

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل

École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme

D'Ingénieur et de Master en Science de la Mer

Option : Biotechnologie Marine

Thème :

**Détermination des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes d'une plante aquatique : l'*Azolla pinnata* en vue de sa valorisation**

Présenté par : MILAT Aziz et CHAYANI Ilham

Soutenu le : 03 / 07 / 2024, devant le jury composé de :

M. BOULAHIDID Mostefa	Professeur	Président	ENSSMAL
Mme AISSOU-AKROUR Cherifa	Maitre de Conférence A	Examinatrice	ENSSMAL
Mme BENTCHIKOU Latifa	Maitre-Assistante A	Promotrice	ENSSMAL

## *Dédicaces*

*À la mémoire de mon père bien-aimé,*

*Dont l'absence se fait sentir à chaque étape de ma vie.  
Que Dieu l'accueille dans Son vaste paradis.*

*À mon frère **Bilel** et mon oncle maternel **Hamide**, partis  
trop tôt, que vos âmes reposent en paix.*

*Vous restez à jamais dans nos cœurs.*

*À ma **chère mère**, Source inépuisable d'amour, de soutien  
et d'inspiration. Pour tous les sacrifices consentis, ton  
affection et tes encouragements. Ce travail est le fruit de  
tes prières et de ta bienveillance.*

*À mes frères **Farouk, Nouradine et Dahmane**, Piliers de  
ma vie, sources de joie et de réconfort. Votre soutien  
indéfectible m'a porté jusqu'ici.*

*À mes chères sœurs **Souad, Abla et Asia**, Pour votre am  
our, votre présence et votre soutien constants. Vous êtes la  
lumière de mes jours.*

*À ma fleur **Kenza**, Ton parfum embellit ma vie et  
m'inspire chaque jour. Ta présence est un cadeau  
précieux.*

*À ma grande famille, Pour votre affection et vos  
encouragements. Vous avez tous contribué à façonner la  
personne que je suis devenue.*

*À tous ceux qui me sont chers, Que ce travail soit le  
témoignage de ma profonde gratitude Et l'expression de  
mon amour sincère.*

*Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur et réussite.*

## *Dédicaces*

*À mes parents chéris,*

*Papa et Maman,*

*Je vous dédie ce projet avec tout mon amour et ma profonde reconnaissance. Vous avez été mes piliers constants, me soutenant et m'encourageant à chaque étape. Votre foi en moi m'a donné la force de persévérer et de ne jamais abandonner. Merci infiniment pour vos sacrifices, vos conseils précieux et votre amour inconditionnel.*

*À mes sœurs adorées, et mon frère bien-aimé*

*Ikram, Siham et med Yacine*

*Votre soutien indéfectible et vos encouragements ont été une source inestimable de motivation tout au long de mon parcours académique. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir poussé à donner le meilleur de moi-même.*

*À mon beau-frère estimé,*

*Ramzi,*

*Merci pour ton soutien constant et tes conseils avisés. Je suis reconnaissante d'avoir un beau-frère aussi précieux que toi.*

## Remerciements

Nous commençons par exprimer notre profonde gratitude envers Dieu, le Tout-Puissant et le Miséricordieux, pour nous avoir accordé le courage, la force, la santé et la persévérance nécessaires à l'accomplissement de cette recherche.

Nos sincères remerciements vont à notre encadrante, **Mme Latifa Bentchikou**, pour son dévouement, sa sincérité et son soutien constant tout au long de cette étude. Son excellence en tant que femme, chercheuse et mère est une source d'inspiration pour nous.

Nous adressons notre reconnaissance au **Pr. BOULAHDID M.** et au **Dr. AISSOU C.** pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'évaluer notre travail.

Nous tenons à exprimer aussi notre profonde gratitude à **Mme Boubechiche Zakia** pour son expertise et sa bienveillance ont été déterminantes pour mener à bien ce projet.

Notre gratitude s'étend également à **Mme GUERROUMI Houda**, ingénieure du laboratoire de biologie moléculaire de notre école, pour son assistance précieuse.

Nous tenons à remercier l'équipe du laboratoire de microbiologie, en particulier **Mme RAHAL F.** et **M. HIMRANE M.** de SAIDAL - site de production d'El-Harrach, pour leur soutien inestimable.

Enfin, nous exprimons notre reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

## Résumé

La composition phytochimique et les activités pharmacologiques de nombreuses plantes offrent un potentiel médicinal pour la recherche scientifique. Nombreuses entre elles, ces plantes sont considérées comme des sources plus riches en antibactériens et antioxydants. Notre travail a pour objectif d'évaluer les effets antibactériens, antioxydants des extraits de l'*Azolla pinnata*. D'abord, la composition biochimique de la matière sèche de l'*Azolla* a été analysée. Deux méthodes ont été adoptées pour extraire les composés actifs présents dans les échantillons (macération et traitement par ultrason), en utilisant trois solvants de polarité différente : eau distillée, méthanol 99%, éthanol 96%. Le criblage phytochimique a montré que le phénol, les flavonoïdes, les saponines et les quinones sont présents dans les trois extraits au solvant. La capacité antioxydante d'extrait méthanolique obtenu par les deux méthodes a été évaluée en utilisant la méthode de piégeage par le radical de DPPH en vue de comparer entre les deux méthodes.

L'activité antibactérienne des extraits obtenus par macération a été étudiée par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide sur quatre souches (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*). Les résultats ont révélé que le rendement le plus élevé a été noté pour l'extrait méthanolique (35.24 %) obtenu à partir de l'extraction par ultrason, alors que les plus faibles valeurs ont été notées pour l'extrait éthanolique obtenu par macération de l'ordre de (3.6 %).

Notre étude met en évidence l'influence de la méthode d'extraction ainsi que la nature du solvant sur le dosage des polyphénols dans *Azolla pinnata*. L'extraction par ultrasons avec du méthanol semble être la méthode la plus efficace pour optimiser l'extraction des polyphénols à partir de l'*Azolla pinnata*. Selon les résultats trouvés, l'augmentation du piégeage du DPPH est proportionnelle aux concentrations utilisées de nos extraits obtenus des deux méthodes d'extraction (macération et traitement par ultrason), utilisant le méthanol. Nos résultats montrent que les différents extraits ont montré une activité inhibitrice sur les souches testées.

Mots clés : *Azolla pinnata* ; Composés bioactifs ; Ultrason ; Macération ; Activité antibactérienne ; *Staphylococcus aureus* ; *Escherichia coli* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Bacillus subtilis* ; composés bioactifs ; polyphénols ; composition biochimique ; pouvoir antioxydant ; DPPH.

## Abstract

The phytochemical composition and pharmacological activities of many plants offer medicinal potential for scientific research. Many of these plants are considered rich sources of antibacterial and antioxidant compounds. Our work aims to evaluate the antibacterial and antioxidant effects of *Azolla pinnata* extracts. First, the biochemical composition of *Azolla* dry matter was analyzed. Two methods were adopted to extract the active compounds present in the samples (maceration and ultrasound treatment), using three solvents of different polarity: distilled water, 99% methanol, and 96% ethanol. Phytochemical screening showed that phenols, flavonoids, saponins, and quinones are present in all three solvent extracts. The antioxidant capacity of methanolic extracts obtained by both methods was evaluated using the DPPH radical scavenging method to compare the two methods.

The antibacterial activity of extracts obtained by maceration was studied using the disk diffusion method on solid agar medium against four strains (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*). The results revealed that the highest yield was noted for the methanolic extract (35.24%) obtained from ultrasound extraction, while the lowest values were noted for the ethanolic extract obtained by maceration, around 3.6%.

Our study highlights the influence of the extraction method and the nature of the solvent on the quantification of polyphenols in *Azolla pinnata*. Ultrasound extraction with methanol appears to be the most effective method for optimizing the extraction of polyphenols from *Azolla pinnata*. According to the results found, the increase in DPPH scavenging is proportional to the concentrations used of our extracts obtained from both extraction methods (maceration and ultrasound treatment) using methanol. Our results show that the different extracts demonstrated an inhibitory activity on the tested strains.

Keywords: *Azolla pinnata*; Bioactive compounds; Ultrasound; Maceration; Antibacterial activity; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Bacillus subtilis*; Bioactive compounds; Polyphenols; Biochemical composition; Antioxidant capacity; DPPH.

## Tables des matières :

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

Introduction .....	2
--------------------	---

### Chapitre I : Généralité

#### 1. Généralité sur les fougères aquatique

1.1. Écologie et mode reproduction des fougères aquatiques.....	6
1.2. Classification des fougères aquatiques.....	6
1.3. L'intérêt des fougères aquatiques et leur applications dans le monde.....	6
2. Généralités sur les fougères appartenant aux Azollaceae ( <i>Azolla pinnata</i> )	
2.1. Identification et caractéristiques des Azollaceae ( <i>Azolla pinnata</i> ).....	7
2.2. Ecologie et mode de reproduction des Azollaceae.....	7
2.3. Composition biochimique des Azollacées .....	7
3. Les activités biologiques des Azollaceae	
3.1. Activité antibactérienne.....	8
3.2. Activité antioxydante.....	8

### Chapitre II : Matériel & Méthodes

#### II. Matériel et Méthodes

II.1. Objectif du travail.....	11
II.2. Période et lieu de travail.....	11
II. 3. Matériels et produits .....	11
II. 3. 1. Matériel végétal .....	13
II. 3. 2. Préparation des échantillons. ....	14
II. 4. Caractérisation biochimique de l' <i>Azolla pinnata</i> .....	15
II. 4.1. Teneur d'humidité.....	15
II. 4.2. Teneur en cendre .....	16
II. 4.3. Teneur en matières grasses.....	17

I I. 4.4. Teneur en protéines.....	18
II. 4.5. Teneur en glucides.....	20
II. 5. Extraction des composés bioactifs de la matière sèche de l'Azolla.....	22
II. 5.1. Extraction par macération.....	22
II. 5.2. Extraction par ultrason.....	23
II. 5.3. Calcul du rendement. ....	23
II. 5.4. Dosage des polyphénols totaux .....	24
II. 6. Criblage phytochimique .....	25
II.7. Valorisation des extraits bioactifs obtenus comme antibactériens .....	28
II.7.1. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	26
II.8. Valorisation des extraits bioactifs de l' <i>Azolla pinnata</i> comme antioxydants.....	29
II.8.1. Evaluation du pouvoir antioxydant.....	30

### **Chapitre III : Résultats et discussions**

#### **III. Résultats et Discussions**

III. 1. Identification de l'espèce d'Azolla récoltée .....	35
III. 2. Caractérisation biochimique de l' <i>Azolla pinnata</i> ....	36
III. 2.1. Détermination du taux de l'humidité .....	36
III. 2.2. Détermination de la teneur en cendre .....	36
III. 2.3. Détermination de la teneur en matières grasses .....	37
III. 2.4. Détermination de la teneur en protéines.....	37
III. 2.4. Détermination de la teneur en glucides.....	38
III. 3. Valorisation des extraits bioactifs de l' <i>Azolla pinnata</i> .....	39
III. 3.1. Extraction des composés bioactifs .....	39
III. 3.1.1. Rendements d'extractions. ....	39
III. 3.1.2 Dosage des polyphénols totaux .....	40
III. 3.2. Criblage phytochimique .....	43
III. 4. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits obtenus.....	45
III. 5. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits obtenus.....	47
<b>Conclusion</b> .....	48
<b>Références Bibliographiques</b> .....	51
<b>Annexes</b> .....	58

## Liste des Tableaux :

Tableau II.1: Matériel et produits utilisés dans les différentes analyses.

Tableau II.2 : Les différentes souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne (sous un format différent)..

Tableau III.1: Composition biochimique des échantillons analysés *d'Azolla pinnata*.

Tableau III.2 : les résultats des échantillons d'Azolla pour la teneur en matière grasse

Tableau III.3 : les résultats des échantillons d'Azolla pour la teneur en protéine.

Tableau III. 4: Rendement d'extraction par les différents solvants utilisés.

Tableau III.5 : Résultats du dosage des polyphénols des différents extraits en deux méthodes.

Tableau III.6: Analyse phytochimique de divers extraits organiques d'Azolla pinnata

Tableau III.7 : Les diamètres d'inhibition et les concentrations minimales inhibitrices générés de l'activité antibactérienne des extraits d'*Azolla pinnata*

Tableau III.8: les densités optiques mesurées pour chaque concentration de l'extrait méthanolique des deux méthodes d'extraction (macération, ultrason) d'*Azolla pinnata* et de l'acide ascorbique.

Tableau III.9 : Activité de récupération (IC50) d'extrait d'Azolla pinnata sur les radicaux DPPH

## Liste des Figures :

Figure I.1 : Photographie de taille moyenne d'*Azolla pinnata*.

Figure II.1 : Organigramme du protocole expérimental adopté.

Figure II.2 : Photographie de la culture de l'*Azolla pinnata* élaborée dans la ferme aquacole de l'ENSSMAL.

