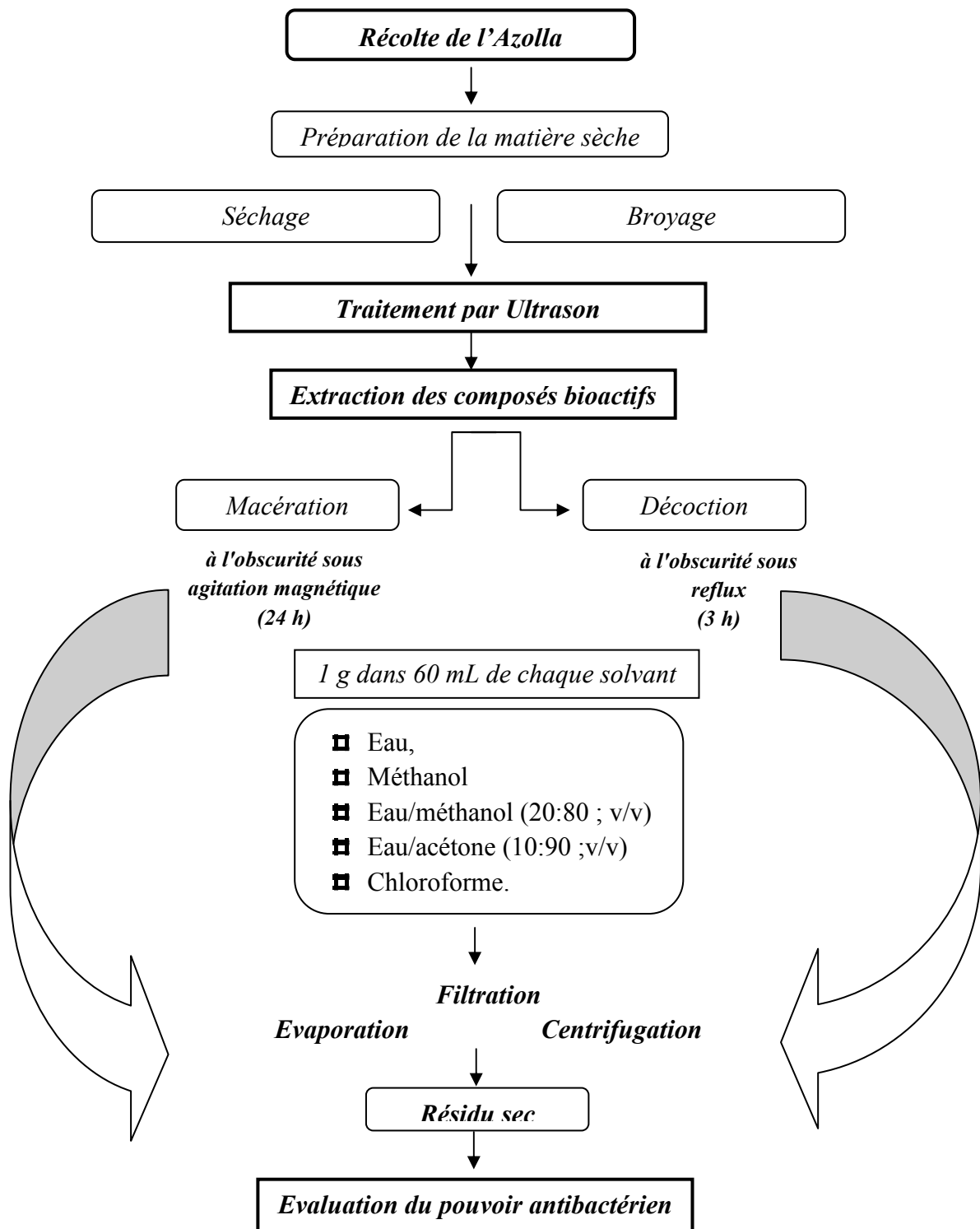


Figure 1: Protocole expérimental

I.3.1. Matériel végétal :

Le matériel biologique de notre étude est l'Azolla (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 : Site de l'échantillonnage de l'Azolla dans la région de Honaine, Wilaya de Tlemcen (*Photo originale*)



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

I.3.2. Matériel biologique :

Afin de tester l'effet antibactérien des extraits obtenus, trois souches bactériennes ont été utilisées (Tableau 2), elles sont des germes :

- Gram négative : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.
- Gram positive : *Staphylococcus aureus*

Tableau 02 : Classification des différentes souches bactériennes testées

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Règne	Bactéria	<i>Pseudomonas</i>	bacteria
Division	<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>firmicutes</i>
Classe	<i>Gamma proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Enterobacteriaceae.</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Escherichi</i>	<i>Pseudomonas migula</i>	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>E. Coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

I.3.3. Milieux de culture :

Les milieux de culture utilisés pour ensemercer les bactéries à tester sont les suivants : *Mueller Hinton* (MH), Chapman, Macconkey, Gélose nutritive (GN).

I.4. 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 (*Photo originale*)

I.5. Prétraitement par ultrasons

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. Le mécanisme le plus probable par lequel les ultrasons opèrent est l'intensification du transfert de masse et la facilitation de l'accès du solvant à l'intérieur des cellules végétales (Assis Jacques, 2007).

Par rapport aux méthodes d'extraction classiques, l'extraction par ultrasons améliore l'efficacité de l'extraction et le rendement, réduit la température d'extraction et augmente les intervalles de sélection de solvants (Romanik *et al.*, 2007).

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. 6. Extraction des composés bioactifs de la matière sèche de l'Azolla :

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 comme des antibactérien. 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.

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 notre 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).

I.6.1. Extraction par macération

Un échantillon de 1g de poudre végétal est soumise à macération dans des différents mélanges de 60 ml de chaque solvants (eau ; méthanol ; eau/méthanol 80/20 : v/v ; eau /acétone 90/10 : v/v ; chloroforme), l'ensemble étant hermétiquement fermé avec une couche du papier aluminium, à l'obscurité sous agitation magnétique (25°C pendant 24 heures).

Les mélanges sont filtrés puis évaporés dans une étuve à 37 °C à l'exception d'eau distillée qui a été centrifugée.