Figure II.3 : Photographie d'échantillonnage de l'*Azolla pinnata*.

Figure II.4 : Préparation de la matière sèche de l'*Azolla pinnata*.

Figure II.5: Creuset contenant la poudre d'*Azolla* placée dans four à moufle pour la calcination.

Figure II.6 : Concentration de l'extrait par l'évaporateur rotatif.

Figure II.7 : Extraction de lipides d'*Azolla pinnata* à l'aide d'un appareil Soxhlet.

Figure II.8 : Coloration verdâtre (stable) obtenue à la fin de l'étape de minéralisation .

Figure II.9 : Titrage colorimétrique de l'ion ammonium donnant changement de couleur indiquant le point d'équivalence).

Figure II.10 : Distillation du mélange réactionnel par le Kjeldahl.

Figure II.11: Détermination colorimétrique de la concentration des glucides.

Figure II.12 : Refroidissement des tubes dans l'eau à 20°C.

Figure II.13 : La gélose Mueller Hinton (MHA).

Figure II.14 : des souches bactériennes en tubes BHIB dans un incubateur microbiologique.

Figure II.15 :Boîte pétrie avec quatre disques de contrôle antibactérien.

Figure II.16 : Structure chimique du radical DPPH et sa réaction avec l'antioxydant (AH).

Figure II.17:Tubes avec différentes concentrations d'extrait méthanolique.

Figure II.18:Tubes avec différentes concentrations d'acide ascorbique.

Figure III.1 : Évolution de la biomasse d'*Azolla pinnata* en fonction du temps de culture.

Figure III.2 : Courbe d'étalonnage du glucose servant au dosage des glucides.

Figure III.3 : Photos des extraits après évaporation dans différents solvants.

Figure III.4 : Tubes à essais révélant les résultats de dosage des polyphénols

Figure III.5: Courbe d'étalonnage d'acide gallique.

Figure III.6 : Photos des solutions de la gamme d'étalonnage d'acide gallique .

Figure III.7 : Photos des résultats des différents tests de criblage phytochimique.

Figure III.8 : Diamètre des zones d'inhibition avec les différentes concentrations de différents des extraits d'*Azolla pinnata*..

Figure III.9 : Photographies montrant la sensibilité des différentes souches bactériennes pour différents extraits d'*Azolla pinnata*.

Figure III.10 : Concentrations des extraits d'*Azolla pinnata* en fonction du pourcentage d'inhibition du radical DPPH.

Figure III.11 : Activité anti-radicalaire du DPPH ; pourcentage d'inhibition d'extrait méthanolique d'*Azolla pinnata* par deux méthodes différentes.

## Liste des Abréviations :

T : Température

pH : Potentiel d'hydrogène

°C : Degré Celsius.

A.pinnata : *Azolla pinnata*.

MS : Matière sèche.

ME : La masse de la prise d'essai.

R% : Le pourcentage de rendement.

BHIB : Brain Heart Infusion Broth.

EE : Extrait éthanolique

EM : Extrait méthanolique

MHA : Mueller Hinton Agar.

DPPH : 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyle.

I % : Pourcentage d'inhibition de DPPH.

IC<sub>50</sub> : La concentration d'extrait à 50 % d'inhibition

# *Introduction*

## Introduction :

Le monde végétal aquatique est d'une richesse et d'une diversité remarquables, abritant une multitude d'espèces qui ont su s'adapter à des conditions environnementales spécifiques. Ces plantes aquatiques jouent un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre écologique des écosystèmes des eaux douce et marine (*Chambers et al., 2008*).

Elles participent activement à la production d'oxygène par photosynthèse, à la filtration et à la purification de l'eau en absorbant les nutriments excédentaires et les polluants, à la stabilisation des sédiments grâce à leurs systèmes racinaires, et servent d'habitats et de sources de nourriture pour une grande variété d'organismes aquatiques (*Bornette & Puijalon, 2011*).

La flore aquatique comprend différents groupes de plantes, tels que les macrophytes flottants, submergés ou émergents (*Lacoul & Freedman, 2006*). Ces macrophytes flottants, comme les fougères aquatiques, possèdent des feuilles et des tiges adaptées pour flotter à la surface de l'eau.

Parmi les plantes fascinantes, les fougères aquatiques occupent une place particulière. Les fougères aquatiques sont des plantes vasculaires sans graines qui ont colonisé avec succès les milieux aquatiques. Elles appartiennent à la division des Pteridophytes et sont représentées par plusieurs familles, dont les Salviniaceae, les Marsileaceae et les **Azollaceae**. Ces fougères ont développé des adaptations remarquables pour leur vie aquatique, telles que des feuilles flottantes, des racines réduites et des structures reproductives spécialisées (*Pryer et al., 2001*). Les Azollaceae, représentées par le genre *Azolla* comme *Azolla caroliniana*, *Azolla filiculoides* sont des petites fougères flottantes qui abritent une cyanobactérie symbiotique fixatrice d'azote dans leurs feuilles.

L'une des fougères aquatiques aussi la plus intrigante est sans conteste *Azolla pinnata* ; une petite plante flottante de la famille des Salviniaceae. Originaire des régions tropicales et subtropicales, *Azolla pinnata* a récemment attiré l'attention des chercheurs pour ses propriétés grâce à son potentiel en tant qu'aliment pour les animaux. Sa teneur élevée en protéines, en acides aminés essentiels, en vitamines et en minéraux en fait une source nutritionnelle intéressante pour les batailles et les poissons (*Anitha et al., 2016*). L'incorporation d'*Azolla* dans les régimes alimentaires des animaux peut améliorer leur croissance, leur santé et la qualité de leurs produits, tout en réduisant les coûts liés à l'alimentation (*BHUJEL et al., 2022*).

L'*Azolla pinnata* joue un rôle essentiel dans le maintien de la qualité de l'eau et la réduction de la pollution. Grâce à sa capacité à accumuler les nutriments, en particulier l'azote et le phosphore, cette fougère aquatique est utilisée comme agent de phytoremédiation pour le traitement des eaux usées et la restauration des écosystèmes aquatiques dégradés (*Sood et al., 2012*).

Au-delà de son intérêt biotechnologique, *Azolla pinnata* s'est révélée être une source naturelle prometteuse de composés bioactifs, en particulier de puissants antioxydants et agents antibactériens. Les travaux de *Farook et al.*, (2019) ont mis en évidence la présence de polyphénols.

Ces composés bioactifs sont des constituants extra nutritionnels participant dans les activités physiologiques ou cellulaires chez les humains et les animaux en fournissant des activités antibactérienne, antioxydante, anti-inflammatoire, anticancérigène protégeant contre les troubles métabolique (*Kris-Etherton et al*, 2002).

Ces découvertes ouvrent des perspectives intéressantes quant à l'utilisation d'*Azolla pinnata* comme source naturelle d'antioxydants et d'agents antibactériens dans diverses applications pharmaceutiques et cosmétiques. Les antioxydants naturels suscitent un intérêt croissant pour la prévention des maladies liées au stress oxydatif, telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète et certains cancers. Les agents antibactériens d'origine naturelle représentent une alternative prometteuse aux antibiotiques synthétiques, face à l'émergence de souches bactériennes résistantes. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour isoler et caractériser les composés bioactifs spécifiques d'*Azolla pinnata*, évaluer leur innocuité in vivo et optimiser les méthodes d'extraction pour une production à plus grande échelle.

Le monde végétal aquatique, et en particulier les fougères telles qu'*Azolla pinnata*, représente un réservoir fascinant de molécules bioactives aux propriétés antioxydantes et antibactériennes. L'exploration de cette biodiversité unique offre des opportunités passionnantes pour la découverte de nouveaux composés naturels d'intérêt thérapeutique et biotechnologique. Les recherches futures sur *Azolla pinnata* et d'autres fougères aquatiques promettent de révéler de nouvelles substances bioactives, d'élargir notre compréhension vis-à-vis de ces plantes remarquables et de développer des applications innovantes dans les domaines de la santé.

La valorisation de ces ressources naturelles pourrait également contribuer à la conservation et à la gestion durable des écosystèmes aquatiques, tout en offrant de nouvelles perspectives économiques aux communautés locales, c'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de recherche dont l'objectif est d'évaluer l'activité antibactérien et antioxydant des extraits des Azollas récoltées de la région de Issers dans Wilaya de Boumerdes, ainsi que l'optimisation de leur extraction.

Pour atteindre à notre objectif, notre étude est structurée en trois chapitres :

. **Le premier chapitre** offre une vue d'ensemble d'*Azolla pinnata*, établissant ainsi une base pour notre recherche.

. **Le deuxième chapitre** aborde l'extraction des composés bioactifs d'*Azolla pinnata*. Il compare les méthodes d'extraction avec différents solvants, analysant leurs rendements. Le chapitre détaille la récolte, le séchage, le broyage et la caractérisation biochimique de la plante.

. **Le troisième chapitre** est consacré à la valorisation des extraits bioactifs d'*Azolla*, avec un accent particulier sur l'évaluation de leurs effets antibactériens et antioxydants. Cette approche globale nous permet d'explorer en profondeur le potentiel d'*Azolla pinnata* en tant que source de précieux composés bioactifs.

# *Chapitre I*

## *Généralités*

## **I. Généralités sur les fougères aquatiques :**

Les fougères aquatiques, contrairement aux fougères terrestres que l'on rencontre communément dans les forêts, sont un groupe de plantes fascinantes qui ont su s'adapter à la vie immergée. Elles constituent un élément important de la biodiversité aquatique, peuplant les lacs, les étangs, les rivières et les zones humides du monde entier.

### **I.1 Écologie et mode de reproduction des fougères aquatiques**

#### **a-Écologie :**

Les fougères aquatiques occupent une grande variété de niches écologiques, allant des eaux douces calmes aux rivières tumultueuses, elles peuvent être flottantes, submergées ou enracinées dans le sol submergé.

Elles jouent un rôle crucial aussi dans les écosystèmes aquatiques en fournissant un habitat à la faune, en oxygénant l'eau et en participant à la chaîne alimentaire des quelques poissons (*Sharpe et al.2010*).

#### **b-Reproduction:**

Les fougères aquatiques se reproduisent principalement par spores ; des cellules reproductrices minuscules qui peuvent se disperser par le vent ou l'eau.

Il existe certaines espèces qui peuvent également se reproduire par voie végétative, en développant de nouvelles plantes à partir de fragments de leur corps.

### **I.2. Classification des fougères aquatiques :**

Les fougères aquatiques sont classées en deux principaux groupes : les fougères hétérosporées et les fougères homosporées :

Les fougères hétérosporées : produisent deux types de spores, les microspores et les mégaspores, qui donnent naissance à des gamétophytes mâles et femelles distincts.

Les fougères homosporées : en revanche, ne produisent qu'un seul type de spores, qui peut se développer en gamétophyte mâle ou femelle.

Parmi les familles de fougères aquatiques les plus connues, on trouve les Azollaceae .

### **I.3. L'intérêt des fougères aquatiques et ses applications dans le monde**

Les fougères aquatiques présentent un intérêt écologique, économique important :

a-Écologiquement : elles jouent un rôle crucial dans le maintien des écosystèmes aquatiques et contribuent à la régulation de la qualité de l'eau d'où elles peuvent être utilisées pour éliminer les polluants de l'eau, tels que les métaux lourds et les composés organiques.

Économiquement : elles sont utilisées dans divers domaines tels que : la santé pour créer de nouveaux antibiotiques grâce à leur composition chimique leur permettant de détruire

certaines germes pathogènes, l'agriculture pour les utiliser comme engrais verts en raison de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique (Dhir et al. 2018).

## **I.2. Généralités sur les fougères appartenant aux Azollaceae (*Azolla pinnata*) :**

### **I.2.1. Identification et caractéristiques des Azollaceae (*Azolla pinnata*)**

Les Azollaceae sont une famille de petites fougères aquatiques flottantes. L'*Azolla pinnata* est une espèce commune, caractérisée par des frondes bipennées et imbriquées de 1 à 2,5 cm de long (Figure I.1), ces frondes ont une couleur verte à rougeâtre reflétant la présence de la chlorophylle et des caroténoïdes (Sood et al., 2012).



**Figure I.1 :** Photographie de taille moyenne  
l'*Azolla pinnata*

### **I.2.2. Ecologie et mode de reproduction des Azollaceae :**

Les Azollaceae se développent à la surface des eaux douces stagnantes ou à faible courant (Sood et al., 2012).

Elles se reproduisent rapidement par multiplication végétative via fragmentation des frondes (asexuée) qui est de loin le moyen le plus courant de la reproduction que la reproduction sexuée est rare et se produit par la formation de sporocarpes contenant des spores (Wagner, 1997).

### **I.2.3. Composition biochimique des Azollacées**

L'*Azolla pinnata* abrite une cyanobactérie symbiotique qui fixe l'azote atmosphérique qui permet de la teneur élevée en azote et la croissance rapide font d'*Azolla pinnata* un excellent engrais vert et aliment pour animaux (Sood et al., 2012 ; Wagner, 1997).

Les frondes sont riches en protéines et en glucides, en acides aminés essentiels, en vitamines ( beta-carotène ) et en minéraux (calcium, potassium, fer, magnésium) (Sood et al., 2012 ; Wagner, 1997).

### **I.3. Les activités biologiques des Azollaceae :**

#### **I.3.1. Activité antibactérienne**

Les extraits d'*Azolla pinnata* ont démontré une activité antibactérienne contre plusieurs bactéries pathogènes, notamment *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Jacob et al., 2020).

Les composés phénoliques et les Terpénoïdes présents dans les extraits d'*Azolla* sont responsables de l'activité antibactérienne (Ergüden et al.2021).

#### **I.3.2. Activité antioxydante**

Les extraits d'*Azolla pinnata* présentent une activité antioxydante significative, mise en évidence par des tests spécifiques tel que DPPH, les composés phénoliques, les flavonoïdes et les carotènes (Pyrzynska et al.2013, Lejeune et al., 2000).

L'activité antioxydante et antibactérienne d'*Azolla* pourrait avoir des applications potentielles dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

# **Partie Expérimentale**

# *CHAPITRE II*

*Matériel*

*et*

*Méthodes*

## II. Matériel et Méthodes :

### II.1. Objectif du travail

Notre étude vise à évaluer l'efficacité antibactérienne et le pouvoir antioxydant des extraits d'*Azolla pinnata* récoltés dans la ferme aquacole de l'école nationale supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littoral (ENSSMAL). Une optimisation des conditions d'extraction a été élaborée. La figure II.1 présente le protocole expérimental sous forme d'organigramme détaillant les différentes étapes de notre travail.

### II.2. Période et lieu de travail

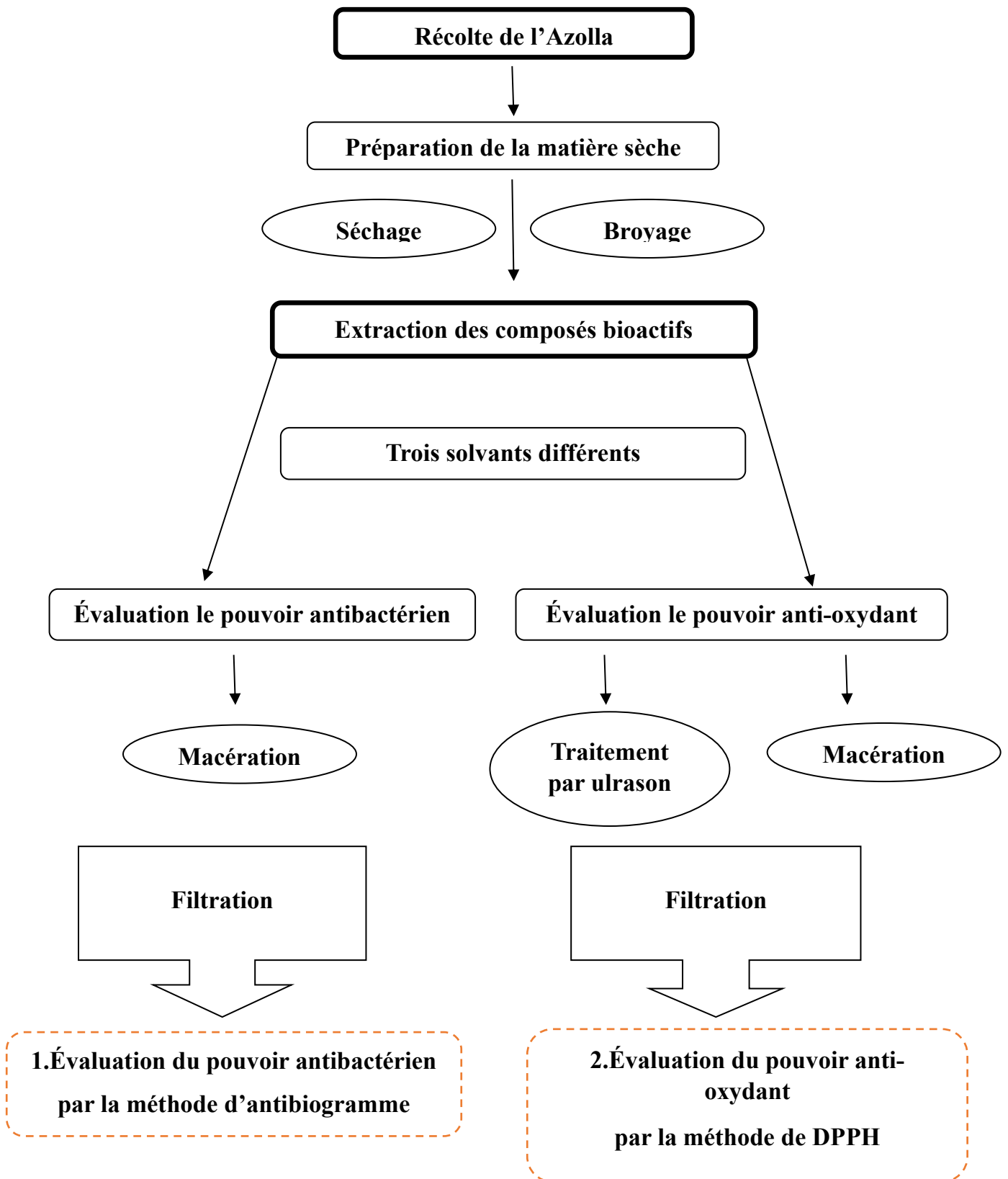
Les différents tests et analyses ont été réalisés au niveau du laboratoire de biologie moléculaire de l'ENSSMAL et dans laboratoire de contrôle microbiologique de SAIDAL -site de production - El-Harrach, durant la période allant du mois de Février au mois de Mai 2024.

### II. 3. Matériels et produits :

Le matériel utilisé pour mener cette étude comprend différents verreries, d'équipements et d'appareils, ainsi qu'un ensemble de réactifs et de produits chimiques. Ces éléments sont répertoriés dans le tableau II.1 :

**Tableau II.1: Matériel et produits utilisés dans les différentes analyses.**

Verreries et autres	Appareillage	Réactifs et produits
Boites de pétri	Agitateur	Eau distillée
Ballon en verre	Étuve	Méthanol
Béchers	Centrifugeuse	Éthanol
Flacons brins	Balance de précision	DPPH
Entonnoirs	Ultrason	Le réactif Fiolin-Ciocalteu
Eprouvettes	Réfrigérateur	Des souches bactériennes
Erlen Meyer	Spectrophotomètre	La gélose Muller Hinton
Tubes à essais	Bain marie	Le bouillon BHIB
Étiquettes	L'appareil de distillation Kjeldahl	NAOH
Fioles jaugées	Rota-vapeur	Acide sulfurique
Micropipettes	Un dispositif Soxhlet de 250ml	Acide borique
Papier aluminium		Acide galique
Papier filtre 'Whatman'		Carbonates de sodium
Boites de pétri		Chloroforme



**Figure II.1** : Organigramme du protocole expérimental adopté

### II. 3. 1. Matériel végétal :

Notre sujet de recherche porte sur l'*Azolla pinnata* qui est une fougère aquatique flottante de petite taille. Cette espèce, membre de la famille des Azollaceae originaire du Sud-Est asiatique et l'Est à l'Afrique. La culture du matériel végétal a débuté le 14 Avril 2024 au niveau des aquariums de culture dans la ferme aquacole de l'école nationale supérieure des sciences de la mer et de l'aménagement du littorale à Dély- Ibrahim, à la wilaya d'Alger (Figure II.2). L'échantillon d'*Azolla pinnata* initialement lancé pour la culture a été acheté de la région des Issers – Wilaya de Boumerdes.

Après 15 jours de culture dans des aquariums, les échantillons d'*Azolla* ont fait l'objet d'un prélèvement manuel (Figure II.3).



**Figure II.2 :** Photographie de la culture de l'*Azolla pinnata* élaborée dans la ferme aquacole de l'ENSSMAL.



**Figure II.3 :** Photographie d'échantillonnage de l'*Azolla pinnata*

### **II. 3. 2. Préparation des échantillons :**

Les échantillons d'Azolla récoltés ont été soigneusement lavés avec de l'eau de robinet suivie d'un rinçage avec l'eau distillée puis d'un séchage à l'ombre pendant quelque jours. Le végétal séché a subi ensuite un broyage en utilisant un broyeur du laboratoire, et la poudre fine obtenue a été stockée dans un dessiccateur dans l'attente de l'extraction.



**Figure II.4 :** Préparation de la matière sèche de l'*Azolla pinnata*

#### **II.4. Caractérisation biochimique de l'*Azolla pinnata* :**

Les Azollas présentent un intérêt particulier du fait de la diversité de leur composition biochimique. Cette biomasse végétale se caractérise principalement des autres plantes par ses teneurs importants en protéines, polysaccharides, vitamines, pigments et aussi les polyphénols reconnus par leurs propriétés antibactériens et antioxydantes (*Alalade et al., 2006*).

Dans le cadre de nos travaux, nous avons procédé à la caractérisation de quelques paramètres biochimiques clés de l'*Azolla pinnata* . Cette caractérisation a consisté à déterminer les teneurs en cendres, matières grasses, protéines et glucides de cette espèce.

Notre étude visait à évaluer la richesse nutritionnelle de l'*Azolla pinnata* en quantifiant certains de ses principaux composants biochimiques, à savoir les minéraux (cendres), les lipides (matières grasses), les protéines et les glucides. Cette analyse permet de mieux appréhender le potentiel et l'intérêt de cette fougère aquatique en tant que source de biomolécules variées.

##### **II. 4.1. Teneur en humidité**

La teneur en humidité est déterminée selon la méthode standard (*AOAC, 1995*).

Cette méthode décrit le processus de détermination de la teneur en matière sèche d'un échantillon biologique, dans ce cas l'*Azolla pinnata*. Le protocole implique la pesée initiale d'un échantillon frais dans un creuset pré-pesé, suivie d'une période de séchage à température contrôlée. Après le séchage, l'échantillon est refroidi dans un environnement contrôlé pour éviter la réabsorption d'humidité. La différence entre le poids initial et final de l'échantillon permet de calculer la teneur en eau et en matière sèche de l'échantillon. Cette technique est couramment utilisée en analyse biochimique et environnementale pour caractériser la composition des matières organiques.

La teneur en humidité est généralement exprimée en pourcentage de la masse fraîche.

#### II.4.2. Teneur en cendre :

La teneur en matière minérale de la matière sèche préparée est déterminée après Calcination à haute température selon la méthode standard (AOAC, 1995).

Cette procédure décrit une méthode d'analyse gravimétrique pour déterminer la teneur en matière organique d'un échantillon. Le processus implique la pesée initiale d'un creuset vide, suivie de l'ajout d'un échantillon sec et broyé. Le creuset contenant l'échantillon est ensuite calciné à haute température dans un four, permettant la décomposition de la matière organique. Après refroidissement dans un environnement contrôlé, le creuset contenant le résidu est pesé à nouveau. La différence de masse avant et après la calcination permet de calculer la teneur en matière organique de l'échantillon.

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.



**Figure II.5:** Creuset contenant la poudre d'Azolla placée dans four à moufle pour la calcination.

### II.4.3. Teneur en matières grasses :

La teneur en matières grasses est déterminée selon la méthode gravimétrique Soxhlet suivie par *Sharma et al. (2023)*.

L'extraction d'huile est réalisée à l'aide d'un dispositif Soxhlet en utilisant un mélange de solvant. La biomasse séchée est d'abord pulvérisée pour faciliter l'extraction. L'échantillon est placé dans une cartouche poreuse insérée dans l'extracteur. Le solvant est chauffé jusqu'à ébullition pendant plusieurs heures. Après l'extraction, le solvant est éliminé par évaporation sous vide. La matière grasse extraite est ensuite pesée après refroidissement. L'expérience est généralement répétée pour assurer la fiabilité des résultats.



**Figure II.6 :** Concentration de l'extrait par l'évaporateur rotatif.



**Figure II.7 :** Extraction de lipides d'*Azolla pinnata* à l'aide d'un appareil Soxhlet.

#### II.4.4. 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 Kjeldahl des méthodes d'analyses françaises et communautaires *AFNOR (1985)*.

La détermination de l'azote dans l'*Azolla* se fait en trois étapes principales. D'abord, une minéralisation de l'échantillon est réalisée à l'aide d'acide sulfurique concentré et d'un catalyseur.

Ensuite, une distillation est effectuée en milieu alcalin pour récupérer l'ammoniac dans une solution d'acide borique.

Enfin, un titrage en retour avec de l'acide sulfurique permet de quantifier l'azote présent.

L'essai est généralement répété plusieurs fois, avec un essai à blanc, pour assurer la précision des résultats.