Les extraits obtenus vont être testés comme antibactériens sont considérés comme des éléments bioactifs.

I.6.2. Extraction par décoction

On met 1g de matière sèche de la plante d'Azolla dans 60 ml de chaque solvant (eau ; méthanol ; eau/méthanol 80/20 : v/v ; eau/acétone 90/10 : v/v ; chloroforme) l'ensemble étant hermétiquement fermé avec une couche du papier aluminium, à l'obscurité sous reflux (à 25°C pendant 3h).

Les mélanges sont filtrés, puis évaporés dans l'étuve à 37 °C à l'exception d'eau distillée qui a été centrifugée.

Les extraits sont considérés comme des éléments bioactifs.

I.6.3. Calcul du rendement

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport entre la masse de bioactive obtenue et la masse initiale du matériel végétal à traiter.

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

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

D'où :

Me : Masse d'extraits en g;

Mt : Masse totale de la matière sèche en g.



Figure 6: Etapes d'extraction des composés bioactifs (Photos originales)

I. 7. Valorisation des composés bioactifs obtenus :

I. 7.1. Ré-identification des souches bactériennes et vérification de leur pureté :

Cette étape est très importante, puisqu'elle facilite la caractérisation des souches bactériennes. Pour la purification des souches, il faut qu'après incubation et à partir des colonies isolées sur les différents milieux sélectifs utilisés, on vérifie immédiatement la pureté par l'étude morphologique et biochimique.

a. Étude morphologiques

❖ Examen macroscopique

Cette étude est basée sur l'observation visuelle de la culture des isolats sur milieu sélectif MH ; pour caractériser la taille, la forme et la couleur des colonies.

❖ Examens microscopique

L'examen est effectué par la coloration de Gram.

Principe :

La coloration de Gram est une technique qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne. Elle permet de colorer les bactéries et de distinguer leur aptitude à fixer le violet de gentiane (Gram+) ou la fuchsine (Gram-). Cette opération se déroule en (07) sept étapes :

Mise en œuvre pratique (Cavallo, 2007):

- ✚ Réaliser un frottis sur une lame de microscope a partir d'une suspension bactérienne, agiter la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube.
- ✚ Étaler une goutte de la suspension bactérienne sur une lame propre.
- ✚ Procéder à la fixation du frottis en faisant passer la lame trois fois dans la flamme du bec Bunsen.
- ✚ Plonger la lame pendant une minute dans le violet de gentiane, puis rincer à l'eau Distillée.
- ✚ Étaler le Lugol et laisser agir une minute puis rincer à l'eau distillée. (Cette étape a pour but de stabiliser la coloration violette).

- ✚ Verser goutte à goutte de l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la coloration (15 à 30 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer avec de l'eau distillée.
- ❖ Si l'alcool pénètre dans la bactérie, la coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries donc sont de type Gram-
- ❖ Si l'alcool ne traverse pas la paroi, on est en présence de bactéries Gram+.
- ✚ Réaliser une contre coloration avec de la fuchsine : laisser agir 30 secondes à une minute, laver doucement à l'eau distillée. Puis Sécher la lame entre 2 feuilles de papier buvard. Enfin, observer à l'objectif à l'huile d'immersion ($\times 100$).

Lecture :

Les bactéries Gram+ apparaissent en violet foncé, tandis que les bactéries Gram- sont colorées en rose.

b. Étude biochimique :

L'examen est effectué par le Test catalase.

Principe :

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle intervient dans la dégradation d'eau oxygénée (H_2O_2) produit au cours du métabolisme aérobie en empêchant son accumulation dans la cellule bactérienne.

Mise en œuvre (Freney *et al*, 2007):

- ✚ Déposer sur une lame de verre une ou deux gouttes d'eau oxygénée (10V).
- ✚ Prélever à l'aide de l'effilure de pipette pasteur un fragment de colonies et dissocier la culture dans l'eau oxygénée.

Lecture :

La présence d'une catalase se traduit en quelque seconde par la formation de bulles d'oxygène.

I. 7.2. Évaluation de l'activité antibactérienne :

1. Antibiogramme :

▣ Principe :

C'est une méthode qui reflète l'aspect quantitatif de sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Elle est d'un intérêt capital pour le clinicien qui doit établir ou rectifier une thérapie déjà entreprise.

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également à :

- ▣ La surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne.
- ▣ L'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

La sensibilité aux antibiotiques est étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide par la méthode de disque, selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2012). Cette méthode permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques (François, 2000; Cavallo, 2007).

▣ Protocole :

Dans notre travail on a évalué l'activité antibactérienne avec le mélange des extraits par différents concentrations et aussi pour chaque extrait à part.

2. Repiquage des souches bactériennes :

Les différentes souches bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir une culture jeune et des colonies isolées. Les colonies isolées ont servi à préparer l'inoculum (Moroh et al, 2008).

▣ Préparation de l'inoculum :

A partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures, des colonies isolées sont prélevées puis mises dans 09 ml d'eau physiologique, après homogénéisation de la suspension bactérienne, l'absorbance de la suspension est ajustée à une absorbance de 0,5 à 625nm.

▣ Préparation de différentes concentrations des extraits :

Le mélange des extraits est dissout dans le DMSO, le test antibactérienne a été effectué avec quatre concentrations : 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4mg/ml.

En parallèle chaque extrait à part est mis dans le DMSO.

▣ Ensemencement et dépôt des disques :

Des boites de pétri coulées avec le milieu gélosé *Mueller Hinton* de 4mm d'épaisseur, sont ensemencées, par écouvillons stérile, à partir de suspensions de souches tests de 10^8 UFC/ml, des disques de papier Whatman stériles sont déposés dans des boites de pétri stérile puis imprégnés avec un volume de 20 μ l des différents extraits de plante. D'autres disques, imbibé de DMSO sont utilisés comme témoins négatif. Des antibiotiques sont effectués en parallèle avec les antibiogrammes (témoins positif).

Les boites de Pétri sont mises au réfrigérateur à 4°C pendant trois heures pour un pré diffusion. Des zones d'inhibition autour des disques sont mesurées en millimètres après incubation à 37°C/24 heures pour les souches bactériennes. (Bansemir *et al.*, 2006).