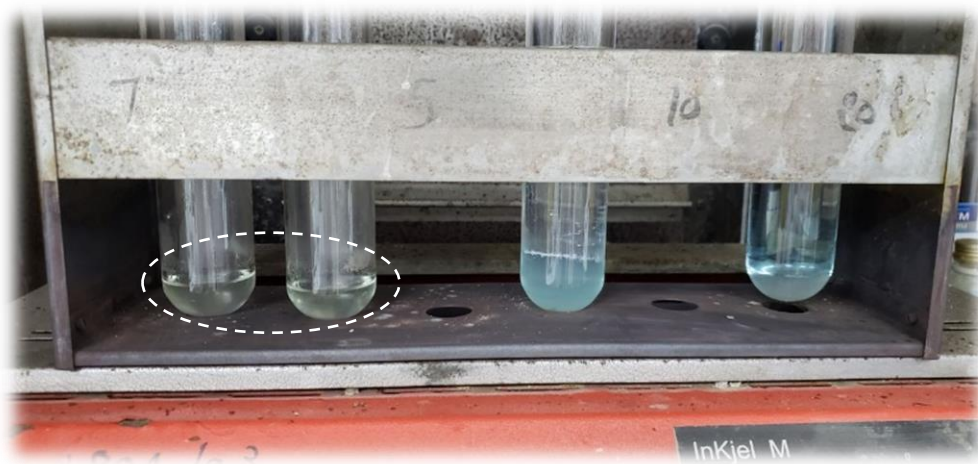


Figure II.8: Coloration verdâtre (stable) obtenue à la fin de l'étape de minéralisation.

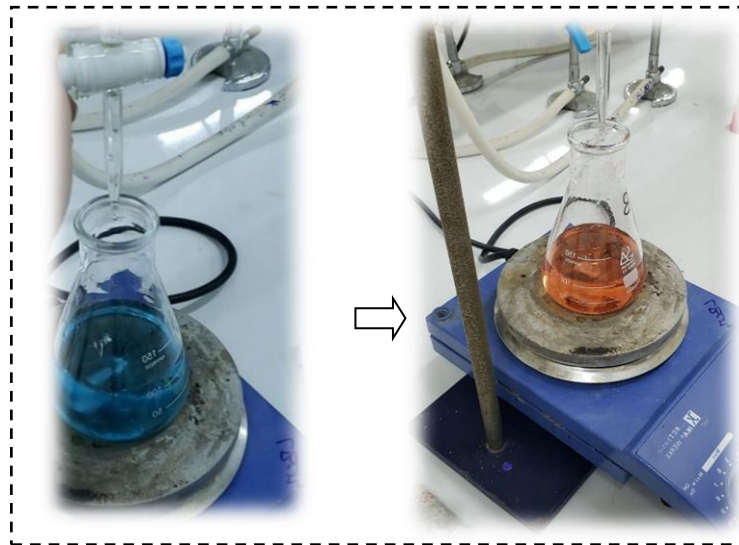


Figure II.9 : Titrage colorimétrique de l'ion ammonium donnant changement de couleur indiquant le point d'équivalence



Figure II.10 : Distillation du mélange réactionnel par le Kjeldahl.

#### II.4.5. Teneur en glucides :

Pour la teneur en glucide, on a utilisé la méthode Dubois et al. 1956 décrite par *Albalasmeh et al., 2013* pour déterminer la teneur en glucides dans la matière sèche de l'Azolla.

La méthode colorimétrique décrite est largement utilisée pour déterminer la teneur en glucides dans des solutions aqueuses.

Elle repose sur la réaction des sucres avec l'acide sulfurique concentré et le phénol, produisant une coloration détectable. Une gamme d'étalonnage est préparée à partir d'une solution mère de sucre.

Les échantillons à analyser sont mélangés avec l'acide sulfurique.

Après l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 490 nm.

La concentration en glucose des échantillons est déterminée par comparaison avec la courbe d'étalonnage.



Figure II.11: Détermination colorimétrique de la concentration des glucides.



**Figure II.12** : Refroidissement des tubes dans l'eau à 20°C.

## II. 5. Extraction des composés bioactifs de la matière sèche de l'*Azolla* :

L'*Azolla pinnata* est une fougère aquatique connue pour ses propriétés bénéfiques pour la santé. Elle est riche en composés bioactifs, notamment en polyphénols, flavonoïdes et alcaloïdes, qui présentent des activités antibactériennes et antioxydantes. Ces composés peuvent être extraits de la matière sèche de l'*Azolla pinnata* à l'aide de différentes méthodes, telles que la macération, la décoction et l'extraction par solvant.

Plusieurs études ont démontré l'efficacité des extraits d'*Azolla pinnata* contre un large spectre de bactéries pathogènes (Jacob *et al.*, 2020). Ces extraits ont également montré une activité antioxydante importante, capable de protéger les cellules contre les dommages causés par les radicaux libres (Jacob *et al.*, 2020 ; Elrasoul *et al.*, 2020).

L'extraction des composés bioactifs de l'*Azolla pinnata* présente un intérêt particulier pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques naturels (Mithraja *et al.*, 2011). Ces composés pourraient être utilisés pour traiter des infections bactériennes, des maladies inflammatoires et d'autres pathologies liées au stress oxydatif.

Dans notre étude, les solvants ont été combinés comme solvant d'extraction pour extraire les composés d'intérêt bioactifs à partir des échantillons ;

Les solvants sont des solvants couramment utilisés pour extraire des composés bioactifs, mais le méthanol se distingue par des avantages particuliers pour cette application. En effet, sa volatilité inférieure permet une évaporation plus rapide, facilitant ainsi l'élimination du solvant après l'extraction et la concentration des composés d'intérêt (Aghahosseini Shirazi *et al.*, 2019).

Dans notre étude, deux méthodes ont été adoptées pour extraire les composés actifs présents dans les échantillons, la méthode d'extraction par macération et la méthode d'extraction par ultrason, en utilisant trois solvants de polarités différentes (Farook *et al.*, 2019):

### II. 5.1. Extraction par macération :

Un échantillon de poudre d'*Azolla pinnata* a été macéré dans différents solvants. Les extraits obtenus ont été filtrés, puis conservés pour des tests ultérieurs sur leurs propriétés antibactériennes et antioxydantes.

Les extraits obtenus vont être testés pour évaluer les pouvoirs antibactérien et antioxydant qui sont considérés comme des caractères bioactifs.

## II. 5.2. Extraction par ultrason :

Cette méthode d'extraction utilise les ultrasons pour améliorer le processus. L'échantillon est placé dans un bain ultrasonique, ce qui facilite l'extraction des composés d'intérêt. Cette technique combine les principes de base de la macération avec les avantages des ultrasons.

Les extraits obtenus à partir de cette extraction vont être testés pour évaluer leur pouvoir antioxydant.

## II.5.3. Calcul du rendement d'extraction :

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait après évaporation du solvant et la masse de la matière sèche ayant servi pour l'extraction (*Djamai, 2019*).

Il est exprimé en pourcentage (%), et son calcul a été obtenu à partir de la formule suivante :

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

D'où :

Me : la masse de l'extrait évaporée en g ;

Mt : Masse totale de la matière sèche en g.

Le rendement élevé est généralement synonyme d'un processus efficace et rentable.

## II. 5.4. Dosages des polyphénols totaux :

Le dosage des polyphénols totaux de l'*Azolla pinnata* a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait.

Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de folin-ciocalteu. Le mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) est réduit, lors de l'oxydation des polyphénols, en un mélange d'oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ) des formes oxydées. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présente dans les extraits végétaux (*Boizot et Charpentier, 2006*).

### II. 5.4.2. Méthode :

Le dosage des polyphénols totaux de l'*Azolla pinnata* a été effectué par spectrophotométrie en utilisant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Cette méthode repose sur la réaction entre les composés phénoliques et le réactif de Folin-Ciocalteu, produisant une coloration bleue proportionnelle à la quantité de polyphénols présents.

Le protocole, basé sur celui de Singleton et Ross, implique le mélange des extraits végétaux avec le réactif de Folin-Ciocalteu et une solution de carbonate de sodium. Après incubation, l'absorbance est mesurée à 765 nm.

Une courbe d'étalonnage utilisant l'acide gallique comme standard permet de quantifier les résultats. Cette méthode a été appliquée à différents extraits obtenus par diverses méthodes d'extraction et solvants.

## II. 6. Criblage phytochimique :

Le criblage phytochimique d'*Azolla pinnata* a été réalisé pour identifier les principaux groupes de composés bioactifs présents dans la plante.

Cette analyse qualitative a utilisé une série de tests colorimétriques et de précipitation pour détecter la présence de différentes classes de métabolites secondaires.

Les composés recherchés incluaient les saponines, terpénoïdes, flavonoïdes, oxalates, phlobatannins, phénols, quinones, glycosides et anthocyanes.

Chaque test impliquait le mélange de l'extrait végétal avec des réactifs spécifiques, suivi de l'observation de changements de couleur ou de la formation de précipités caractéristiques.

Ces méthodes simples et rapides ont permis une évaluation préliminaire du profil phytochimique d'*Azolla pinnata*, fournissant ainsi des indications sur son potentiel thérapeutique, notamment ses propriétés antibactériennes et antioxydantes.

## II.7. Valorisation des extraits bioactifs obtenus comme antibactériens :

La résistance croissante des bactéries aux antibiotiques classiques est une menace majeure pour la santé humaine. La recherche de nouvelles solutions antibactériennes est donc une importance capitale. Les extraits bioactifs issus de sources naturelles, telles que d'*Azolla pinnata*, constituent une piste prometteuse dans ce domaine.

Donc nous avons étudié l'activité antibactérienne des extraits bioactifs d'*Azolla pinnata*.

### Les souches ciblées :

Dans le but d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits d'*Azolla pinnata* obtenus, quatre souches bactériennes ont été sélectionnées pour la procédure expérimentale (Tableau II.2).

Les souches bactériennes testées proviennent du Département de microbiologie du site de production SAIDAL El-Harrach à Alger.

Avant d'être utilisées, la pureté de ces souches a été parfaitement vérifiée au laboratoire de microbiologie de SAIDAL où tout le travail a été effectué, commençant par plusieurs ensemencements sur la gélose nutritive (GN) suivi d'une coloration de Gram ainsi que d'une caractérisation de leurs profils biochimiques.

Ces souches correspondent à des microorganismes pathogènes d'intérêt pharmaceutique:

- Gram négatif : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.
- Gram positif : *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*

**Tableau II.2** : Les différentes souches bactériennes utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne (sous un format différent).

Souche bactérienne	Morphologie	Pathogénicité	Impact
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci Gram positif	Pathogène opportuniste	Infections de la peau, voies respiratoires, systémiques
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille Gram négatif	Pathogène opportuniste	Infections nosocomiales graves, brûlures, immunodéprimés
<i>Escherichia coli</i>	Bacille Gram négatif	Pathogène opportuniste	Infections intestinales, infections des voies urinaires
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacille Gram positif	Non pathogène (Probiotique)	Les probiotiques ont provoqué des infections sanguines chez un petit nombre de personnes dont le système immunitaire est affaibli.

### Milieux de culture :

. Les milieux de culture a été utilisés dans notre étude sont les suivants :

. La gélose *Mueller Hinton* (MH), servant à tester la sensibilité des germes utilisé dans notre étude aux extraits d'*Azolla pinnata* (Figure II.13).

. Le bouillon BHIB, utilisé pour enrichir la croissance et le maintien nos souches bactériennes dans laboratoire. Les milieux de culture utilisés dans notre étude sont les suivants :

. La gélose *Mueller Hinton* (MH), servant à tester la sensibilité des germes utilisé dans notre étude aux extraits d'*Azolla pinnata* (Figure II.13).

. Le bouillon BHIB, utilisé pour enrichir la croissance et le maintien nos souches bactériennes dans laboratoire.



Figure II.13: La gélose *Mueller Hinton* (MH)

### II.7.1. Evaluation de l'activité antibactérienne :

#### II.7.1.1. Le principe d'antibiogramme :

C'est une méthode essentielle en microbiologie, permettant de déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne à différents antibiotiques. Cette analyse quantitative est cruciale pour les cliniciens afin de choisir le traitement le plus efficace contre une infection bactérienne spécifique.

Nos objectifs de la réalisation d'un antibiogramme sont :

- L'identification de la sensibilité aux antibiotiques : L'antibiogramme permet d'identifier les antibiotiques auxquels une souche bactérienne donnée est sensible. Selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (*CASFM, 2012*).
- La sélection du traitement approprié : En connaissant la sensibilité de la bactérie, cela permet de choisir le traitement antibiotique le plus efficace pour combattre l'infection. Cela aide à optimiser les résultats thérapeutiques en ciblant spécifiquement les bactéries responsables de l'infection (*CASFM, 2023*).

#### II.7.1.2. La méthode de diffusion sur disques :

. La méthode de diffusion sur disque est utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des extraits d'*Azolla pinnata*. Les cultures bactériennes sont préparées et ajustées à une concentration standardisée. Le milieu *Mueller-Hinton* est ensemencé avec ces cultures, puis des disques imprégnés des extraits à tester sont placés sur la gélose. Après incubation, les zones d'inhibition autour des disques sont mesurées pour déterminer l'activité antibactérienne. Un antibiotique est utilisé comme contrôle positif. Les.

Cette méthode permet d'évaluer l'efficacité des différents extraits d'*Azolla pinnata* contre les souches bactériennes testées.

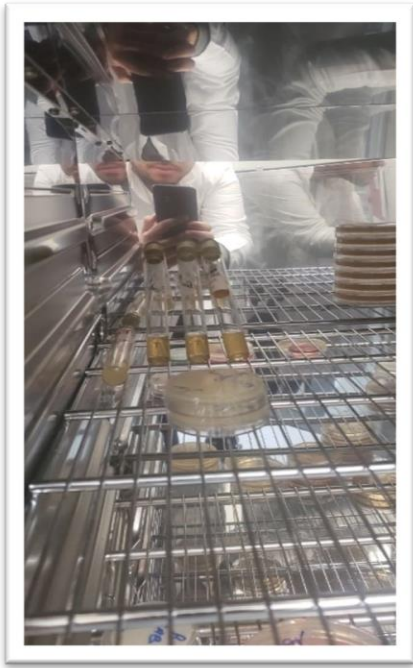


Figure II.14 : Des souches bactériennes en tubes BHIB dans un incubateur microbiologique.



Figure II.15 : Boîte pétrie avec quatre disques de contrôle antibactérien

## II.8. Valorisation des extraits bioactifs de l'*Azolla pinnata* comme antioxydants :

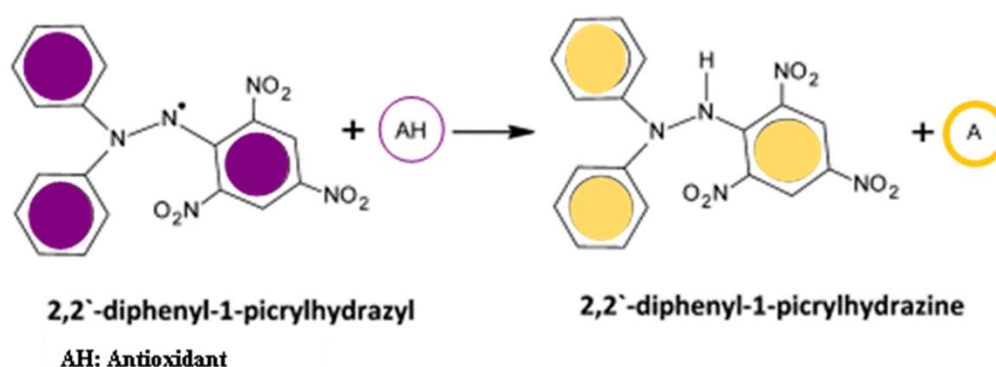
L'accumulation de radicaux libres dans l'organisme est associée à diverses pathologies chroniques, telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires. Les antioxydants sont des substances capables de neutraliser ces radicaux libres et de protéger les cellules contre leurs effets délétères.

La recherche de nouveaux antioxydants naturels est d'un intérêt croissant en raison des effets secondaires potentiels des antioxydants synthétiques. Les extraits bioactifs issus de sources naturelles, telles que l'*Azolla pinnata*, constituent une source prometteuse d'antioxydants naturels, dans notre étude on a testé le pouvoir anti-oxydant des extraits bioactifs d'*Azolla pinnata* pour la valorisation, on a passé par plusieurs procédures :

### II.8.1. Evaluation du pouvoir antioxydant :

#### II.8.1.1. Test DPPH :

Le test de piégeage du radical DPPH est une méthode couramment utilisée pour analyser l'activité antioxydante. Ce test est particulièrement adapté pour les dosages effectués en milieu alcoolique. Le DPPH est un radical libre stable qui agit comme accepteur d'électrons ou d'hydrogène. Cette méthode repose sur la réduction de la solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, ce qui entraîne la formation de la forme non radicalaire (DPPH-H). La présence de ces radicaux (DPPH\*) donne à la solution une coloration violet foncé. Lorsque ces radicaux sont réduits par un antioxydant, la solution se décolore et vire au jaune (DPPH-H) (Figure II.12). Ce changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm (Pyrznska et Pekal ,2013), permettant ainsi de déterminer le potentiel antioxydant des extrait d'*Azolla pinnata*.



**Figure II.16 :** Structure chimique du radical DPPH et sa réaction avec l'antioxydant (AH).

### II.8.1.2. Mode opératoire :

La méthode de piégeage des radicaux DPPH est utilisée pour évaluer l'activité antioxydante. Une solution de DPPH est préparée dans du méthanol.

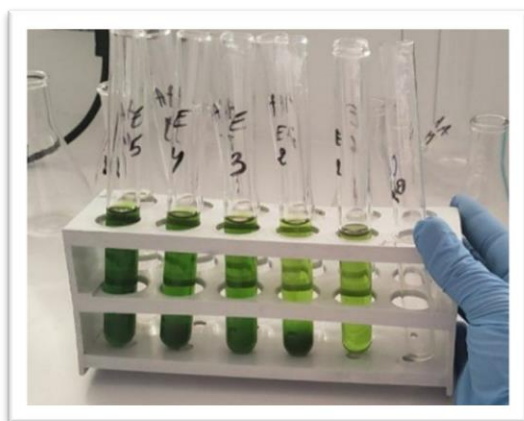
Différentes concentrations d'extrait alcoolique sont testées, mélangées avec la solution DPPH et du méthanol supplémentaire.

Un échantillon témoin est préparé sans extrait. Après incubation à l'abri de la lumière, l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie UV-Visible.

L'acide ascorbique sert de référence et est préparé dans les mêmes conditions.

Cette méthode permet de comparer l'activité antioxydante de l'extrait étudié à celle d'un antioxydant connu.

**On a appliqué cette méthode aux extraits préparés par macération et ultrasons dans les mêmes conditions opératoires afin d'évaluer leur activité antioxydante en vue d'une comparaison.**



**Figure II.17:** Tubes avec différentes concentrations d'extrait méthanolique.



**Figure II.18:** Tubes avec différentes concentrations d'acide ascorbique.

***CHAPITRE III***  
***Résultats***  
***et***  
***Discussions***

### III. Résultats et Discussions

Dans cette section, nous présenterons et interpréterons les résultats des divers dosages et analyses effectués pour évaluer la qualité biochimique de la matière sèche des Azollas récoltées, ainsi que le pouvoir antimicrobien et antioxydant de leurs extraits.

#### III. 1. Identification de l'espèce d'*Azolla* récoltée

*Azolla pinnata* est une petite fougère aquatique flottante qui vit en symbiose mutuelle avec une cyanobactérie (*Nostoc azollae*), laquelle réside beaucoup dans les eaux stagnantes comme les lacs.

La cyanobactérie peut fixer l'azote atmosphérique en ions ammonium, qui constituent une source d'azote pour la fougère aquatique. La décomposition ultérieure de la fougère aquatique enrichit le sol des rizières en azote et, en raison de son utilité en tant que biofertilisant azoté, l'*Azolla pinnata* est largement cultivée parmi les cultures de riz pour assurer un apport constant d'azote au sol (Mandakini et al., 2016).



Figure III.1 : Évolution de la biomasse d'*Azolla pinnata*

### III. 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 III.1 ci-dessous.

Tableau III.1: Composition biochimique des échantillons analysés d'*Azolla pinnata*.

Caractérisation	Présente étude/2g	Résultats		
		<i>Van Hove et al. (1995)</i>	<i>Alalade et al. (2006)</i>	<i>Adzman et al. (2022)</i>
<b>Humidité (%)</b>	<b>12.99</b>	-	-	6.38
<b>Cendres (%)</b>	<b>30.94</b>	10-20	16.2	14.39
<b>Lipides (%)</b>	<b>4.78</b>	3-6	2.7	6.37
<b>Protéines (%)</b>	<b>14.31</b>	51-58	21.4	27.1
<b>Glucides (%)</b>	<b>36.98</b>	3-5	47	45.86

#### III.2. 1. Détermination de teneur d'humidité :

Le teneur en humidité de la matière sèche a été trouvée égale à **12.99%**.

Il s'agit d'une valeur doublement supérieure à celle trouvée par *Adzman et al. 2022* (Tableau III.1) dans la matière séchée dans l'étuve.

#### II.2.2. Détermination de la teneur en cendre :

Les analyses effectuées ont révélé que l'*Azolla pinnata* renferme une teneur en cendres au voisinage de **30.94% /2g** qui est supérieure à celle trouvée par *Adzman et al. (2022)* (Tableau III.1).

### III.2.3. Détermination de la teneur en matière grasse :

**Tableau III.2 :** les résultats des échantillons d'Azolla pour la teneur en matière grasse

Échantillons	1	2
Teneur en matière grasse	10.16%	7.06%

On calcule la moyenne des deux échantillons pour trouver le teneur en matière grasse totale dans l'*Azolla pinnata* : **4.78% /2g**

Dans notre étude, nous avons trouvé une teneur en matière grasse de **4.78% /2g** de matière grasse totale dans l'*Azolla pinnata* .

Une valeur supérieure à celle trouvée par *Alalade et al. (2006)*, et avoisinant celle trouvée par *Van Hove et al. (1995)* entre 3 et 6%, mais elle reste inférieure à la valeur mentionnée par *Adzman et al. (2022)* (Tableau III.1).

La teneur en matière grasse dans les fougères aquatiques dépend de l'espèce et est affectée par des conditions de culture dans l'eau telles que les nutriments, la salinité, les périodes d'intensité lumineuse, la température, le pH et même l'association avec d'autres micro-organismes (Stengel et al., 2011).

### III.2.4. Détermination de la teneur en protéine :

**Tableau III.3 :** les résultats des échantillons d'Azolla pour la teneur en protéine.

Échantillons	1	2	3
la teneur en protéine	17.67%	8.79 %	16.49 %

On calcule la moyenne des deux échantillons pour trouver la teneur en protéine totale dans l'*Azolla pinnata* :**14.31 %**

Les protéines représentent un constituant essentiel dans les cellules. Ils jouent un rôle capital dans leur croissance, réparation ainsi que leur maintenance en plus d'être un régulateur des activités qui menace la cellule.

La teneur en protéines a été calculée par la méthode de Kjeldahl en utilisant le facteur de conversion de l'azote 6.25. La multiplication de la quantité d'azote trouvée par ce facteur, nous a donné une valeur de **14.31 % /2g** qui est nettement inférieure à celle rapportée par *Adzman et al. (2022)*, *Van Hove et al. (1995)* mais proche à celle trouvée par *Alalade et al., (2006)* (Tableau III.1).

### III.2.5. Détermination de la teneur en glucides :

Les volume prélevé à partir de la solution mère a été calculé selon la formule (7). On a trouvé respectivement les volumes suivant :2.5 ml, 5ml ,10ml, 12.5ml.

La concentration en glucide a été déterminée graphiquement (Figure III.2) après l'avoir été calculée selon la formule (8) ci-dessous:

$$[\text{Glucides}] \approx 0.01735 \text{ mg/ml}$$

On a calculé la teneur en glucide selon la formule (8.a) :

$$G\%=36.98\% /2g$$

Les glucides jouent un rôle essentiel dans *Azolla pinnata*, car ils constituent des éléments clés de la paroi cellulaire, assurant sa structure et sa rigidité. De plus, les glucides servent de réserve énergétique, permettant à la plante de survivre et de développer son système de défense, ce qui lui permet de résister dans diverses conditions environnementales (Mohnen et al.,1993).

Dans notre étude, nous avons trouvé un teneur en glucides d'environ **36.98% /2g** dans *Azolla pinnata*, qui est nettement supérieure à celle rapportée par de Van Hove et al. (1995). Cette valeur est cependant inférieure à celle rapportée par Alalade et al. (2006), et Adzman et al. (2022) (Tableau III.1) .

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

Le deuxième volet de notre étude a été consacré à l'étude de la possibilité d'utilisation des extraits bioactifs de la matière sèche de l'azolla comme des antibactériens et des antioxydants.