I. 8. 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 le rendement d'extraction des deux méthodes et solvants utilisés pour l'obtention des composés bioactifs des Azollas récoltés d'une part, et d'évaluer leur pouvoir antibactérien 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. 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. 2. 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 (%)	
	<i>Macération</i>	<i>Décoction</i>
<i>Méthanol</i>	23.8	26.5
<i>Méthanol (80%)</i>	13.07	14.7
<i>Acétone (90%)</i>	9.5	10.6
<i>Chloroforme</i>	6.2	7.4
<i>Eau</i>	14.3	12.5

▣ Rendement d'extraction par décoction :

Il ressort à travers l'observation des rendements d'extraction, que le méthanol donne le meilleur rendement d'extraction soit de 26.5 %, alors que le chloroforme donne le plus faible rendement (7.4 %).

Le rendement d'extraction des autres solvants : Eau/méthanol, Eau/acétone, Chloroforme varie entre 10.6 % et 14.7 %

▣ Rendement d'extraction par macération :

Les résultats des rendements obtenus par macération montrent que le méthanol est le meilleur solvant d'extraction (23.8 %) suivi par l'eau (14.3%), puis eau/méthanol (13.7%). Alors que le chloroforme a donné le plus faible rendement (6.2 %).

La différence de rendement observée entre les extraits pourrait s'expliquer par le fait que le méthanol est un solvant organique avec une forte polarité qui fixerait plus de composés par rapport à l'eau et plus efficace dans l'extraction. Cette différence revient de

type de solvant influe sur le rendement des polyphénols totaux, la polarité, la composition chimique du plante et le rapport de solubilité des molécules dans ces solvants (Brama, 2002). Des études antérieures ont montré que le méthanol donne de meilleurs taux d'extraction est aussi hautement sélectif pour les composés phénolique Spigno et *al.*, (2007) . D'après Quan et *al.*, (2013), le rendement d'extraction dépend de plusieurs paramètres tels que: le solvant, le pH, la température, le temps d'extraction et la composition de l'échantillon.

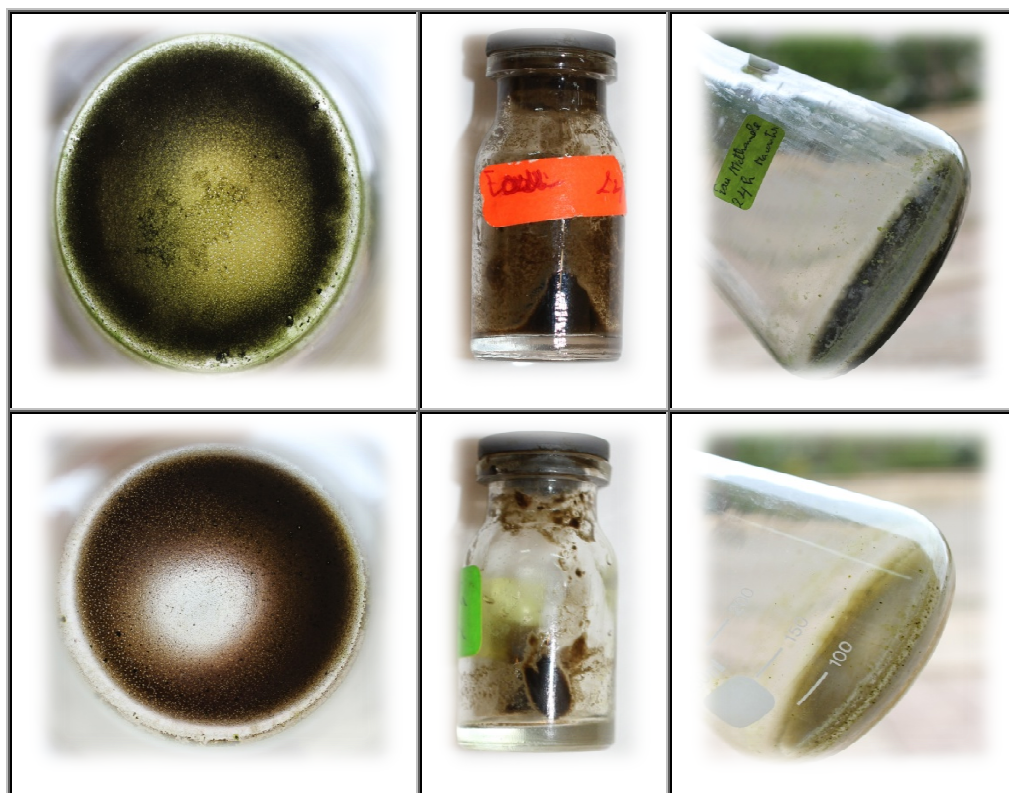


Figure 7 : Extraits dans les différents solvants (*Photos originales*).

II. 3. Résultats de la ré-identification des souches :

II.3.1. Étude morphologique

a. Tests macroscopiques

L'observation macroscopique des souches (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*) nous a permis de décrire les colonies obtenues sur milieu solide (Figure 8).

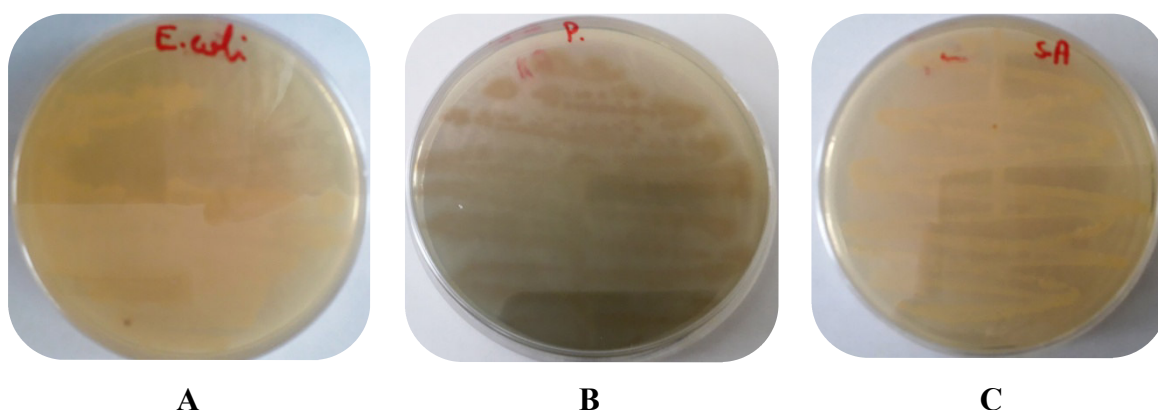


Figure 8: Observation macroscopique des souches cliniques sur des milieux sélectifs.