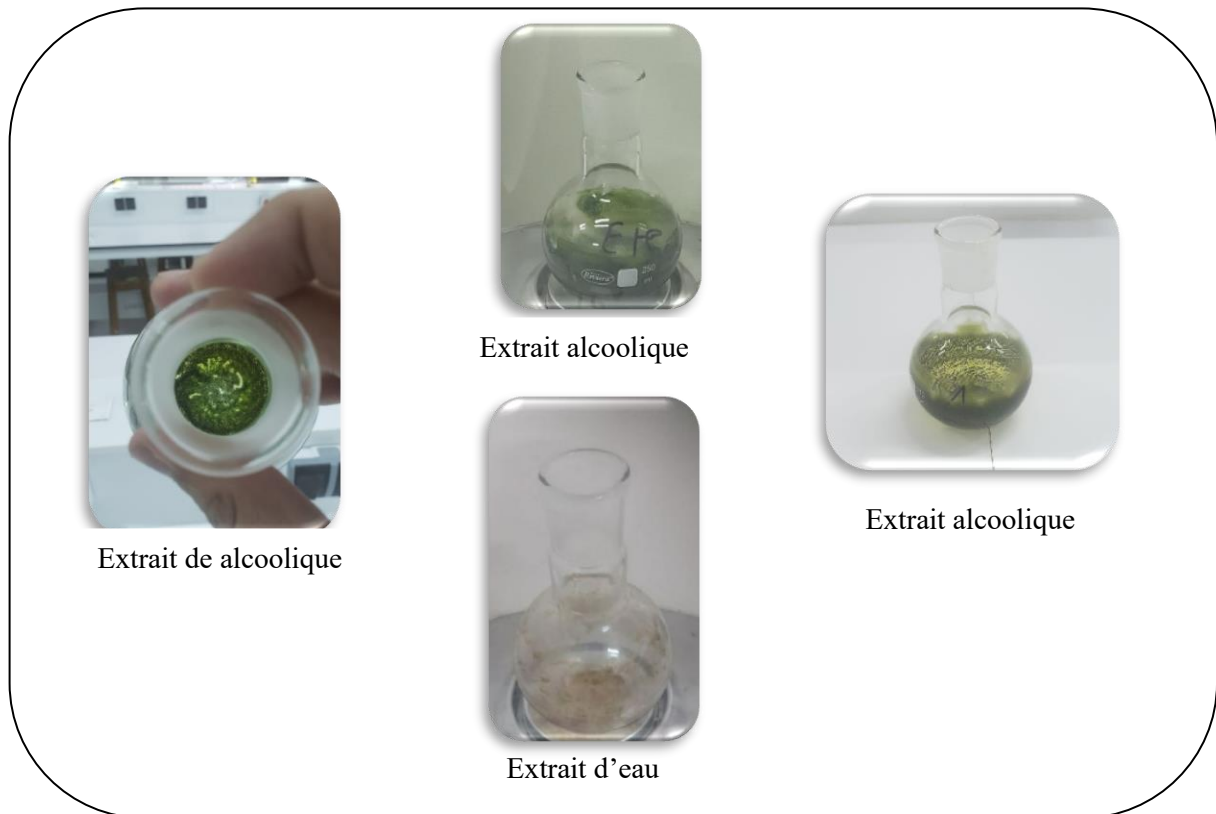
#### **III. 3.1. Extraction des composés bioactifs :**

L'extraction des composés bioactifs est une opération très délicate. Elle nécessite une procédure capable de décomposer la paroi cellulaire pour libérer les composés bioactifs contenus à l'intérieur, tout en minimisant les risques de les endommager. Pour cela, nous avons utilisé des solvants ayant la capacité de pénétrer la paroi cellulaire, avec une polarité adaptée aux molécules cibles. Deux méthodes d'extraction ont été mises en œuvre : la macération et le traitement par ultrasons.

##### **III. 3. 1. 1. Rendements des extractions :**

Les rendements d'extraction relatifs aux différents extraits du végétal exprimés en % g/g de matière sèche.

Les résultats de l'extraction par les deux méthodes et dans les différents solvants utilisés sont calculée selon la formule mentionnée dans le protocole. 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 alcoolique traité par ultrason 35.24 % (g/g), cependant, des valeurs plus faibles ont été notées pour l'extrait alcoolique 2 de l'ordre de 3.6 % (g/g) traité par macération. Ces résultats sont supérieurs à ceux trouvés par *Djamai et al. (2019)* pour prouver que le traitement par ultrason c'est une meilleure méthode d'extraction (Figure III.3).

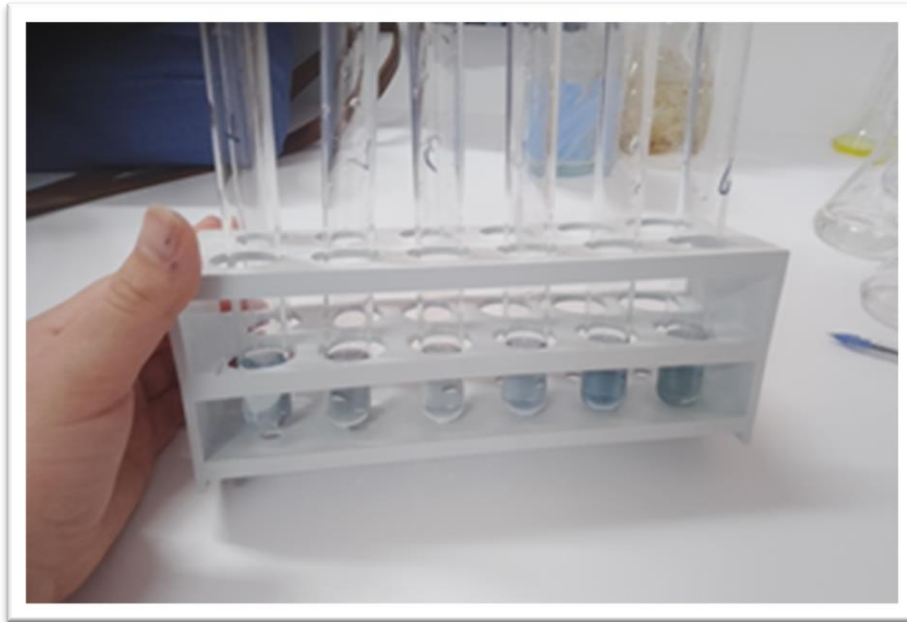


**Figure III.3 :** Photos des extraits après évaporation dans les différents solvants.

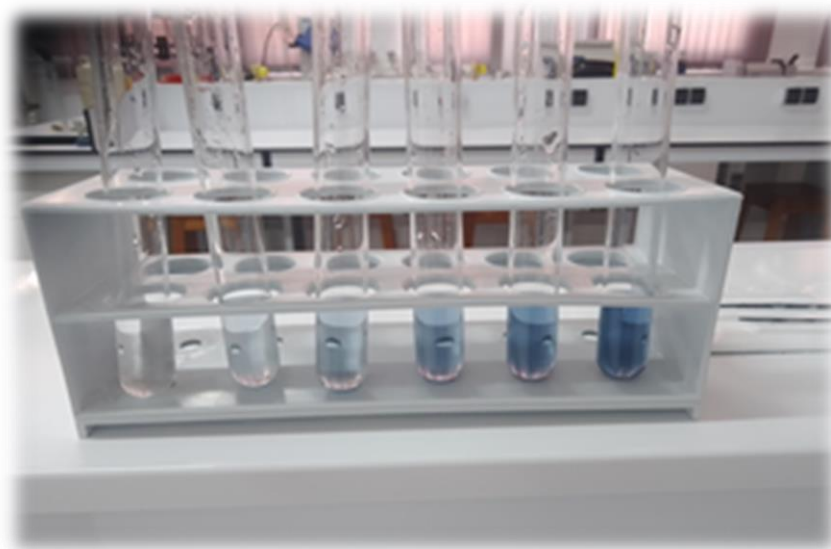
### III. 3. 1. 2. Dosage des polyphénols totaux :

Les composés phénoliques constituent le groupe principal qui contribue à l'activité antioxydante des végétaux, fruits, céréales et d'autres matériels à base de plantes (*Tachakittirungrod et al., 2007*). C'est la raison pour laquelle, le dosage des phénols totaux de notre plante a été effectué dans cette étude.

Dans le but de déterminer la teneur totale des phénols de l'*Azolla pinnata*, un dosage a été effectué au niveau de l'extrait brut de composés phénoliques par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est la plus utilisée pour déterminer la quantité totale des polyphénols solubles (Figure III.4 ; Figure III.6).



**Figure III.4 :** Tubes à essais révélant les résultats de dosage des polyphénols.



**Figure III.6 :** Photos des solutions de la gamme d'étalonnage d'acide gallique

Les polyphénols possèdent des propriétés antioxydantes importantes, leur concentration étant directement liée à l'activité antioxydante.

Les études comparatives entre différentes méthodes d'extraction et divers solvants ont révélé que la teneur en polyphénols varie significativement selon ces paramètres.

Généralement, le solvant le plus polaire s'est avéré le plus efficace pour extraire les polyphénols, que ce soit par ultrason ou par macération.

L'extraction par ultrason a donné des concentrations en polyphénols plus élevées que la macération pour tous les solvants testés.

Ces résultats soulignent que le contenu phénolique dans les extraits dépend à la fois de la polarité du solvant utilisé et de la méthode d'extraction employée.

Le solvant le plus efficace présente un pouvoir de solvation supérieur pour les composés phénoliques, favorisant ainsi leur extraction des matrices végétales (*Hatano et al., 1989*).

### **III. 3.2. Criblage phytochimique :**

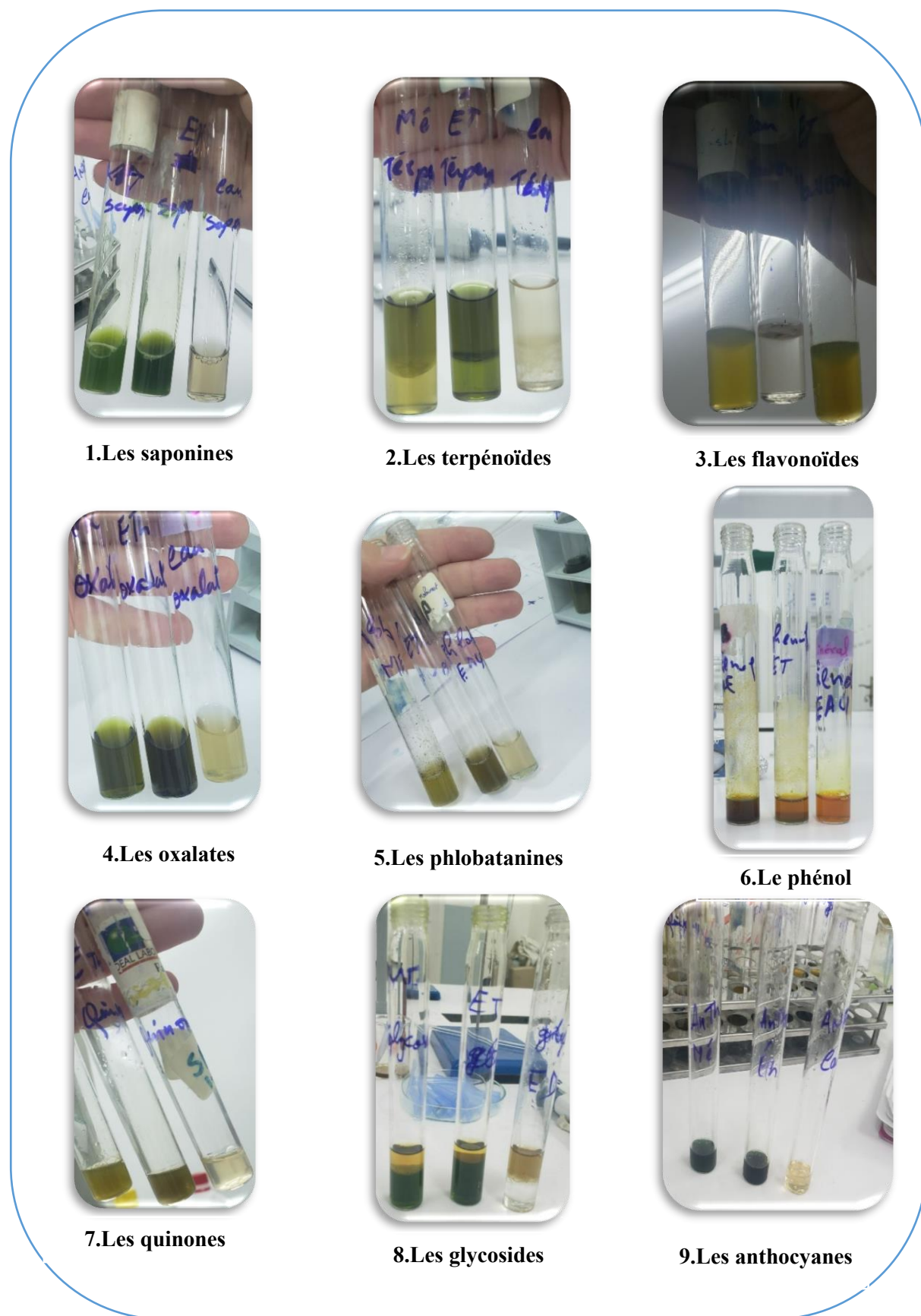
Une analyse phytochimique a été réalisée sur des extraits d'*A. pinnata* obtenus avec différents solvants, testant la présence de 9 composés phytochimiques.

Les résultats ont montré que certains composés, tels que les flavonoïdes, le phénol, les quinones et les saponines, étaient présents dans tous les extraits.

D'autres composés étaient présents dans certains extraits mais absents dans d'autres.

Enfin, quelques composés phytochimiques n'ont été détectés dans aucun des extraits testés.

Cette analyse a permis de mettre en évidence la variabilité de la composition phytochimique de la plante en fonction du solvant d'extraction utilisé. (Figure III.7).



**Figure III.7 :** Photos des résultats des différents tests de criblage phytochimique.

### III. 4. Evaluation de l'activité antibactérienne :

L'estimation du pouvoir inhibiteur des extraits d'*Azolla pinnata* par le diamètre d'inhibition (DI) est faite selon la classification rapportée par *Ponce, A. G., et al. (2003)*:

- Fortement inhibitrice lorsque :  $\varnothing \geq 28$  mm de la zone d'inhibition ;
- Modérément inhibitrice lorsque :  $28 \text{ mm} > \varnothing > 16$  mm de la zone d'inhibition ;
- Légèrement inhibitrice lorsque :  $16 \text{ mm} > \varnothing > 10$  mm de la zone d'inhibition ;
- Non inhibitrice lorsque :  $\varnothing < 10$  mm de la zone d'inhibition

. La souche *S. aureus* s'avère la plus sensible dans l'extrait éthanolique par rapport toutes le reste des extraits. Cette sensibilité est même plus élevée à celle connue à la ciprofloxacine (29mm). Cependant, représentent un problème de santé publique important. Elles touchent environ 1 à 10% des patients hospitalisés et sont responsables d'un nombre important de décès. Les patients à risque d'infections nosocomiales à *S. aureus* comprennent les personnes âgées, les immunodéprimées, les patients porteurs de cathéters intraveineux et les patients ayant subi des interventions chirurgicales majeures.

. Il est, avec *Escherichia coli*, le pathogène le plus fréquemment isolé dans la pathologie des pneumonies acquises sous ventilation mécanique.

Les concentrations des Extrait : éthanol : 14.4 mg/mL, méthanol : 36.6 mg/mL, eau distillée: 15.29 mg/ml

Les dilutions d'extrait 1/2 : éthanol : 12.2 mg/mL, méthanol : 18.3 mg/mL, eau distillée : 7.64 mg/mL.

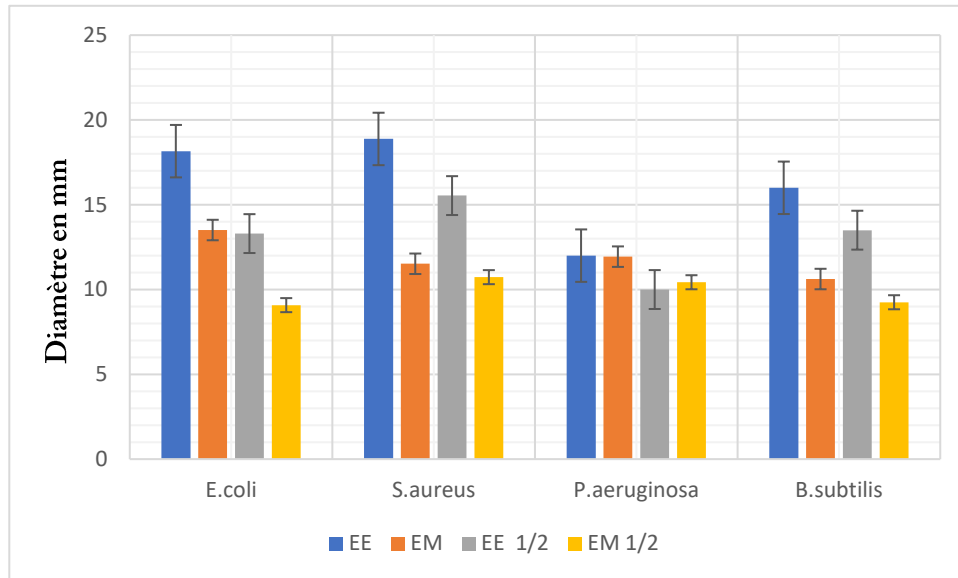
. Les extraits d'*Azolla pinnata* ont démontré une activité antibactérienne variable contre plusieurs souches bactériennes testées, notamment *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*. Les zones d'inhibition observées variaient généralement entre 10 et 15 mm de diamètre, indiquant une activité inhibitrice légère à modérée. L'efficacité des extraits différait selon le type de bactérie ciblée, avec certains extraits montrant une meilleure efficacité contre des souches spécifiques.

Les dilutions des extraits ont généralement maintenu une certaine activité antibactérienne, bien que parfois réduite par rapport aux extraits non dilués. Certaines dilutions ont montré une inhibition légère contre toutes les bactéries testées, tandis que d'autres n'ont été efficaces que contre certaines souches spécifiques. Il est important de noter que certains extraits et leurs dilutions n'ont pas montré d'activité inhibitrice significative contre certaines bactéries, les zones d'inhibition étant inférieures à 10 mm.

La concentration des extraits a joué un rôle important dans leur efficacité, avec des concentrations plus élevées produisant généralement des zones d'inhibition plus

importantes. L'efficacité relative des extraits variait selon les pathogènes, certains étant plus efficaces contre *S. aureus*, d'autres contre *P. aeruginosa*, par exemple.

Ces résultats sont cohérents avec d'autres études rapportées dans la littérature, notamment celle de Farook et al. (2019), confirmant le potentiel antibactérien d'*Azolla pinnata* contre divers pathogènes. Cependant, ces études soulignent également la variabilité de l'efficacité des extraits selon les conditions expérimentales, les méthodes d'extraction et les souches bactériennes testées..



**Figure III.8 :** Diamètre des zones d'inhibition avec les différentes concentrations de différents des extraits d'*Azolla pinnata*.

EE : Extrait éthanolique.

EM : Extrait méthanolique

### III. 5. Evaluation du pouvoir antioxydant :

Les valeurs de l'activité antioxydante in vitro des extraits méthanoliques d'*Azolla pinnata* des deux méthodes d'extraction (macération, ultrason) évaluées selon le test de DPPH sont exprimées en pourcentage d'inhibition (I%) du radical DPPH, calculé selon la formule (9). Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec l'acide ascorbique pris comme référence.

L'étude compare deux méthodes d'extraction de composés à activité antioxydante.

La méthode par ultrasons semble produire des extraits légèrement plus efficaces que la méthode par macération en termes d'inhibition.

Cependant, les deux méthodes montrent une bonne corrélation entre la concentration en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits obtenus.

L'activité d'inhibition des extraits augmente rapidement à faibles concentrations avant de se stabiliser à des concentrations plus élevées, contrairement au composé de référence qui maintient une activité constante sur toute la plage de concentrations étudiée.

IC<sub>50</sub> représente la concentration d'antioxydant requise pour réduire de moitié la concentration initiale du radical DPPH. Cette valeur est un indicateur important de l'efficacité antiradicalaire : plus l'IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antiradicalaire de l'extrait est élevée. Pour déterminer l'IC<sub>50</sub>, on trace une courbe montrant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait.

D'après nos résultats, l'extrait méthanolique d'*Azolla pinnata* présente un pouvoir antioxydant significatif, avec une inhibition moyenne du radical DPPH pour l'extraction par macération et par ultrason. Les polyphénols et les polysaccharides présents dans les extraits sont probablement responsables de cette activité antioxydante. Ces résultats sont cohérents avec les études antérieures, telles que celle de *Quiroz-Reyes et al., 2013* qui ont montré que l'extraction par ultrason est plus efficace que la macération traditionnelle pour extraire des composés antioxydants, entraînant ainsi une activité antioxydante plus élevée.

# *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 humidité, en cendre, en matières grasses, en protéines et en glucides. Les extractions des composés bioactifs obtenus par la suite, ont été testés en termes du pouvoir antibactérien antioxydant.

Les résultats de la composition biochimique des échantillons analysés ont montré un taux d'humidité au voisinage de 12.99 %. Notre végétal renferme un taux de cendres de 30.94%/2g ; une teneur en matière grasse de 4.78 % /2g ; une teneur en protéines de 14.31 % et un taux de glucides au voisinage de 36.98%. 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, la saison de culture, etc.).

En 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 alcoolique (35,24 % (g/g) obtenu en utilisant l'extraction par ultrason. Cependant, des valeurs plus faibles ont été notées pour l'extrait alcoolique 2 de l'ordre de 3.6 % (g/g) obtenu à partir de l'extraction par macération.

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. Les résultats des extractions des composés bioactifs ont prouvées que l'activité antioxydante de l'extrait d'Azolla et que l'augmentation de la réduction du DPPH est proportionnelle aux concentrations utilisées de nos extraits.

En outre, l'Azolla est dotée d'une activité antibactérienne sur les souches bactériennes testées surtout sur *staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* qui ont montré une grande sensibilité envers l'extrait alcoolique 2. Ce qui permet leur utilisation éventuelle dans les domaines pharmaceutique et cosmétique.

Ce travail nous a permis de constater l'apport que peut avoir l'étude des différentes possibilités de valorisation des Azollas pour les utiliser comme sources des produits d'intérêt dans les différents secteurs économiques.

Des études supplémentaires sont toutefois 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 pharmaceutique et cosmétique.

*Références*  
*Bibliographiques*

**Références Bibliographiques :**

- **AFNOR (1985)**. Recueil de normes françaises. Méthodes d'analyses françaises et communautaires. Aliments des animaux. 2e Édition. p.p.47-170.
- **Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Olalere, O. A. (2018)**. Ethanolic extraction of bioactive compounds from *Vernonia amygdalina* leaf using response surface methodology as an optimization tool. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(2), p.p.1107-1122.
- **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. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), p.p.253-261.
- **Alcántara, C., Žugčić, T., et al., (2020)**. Effects of ultrasound-assisted extraction and solvent on the phenolic profile, bacterial growth, and anti-inflammatory/antioxidant activities of Mediterranean olive and fig leaves extracts. *Molecules*, 25(7), p.1718.
- **Alalade, O. A., & Iyayi, E. E. (2006)**. Chemical composition and the feeding value of Azolla (*Azolla pinnata*) Meal for egg-type chicks. *International Journal of Poultry Science*, 5(2), p.p.137-141.
- **AOAC (1995)**. Official methods of analysis. Washington, DC, USA: Association of official analytical chemists.
- **Ali, H. E. A., Shanab, S. M. M., et al., (2014)**. Evaluation of antioxidants, pigments and secondary metabolites contents in *Spirulina platensis*. *Applied Mechanics and Materials*, 625, p.p.160-163.
- **Anitha, K. C., Rajeshwari, Y. B., et al., (2016)**. Nutritive evaluation of Azolla as livestock feed. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 4(6), p.p.671-674.
- **Azhari, N. A. A., Shamsudin, et al., (2020)**. Effect of different drying methods on physical properties of *Azolla pinnata* powder. *Advances in Agricultural and Food Research Journals*, 1(1), p.p.1-10.
- **Adzman N., S. J. Goh, A. et al., 2022**« Preliminary study on Azolla cultivation and characterization for sustainable biomass source », *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 2259, n° 1, p. 012018.
- **Ben Khedir, S., Mounir, et al., (2014)**. Effect of extraction solvents and enzyme treatments on polyphenolic compounds and antioxidant activity of date by-products. *Food Chemistry*, 157, p.p.116-123.
- **Blois, M. S. (1958)**. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, p.p.1199-1200.
- **Boizot, N., & Charpentier, J. P. (2006)**. Dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu. *Analyses, Techniques & Laboratoires*, 40(2), p.p.5-10.

- **Bornette, G., & Puijalon, S. (2011).** Response of aquatic plants to abiotic factors: a review. *Aquatic Sciences*, 73(1), p.p.1-14.
- **BHUJEL A.K, RIZAL G.M. (2022).** EXPLORING USE OF AZOLLA AS THE POTENTIAL LIVESTOCK FEED RESOURCES – A Reviews, *Bhutan Journal of Animal Science* (pp. 41-47).
- **Brouwer, P. (2018).** Growing Azolla to produce sustainable protein feed: the effect of differing species and CO2 concentrations on biomass productivity and chemical composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(12), p.p.4759-4768.
- **Bouchouka, M. (2016).** Etude de l'activité antioxydante et des composés phénoliques de feuilles de *Moringa peregrina* L. *European Journal of Medicinal Plants*, 6(2), 50-57.
- **Chambers, P. A., Lacoul, P., et al., (2008).** Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. *Hydrobiologia*, 595(1), p.p.9-26.
- **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). (2012).** Recommandations pour les antibiogrammes. [en ligne]. [Consulté le 17/juin / 2013] disponible sur le web :<https://www.sfm-microbiologie.org/>.
- **Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). (2023).** Recommandations pour l'antibiogramme et l'interprétation de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Version 2023. Société Française de Microbiologie. [en ligne]. [Consulté le 21/mai / 2024] disponible sur le web :<http://www.sfm-microbiologie.org/>
- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2009).** Normes de performance pour les tests de sensibilité aux antimicrobiens par disque; Norme approuvée - Dixième édition. Document CLSI M02-A10. Wayne, PA : Clinical and Laboratory Standards Institute.
- **Dhir, B. (2018).** Role of Ferns in Environmental Cleanup. In H. Fernández (Ed.), *Current Advances in Fern Research* (pp. 517-531). Cham: Springer International Publishing.
- **Djamai, W. (2019).** Valorisation des microalgues par extraction et séparation des molécules bioactifs. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen. Faculté des sciences, Algérie.
- **Du Bois, M., Gilles, K. A., et al., (1956).** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), p.p.350-356.
- **Dissou D. A., 2013** « Superviseurs : Prof ANAGONOU Séverin ».
- **Elrasoul, S. A., Ibrahim, D. A., et al.,(2020).** Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects of *Azolla pinnata* ethanolic extract against lead-induced hepatotoxicity in rats. *Antioxidants*, 9(10), p.1014.
- **Ergüden, B. (2021).** Phenol group of terpenoids is crucial for antibacterial activity upon ion leakage. *Letters in Applied Microbiology*, 73(4), p.p.438-445.