A : *Escherichia coli*, **B :** *Pseudomonas aeruginosa*, **C :** *Staphylococcus aureus*

b. Tests microscopiques

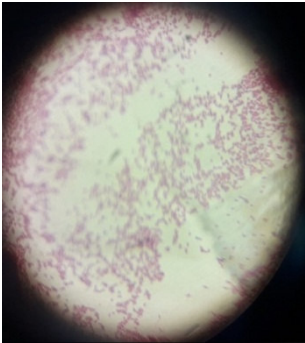
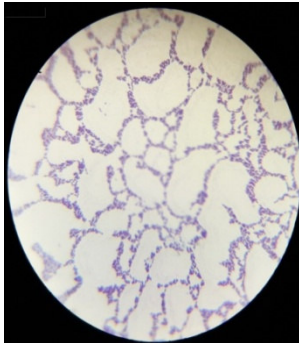
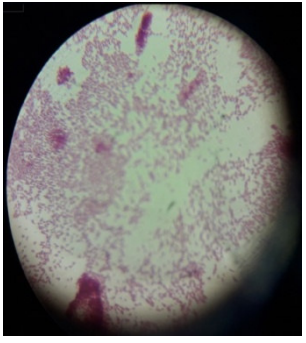
Les résultats de l'observation microscopique des souches bactériennes testées sont représentés dans le Tableau 4. Après la réalisation de coloration de gram pour les germes isolés, on a obtenu des cellules colorées avec le rose ce qui confirme qu'il s'agit de bactéries à Grams négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), et des cellules colorées en violet qui correspond aux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*).

II.3.2. Étude biochimique :

▣ Test de catalase :

D'après les résultats trouvés, nous observons le dégagement des bulles d'air après le dépôt de l'eau oxygénée sur les colonies cible (Figure 9), cela confirme que nos souches ; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont des catalases positif.

Tableau 4 : Résultats de l'observation microscopique des souches bactériennes :

Souches	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Gram et mode de regroupement	Gram négatif, bacilles avec extrémités arrondies (coccobacilles)	Gram positif, cocci arrondies isolées en diplocoques ou en grappe de raisin	Gram négatif, bacilles avec extrémités arrondies
Observation microscopique			

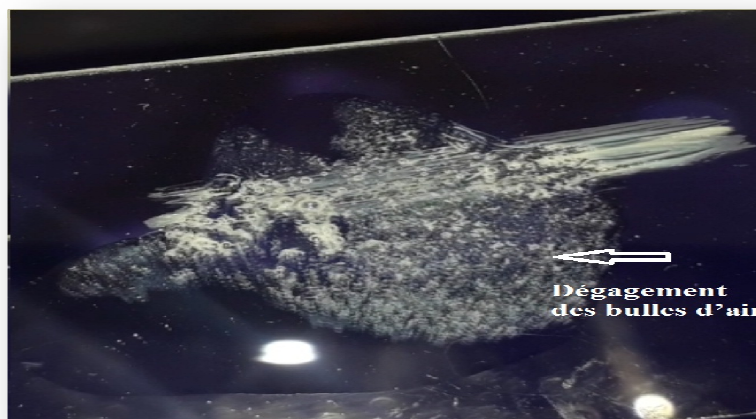


Figure 9 : Résultat du test de catalase

II. 4. Valorisation des extraits bioactifs de l'Azolla :

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 antibactériens.

II. 4.1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits obtenus :

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des extraits préparés de l'*Azolla pinnata* par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solides.

■ Avec le mélange des extraits :

L'activité antibactérienne des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les différentes concentrations de mélanges des extraits obtenus par les différents solvants vis-à-vis les bactéries Gram (+) : *Staphylococcus aureus*, et Gram (-) : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats sont présentés dans le tableau 5 et la Figure 10.

Tableau 5 : Diamètre des zones d'inhibition du mélange des extraits obtenus par les le mélange de extraits

Souches	Concentration (mg/ml)			
	1	2	3	4
<i>E. coli</i>	-	7,5 ± 1,15	6,5 ± 0,57	10 ± 1,15
<i>S. aureus</i>	-	-	9,5 ± 0,6	9,5 ± 0,58
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-

Dans la présente étude, les activités du mélange des extraits composés par les éléments bioactifs de l'*Azolla pinnata* contre les souches bactériennes testées et qui sont qualitativement évalué par la présence ou l'absence d'une zone d'inhibition, sont comparées avec celles des antibiotiques standards cités dans le tableau 6. Selon ces résultats, la croissance de la souche *S. aureus* a été inhibée par les deux concentrations 3 et 4 mg/ml, avec une zone d'inhibition qui égale à 9,5 mm. Une activité élevée a été remarquée pour la souche *E coli* avec une concentration de 2 et 4 mg/ml, égale à 7.5 et 10 mm respectivement. Par contre aucune activité n'a été trouvée pour la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

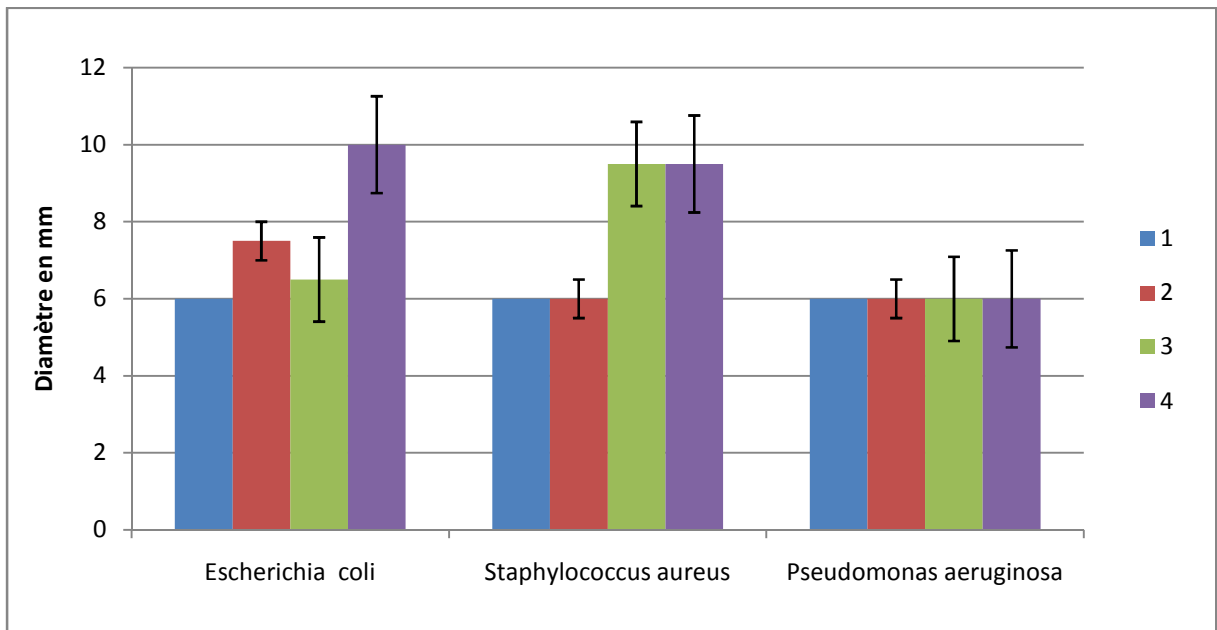
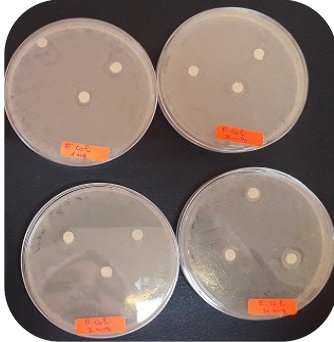

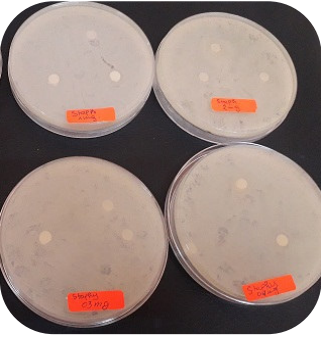
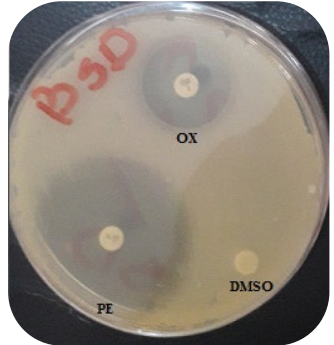
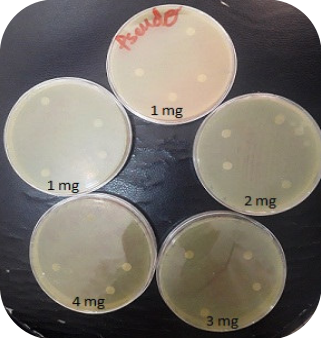
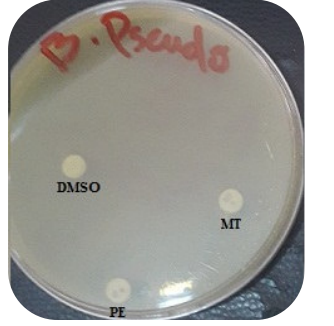


Figure 10 : Diamètre des zones d'inhibition avec les différentes concentrations du mélange des extraits

Tableau 6 : Résultats de l'antibiogramme du mélange des extraits

<i>Souches</i>	<i>Effet de mélange des extraits</i>	<i>Effet de DMSO et d'antibiotique</i>
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

DMSO : Témoin Négatif

MT Métronidazole ; *OX* Oxacilline ; *PE* Pénicilline : Témoin positif

■ Avec les différents extraits :

Les résultats de l'activité antibactérienne pour les extraits obtenus par chaque solvant séparément sont présentés dans le tableau 7 et la figure 11.

Tableau 7 : Diamètre des zones d'inhibition pour chaque extrait des différents solvants

Les différentes fractions d'extrait					
Souches bactérienne	Eau	Méthanol	Eau/méthanol	Eau/ acétone	Chloroforme
<i>E coli</i>	-	-	-	9,5	7
<i>S. aureus</i>	-	10	7	16	8
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-

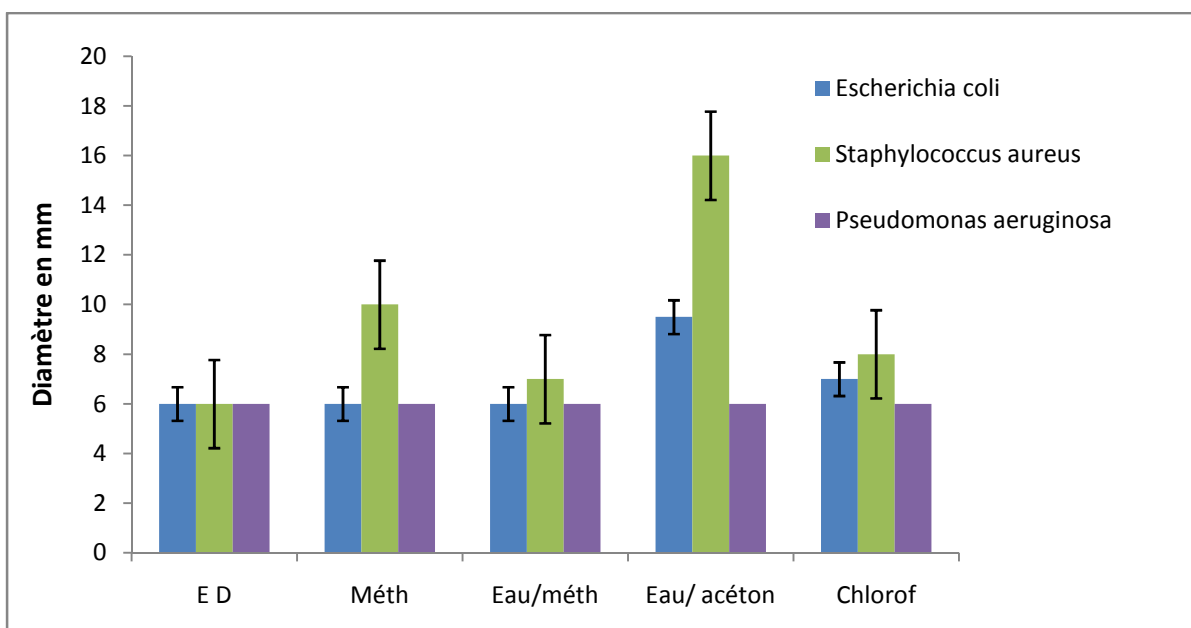
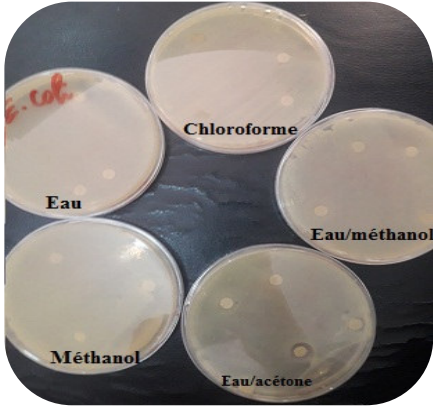
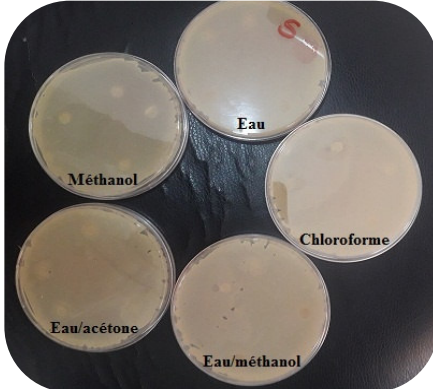
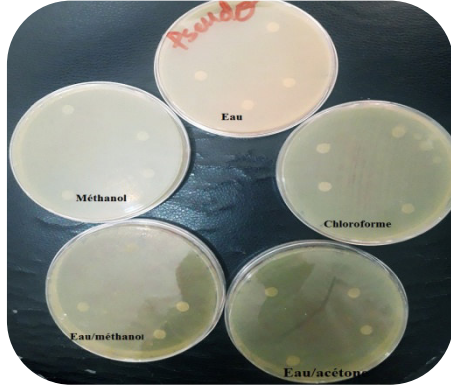


Figure 11 : Diamètre des zones d'inhibition avec les différentes d'extraits

Le tableau 8 indique les résultats de l'antibiogramme de chaque extrait des différents solvants utilisés.

Tableau 8: Résultats de l'antibiogramme des différents extraits

Souches bactériennes	Résultats
<i>Escherichia coli</i>	 <p>The image shows five petri dishes for <i>Escherichia coli</i> with the following labels: Eau (top left), Chloroforme (top right), Eau/méthanol (middle right), Eau/acétone (bottom right), and Méthanol (bottom left). All dishes show visible bacterial growth.</p>
<i>Staphylococcus aureus</i>	 <p>The image shows five petri dishes for <i>Staphylococcus aureus</i> with the following labels: Eau (top right), Méthanol (top left), Eau/acétone (bottom left), Eau/méthanol (bottom right), and Chloroforme (middle right). All dishes show visible bacterial growth.</p>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	 <p>The image shows five petri dishes for <i>Pseudomonas aeruginosa</i> with the following labels: Eau (top center, with 'Pseudo' handwritten in red), Méthanol (middle left), Eau/méthanol (bottom left), Eau/acétone (bottom right), and Chloroforme (middle right). All dishes show visible bacterial growth.</p>

Il a été constaté que :

- ↻ L'extrait d'eau/acétone donne une meilleure activité sur la souche bactérienne *S. aureus* avec un maximum d'inhibition égale à 16 mm. Puis sur *E. coli* avec une moyenne d'inhibition de 9,5 mm.
- ↻ L'extrait du méthanol a donné une zone d'inhibition sur *S.aureus* de 10 mm.
- ↻ L'extrait de chloroforme inhibe la croissance du *S. aureus* et *E. coli* avec un diamètre égal à 08 mm et 07 mm, respectivement.
- ↻ L'extrait d'eau / méthanol a un impact sur *S.aureus* de 07 mm de zone d'inhibition.
- ↻ Aucun effet de l'extrait obtenu par l'eau sur les différentes souches bactériennes.
- ↻ La souche *Pseudomonas earuginosa* a montré une résistance contre les différents extraits.

Il a été démontré que la croissance de plusieurs bactéries, champignons et levures est inhibée par les tanins. Leur structure chimique leur confère une capacité très développée de se fixer sur des molécules telles que les alcaloïdes, la gélatine, les polysaccharides, et essentiellement les protéines (Djemai, 2009). Du fait que la principale cible des composés naturels est la membrane bactérienne, l'activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse de ces membranes. Les huiles essentielles, polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes voire même les tanins pourraient induire une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane et par voie de conséquences des lésions irréversibles au niveau de cette membrane (Djahra, 2014).

De même, les polyphénols sont doués d'activités antimicrobiennes importantes et diverses, probablement du à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leur relative toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité (Cowan, 1999). Il a été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés et plus ils sont inhibiteurs des microorganismes (Scalbert, 1991).

Aussi, Darabpour et al. (2011), ont démontré l'effet inhibiteur de l'extrait alcoolique de *P. harmala* sur les bactéries Gram positif et négatif *Bacillus cereus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*.

Shohaib *et al.*, (2016) ont remarqué que les bactéries Gram positif sont plus sensibles à l'extrait alcoolique de cette plante en comparaison avec les bactéries Gram négatif, ce qui concorde avec nos résultats.

Conclusion

Conclusion

Ce travail porte sur l'étude de l'activité antibactérienne des extraits obtenus de l'*Azolla* qui est une fougère aquatique qui flotte librement à la surface du plan d'eaux douces. Après la récolte des *Azollas* et préparation de la matière sèche, un prétraitement par ultrason a été appliqué sur les échantillons préparé pour l'extraction de leurs composés bioactifs. Les extraits obtenus par la suite, ont été testés en termes du pouvoir antibactérien.

Dans l'objectif d'optimiser les conditions d'extraction, deux méthodes ont été optées et cinq solutions ont été utilisées. Les résultats d'extraction de la matière sèche des *Azollas*, ont montré 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 % dans les deux méthodes d'extraction utilisées.

Pour ce qui est de la 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 les extraits ont donné une activité sur les souches bactériennes testées (*S. aureus* avec un maximum d'inhibition égale à 16 mm). Ce qui va permettre leurs utilisations dans le domaine de la santé.

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

Des études supplémentaires sont nécessaires pour isoler les molécules contenues dans les extraits 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. Assis Jacques R., dos Santos Freitas L., Flores Perez V., Dariva C., de Oliveira A.P., de Oliveira J .V., Bastos Caramao E. (2007). The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves:A comparison with maceration. *Ultrasonics Sonochemistry*, *Volume 14, Issue 1*, pp. 6-12
2. Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Pinkas, M.(1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung*, *Vol : 46(11)* P 1086- 1089.
3. Bansemir , Maja Blume , Susanne Schroder , Ulrike Lindequist . (2006). Scerening of cultivated seaweeds for antibacterial activity against fish pathogenic bacteria , volume 252 , pages 79-84
4. Billing J., Sherman PW.(1998) . Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q. Rev. Biol.* Vol 73: p 3- 49.
5. Boukhatem Fadhila . (2017). Activité antibactérienne de l’huile essentielle de deux épices : *Syzygium Aromaticum* et *Illicium Verum*. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.
6. Brama S. O.2002. Activité antibactérienne d'extraits d'*Euphorbia hirta* (Linn), une plante utilisée traditionnellement dans le traitement des infections urinaires (Doctoral dissertation, UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU).
7. Bruyère F , cariou G, Boiteux J.P, Hoznek A, Mignard J .P, Escaravage L, *et al* . (2008). diagnostic traitement des infections urinaires bactériennes communautaires de l’homme et la femme et de l’appareil génital de l’homme.
8. CASFM : comite de l’antibiogramme de la societe francaise de microbiologie. Recommandations (2012). Consulter le 17/06/2013 sur: <http://www.sfm-microbiologie.org/>
9. Cavallo JD., (2007). Comité de l’antibiogramme de la société française de microbiologie.
10. Chander H et Kumar G. (2017) . A Study on the Potential of *Azolla pinnata* as Livestock Feed Supplement for Climate Change Adaptation and

Références Bibliographiques

- Mitigatio. *Climate resilient agriculture in Himalayas* Characterization and comparisons of five N₂-fixing *Azolla-Anabaena* associations.
11. 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.
 12. 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.
 13. Cowan M M (1999). Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
 14. Darabpour E, Bavi AP, Motamedi H, Seyyed-Nejad SM. (2011). Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala* L. growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. *EXCLI J* 10: 252-263.
 15. 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
 16. Djahra A. (2014). Etude photochimique et activité antimicrobienne, antioxydante, anti hépatotoxique du Marrube blanc ou *Marrubium vulgare* Thèse de doctorat en Biologie. Université Badji Mokhtar –Annaba, Algérie.
 17. Djamai, W. (2019). Valorisation des microalgues par extraction et séparation des molécules bioactifs. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen. Faculté des sciences, Algérie.
 18. Djemai Z.S. (2009). Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L. Mémoire de Magistère. Université El Hadj Lakhder, Batna.
 19. Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM, and Stocker P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, Vol : 48, p 2599–2606.
 20. 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.
 21. François S., (2000). Les antibiotiques : Respecter les bonnes pratiques. *Hygiène en milieu hospitalier*. 30 :8-13.

Références Bibliographiques

22. Freney J., Renaud F., Leclerc R., Riegel P., (2007). Précis de bactériologie clinique. Ed. Alexandre lacassagne et ESKA, 2 ème édition, 795-910, 1037-1093, 1121-1148.
23. Jaff L, Wayne L. (2008). Collaboré avec les bactéries et autre micro-organisme ; ouvrage réalisé par le studio graphique des éditions du rouergue Achévé d'imprimer en mars 2008 sur les presses de Tipostampa. AS 5778, chapitre 3, p 44.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. Kris-Etherton .(2002) . bioactive compounds in food : the role in the prevention cardiovascular disease and cancer the american journal of medicine vol 113, p 71- 88 .
28. LABIOD Ryma . (2015) . Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Université Badji Mokhtar-Annaba .
29. Leterme P, London Am, Munoz JE Suarez J, Bedoya CA, Souffrant WB, Buldgen A. (2009). Nutritional value of aquatic ferns (*Azolla filiculoides* Lam . and *Salvinia molesta* Mitchell) in pigs. *Animal Feed Science and Technology* Vol : 149 P 135-148
30. Liu H. W., Dong X.F., Tong J. M., Zhang Q. (2010). Alfalfa polysaccharides improve the growth performance and antioxidant status of heat-stressed rabbits. *Livestock Science* Vol : 131, P 88-93.
31. Malek M.A, Khan M.J, Islam K.M.S (2008). Amélioration nutritionnelle de la

Références Bibliographiques

- 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.
32. 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.
33. Marion Barthomeuf. (2017). Etude de l'effet antibactérien de surfaces traitées à l'aide de composés du titane et de leur applicabilité dans les industries agroalimentaires .
34. Moroh J, Bahi C, Dje K, Loukou Y, Gued-Guina F, (2008). Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétique de morinda morindoides sur la croissance in vitro des souches d'*Escherichia coli*. *Bulletin de la société royale des sciences de liège* : pp44-66
35. 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.
36. Quan V Vuong., Hirun S., Paul D.Roach., Michael C.Bowyer., Phoebe A. Phillips and Christopher J.Scarlett. (2013) Effect of extraction conditions on total phenolic compound and antioxidant activities of *Carica papaya* leaf aqueous extracts, *journal of herbal medicine*. 3: 104–111.
37. Rajesh S. (2020). Production of azolla as livestock feed supplement in India. *Pashudhanpraharee. Indian Dairy & Poultry industry*.43 P.
38. Romanik, G., Gilgenast, E., Przyjazny, A., Kaminski, M. (2007). Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis, *J Biochem Biophys Methods*, 70,253-261.
39. Scalbert A (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 3875-3883.
40. Shohaib H.M., Nawaz S. and Matin A. (2016). Methanolic extract of *Peganum harmala* exhibit potent activity against *Acanthamoeba castellanii* cysts and its encystment *in vitro*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 29(6): 1993-1996.
41. Spigno G, Tarmelli L and De Faveri D.M. (2007). Effect of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grao marc

Références Bibliographiques

- phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81 (1) : 200-208.
42. Vazquez G, Fontenla E, Santos J, Freire MS, Gonzalez-Alvarez J, Antorrena G, (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial crops and products*, 28(3): 279-285.
 43. Verpoorte R et Alfermann (2013). Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgen Res Vol 9*: P 323- 343.

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, China/CC BY NC 2.0/Photo

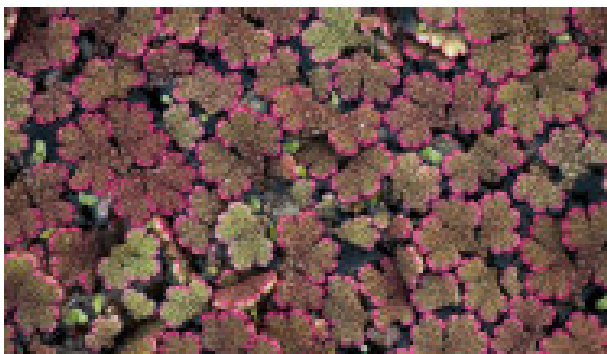
- Nom commun : Fausse fougère
- Végétation : Les frondes mesurent de 10 à 20 mm.
- Qualités : Excellente fixatrice d'azote de l'air avec une activité intense de la cyanobactérie symbiotique.

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 ?

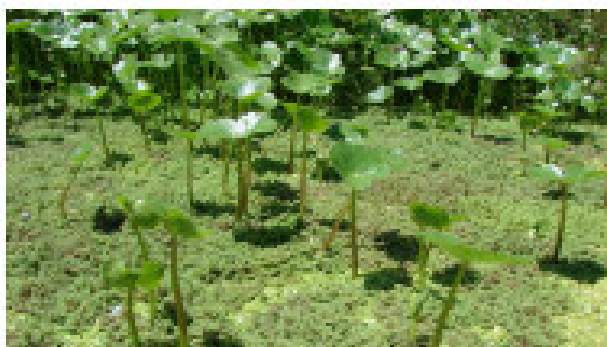
La fougère aquatique flottante demande quelques dizaines de centimètres d'eau douce chaude : un bassin de jardin assez chaud ou un aquarium tropical conviennent bien.

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 (Chongqing) 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.

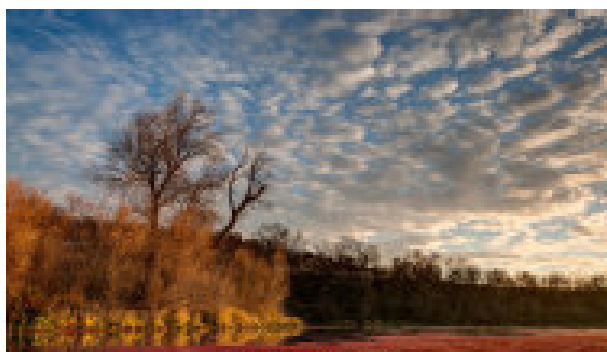
La mousse des fées peut survivre à des températures d'eau de 3 °C l'hiver, avec une croissance d'été optimale entre 25-30 °C. Toutefois, il s'agit d'une plante gélive à considérer comme une annuelle sous nos latitudes. Il est également possible de la conserver en intérieur dans un simple bac d'eau douce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

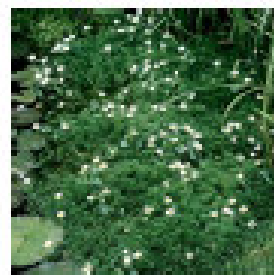
Les *Azolla*, ou mousses des fées, sont exploitées en Asie depuis des centaines d'années dans les rizières pour leur capacité à dégager de l'azote une fois mélangées à la terre, mais aussi pour leur capacité d'épuration de divers polluants (incluant certains métaux lourds) de l'eau.

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

Plantes du même type



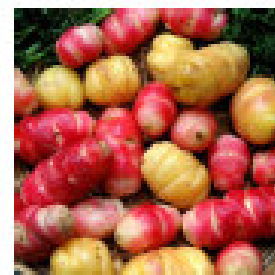
Glyceria maxima



Hottonia palustris



Verveine
citronnelle

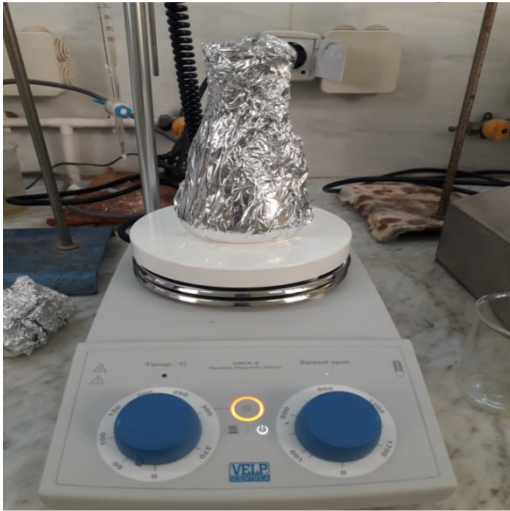


Oca du Pérou

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

Annexe 2

Photos des essais



Extraction par décoction



Filtration des solvants



Extraction par macération



Filtration des extraits



Centrifugation



Traitement par Ultrason