- **Farook, M. A., Muthu Mohamed, et al.,(2019).** Phytochemical screening, antibacterial and antioxidant activity of *Azolla pinnata*. *International Journal of Research and Analytical Reviews*, 6(2), p.p.373-378.
- **Guimarães, A. C., Machado, K. B., et al., (2019).** Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*, 24(13), p.2471.
- **Hatano, T., Okuda, T., & Yoshida, T. (1989).** Relation between phenolic content and antioxidant activity in extracts of medicinal plants. *Journal of the American Chemical Society*, 111(15), p.p.3477-3482.
- **Jacob, M. M., Jom, M., Sherin, A., & Shahla, B. (2020).** *Azolla pinnata*: Potential phytoremediation, antimicrobial, and antioxidant applications. *Letters in Applied NanoBioScience*, 9(4), p.p.1673-1679.
- **Kris-Etherton, P. M., et al. (2002).** Bioactive compounds in food: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113(9B), p.p.71S-88S.
- **Kumar, M., Verma, et al., (2017).** Ultrasound assisted extraction of polyphenols from *Azolla pinnata* and evaluation of their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Food Science and Technology*, 54(10), p.p.3265-3272.
- **Lacoul, P., & Freedman, B. (2006).** Environmental influences on aquatic plants in freshwater ecosystems. *Environmental Reviews*, 14(2), p.p.89-136.
- **Lejeune, A., Peng, J., et al., 2000).** Carotene content of *Azolla* and its variations during drying and storage treatments. *Animal Feed Science and Technology*, 84(3-4), p.p.295-301.
- **Leavitt P. R., D. L. Findlay, et al., (1999)** « Algal responses to dissolved organic carbon loss and pH decline during whole-lake acidification: Evidence from paleolimnology », *Limnol. Oceanogr.*, vol. 44, n° 3part2, p.p. 757-773.
- **Mandakovic, D., Giagnoni, L., et al., (2020).** Bioremediation: Degradation of synthetic organic dyes by *Azolla-Anabaena* symbiotic association. *Journal of Hazardous Materials*, 382, p.121024.
- **Ming, L., Thakur, et al., (2010).** Water management in aquaponic systems: A review. *Aquacultural Engineering*, 43(1), p.p.1-15.
- **Moura, F. R. D., Rodrigues, E., & Mercadante, A. Z. (2013).** Carotenoids from the flowers of *Tropaeolum majus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), p.p.6657-6664.
- **Mandakini, L.L.U., Bandara, N.J.G.J., & Gunawardana, D. (2016).** Étude du potentiel de phytoremédiation de l'*Azolla pinnata* dans des conditions de laboratoire. *Tropical Agricultural Research*, 28(1), p.p.1-8.

- **Mandakini, L. L. U., Bandara, N. J. G. J., & Gunawardana, D. (2016).** A study on the phytoremediation potential of *Azolla pinnata* under laboratory conditions. *Journal of Tropical Forestry and Environment*, Vol 6, no 01 p.p. 36-49.
- **Mohnen, D., & Hahn, M. G. (1993).** Cell wall carbohydrates as signals in plants. *Seminars in cell biology*, 4(2), p.p.93-102.
- **Mithraja, M. J., Antonisamy, J. M., et al., (2011).** Phytochemical studies on *Azolla pinnata* R. Br., *Marsilea minuta* L. and *Salvinia molesta* Mitch. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), p.p.S26-S29.
- **Ponce, A. G., Fritz, R., et al., (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), p.p.679-684.
- **Pyrzynska, K., & Pękal, A. (2013).** Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. *Analytical Methods*, 5(17), p.p.4288-4288.
- **Pryer, K. M., Schneider, H., et al.,(2001).** Horsetails and ferns are a monophyletic group and the closest living relatives to seed plants. *Nature*, 409(6820), p.p.618-622.
- **Park, H .,Choi,J., Chung,H.,(1998)** The Antioxidant Activity in Extracts of *Symphocladia latiuscula*. *J.Korean Fish. Soc*, 31(6), p.p.927-932.
- **Quiroz-Reyes, C. N., Aguilar-Méndez, et al., (2013).** Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*,12(1), p.p.11-18.
- **Raja, W., Rathaur, P., et al., (2012).** *Azolla*: an aquatic pteridophyte with great potential. *International Journal of Research in Biological Sciences*, 2(2), p.p.68-72.
- **Rokhsar, D. S., Palmer, et al., (2010).** Comparative and Functional Genomics of Eukaryotic Phytoplankton. *Science*, 328(5974), p.p.435-438.
- **Rai, P.K., Rai, S., et Kumar, A. (2016).** Effect of Drying Methods on the Nutrient Composition of *Azolla pinnata*. *National Academy Science Letters*, 39(5), p.p.359-362.
- **Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, p.p.152-178.
- **Stengel D. B., S. Connan, et Z. A. Popper, (2011)** « Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application », *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, n° 5, p.p. 483-501.
- **Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977).** Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1),p.p. 49-55.

- **Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J , et al., (2004).** Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.* 85: 439–444.
- **Shiomi, N., & Kitoh, S. (2001).** Culture of *Azolla* in a pond, nutrient composition, and use as fish feed. *Soil science and plant nutrition*, 47(1), p.p.27-34.
- **Sumazian, Y., Syahida, A., et al., (2010).** Antioxidant activities, flavonoids, ascorbic acid and phenolic contents of Malaysian vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(10), 881-890.
- **Sharma P., P. Biswas, et al., (2023)** « Biofuel production, study & characterisation from macro-algae (*Azolla pinnata*) », *Braz. J. Sci.*, vol. 2, no 3, p.p. 75-81.
- **Sharpe J. M., K. Mehlreter, et L. R. Walker, (2010)** « Ecological importance of ferns », in *Fern Ecology*, 1<sup>re</sup> éd., K. Mehlreter, L. R. Walker, et J. M. Sharpe, Éd., Cambridge University Press, p.p.1-21
- **Shirazi, S. A., Abdollahipoor, B., et al., (2019).** Effects of dual-alcohol gasoline blends on physiochemical properties and volatility behavior. *Fuel*, 252, p.p.542-552.
- **Singleton V.L, J.R.Rossi, 1965,** "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic – phosphothungstic acid" *Am. J. Enol. Vitic*, Vol. (16), p. 144.
- **Sood, A., Uniyal, P. L., et al., (2012).** Phytoremediation Potential of Aquatic Macrophyte, *Azolla*. *AMBIO*, 41(2), p.p.122-137.
- **Tachakittirungrod, S., Phuakamran, T., & Suntornsuk, W. (2007).** Antioxidant and antibacterial properties of extracts from *Kaempferia parviflora*. *Fitoterapia*, 78(5), p.p.417-427.
- **Tchi, N., M'hamed, R., et al.,2013).** Ultrasound assisted extraction and characterization of phenolic compounds from olive leaves. *Food and Nutrition Sciences*, 5(12), p.p.1875-1884.
- **Uchida, H., Yasumoto, T., & Yoshida, T. (1994).** Kinetics and mechanism of antioxidant action of sesamol and related compounds. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 58(8), p.p.1585-1591.
- **Van Hove C. (1995).** L'intégration de l'Azolla dans le système agropiscicole à Madagascar. *Proceeding du séminaire l'Aménagement des écosystèmes agro-piscicoles d'eau douce en milieu tropical*, Belgique : Académie royale des sciences d'outre-mer, pp 403-411.
- **Wagner, G. M. (1997).** *Azolla: A Review of Its Biology and Utilization*. *Botanical Review*, 63(1), p.p.1-26.
- **Wagner, H. (1988).** *Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas*. *Springer-Verlag*, p.p.130-155.
- **Yan, X., & Chen, S. (2004).** Dynamics of Photosynthetic Efficiency and Antioxidant Activity in *Azolla*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(9), p.p.859-864.

- **Institut Pasteur. (n.d.). Staphylocoque doré.** [en ligne]. [Consulté le 26/juin / 2024] disponible sur le web :<https://phototheque.pasteur.fr/fr/asset/keyword/4329/infection-nosocomiale/reset/1>.
- **Wikipédia. (n.d.). Fern.** In Wikipedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/Fern>
- **Bacillus subtilis.** WebMD. (n.d.). Retrieved from <https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-1694/bacillus-subtilis>
- **Bacillus subtilis strain QST 713.** SAGE Pesticides. (n.d.). Retrieved from <https://www.sagepesticides.qc.ca/Recherche/RechercheMatiere/DisplayMatiere?MatiereActiveId=501>
- **Manuels MSD. (n.d.). Infections à Escherichia coli (E. coli). Les faits en bref - Infections bactériennes - Bactéries Gram-négatives.** Récupéré le [date de consultation], de [https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/les-faits-en-bref-infections/infections-bact%C3%A9riennes-bact%C3%A9ries-gram-n%C3%A9gatives/infections-%C3%A0-escherichia-coli-ecoli?query=infections%20par%20escherichia%20coli#Quelles-sont-les-causes-des-infections-%C3%A0-E.-coli-?\\_v34973981\\_fr](https://www.msdmanuals.com/fr/accueil/les-faits-en-bref-infections/infections-bact%C3%A9riennes-bact%C3%A9ries-gram-n%C3%A9gatives/infections-%C3%A0-escherichia-coli-ecoli?query=infections%20par%20escherichia%20coli#Quelles-sont-les-causes-des-infections-%C3%A0-E.-coli-?_v34973981_fr)
- **MSD Manuals. (n.d.). Escherichia coli infections.** Retrieved June 26, 2024, from <https://www.msdmanuals.com/home/infections/bacterial-infections-gram-negative-bacteria/escherichia-coli-infections>
- **Merck & Co., Inc. (n.d.). Staphylococcus aureus infections.** MSD Manual Consumer Version. Retrieved June 26, 2024, from <https://www.msdmanuals.com/home/infections/bacterial-infections-gram-positive-bacteria/staphylococcus-aureus-infections>

# *Annexes*

# *Annexes 1*



**Figure a :** Préparation de la matière sèche de l'*Azolla pinnata*



**Figure b :** Creuset contenant la poudre d'*Azolla* pesé et placé dans l'étuve pour le séchage.



**Figure c :** Creuset contenant la poudre d'*Azolla* placée dans l'étuve pour la calcination.



**Figure d :** Concentration de l'extrait par l'évaporateur rotatif.



**Figure e :** Extraction de lipides d'*Azolla pinnata* à l'aide d'un appareil Soxhlet.



**Figure f :** Refroidissement des tubes dans l'eau à 20°C.



**Figure i :** Distillation du mélange réactionnel par le Kjeldahl.

## ***Annexes 2***

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل

École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme

D'Ingénieur et du Master en sciences de la mer

Option : Biotechnologie Marine

Thème :

**Culture et exploitation d'*Azolla pinnata***

Soutenu dans le cadre de l'arrêté ministériel 1275

Présenté par : MILAT Aziz et CHAYANI Ilham

Soutenu le 11 / 07 / 2024, devant le jury composé de :

Mme BENTCHIKOU Latifa

Maitre-Assistante A

Promotrice

ENSSMAL

# Carte d'information

## 1- Équipe d'encadrement :

<b>Encadrant principal</b>	<b>Spécialité</b>
BENTCHIKOU Latifa	Génie des Procédés

## 2- Équipe de projet :

<b>Nom d'étudiant(e)s</b>	<b>Faculté</b>	<b>Spécialité</b>
CHAYANI Ilham	École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral	Biotechnologie Marine
MILAT Aziz		

# Table des matières

## **L'élaboration du BMC**

### **Présentation du projet**

1. L'idée de projet
2. Les Valeurs suggérées
3. L'équipe
4. Les Objectifs du projet
5. Le planning de réalisation du projet

### **Aspects innovants du projet**

La nature d'innovations

### **Analyse stratégique du marché**

1. Marche potentiel
2. Marche cible
3. Raisons du choix de ce marché cible
4. Possibilité de conclure des contrats d'achat avec certains clients importants
5. La mesure de l'intensité de la concurrence
6. La stratégie marketing.
7. Relations clients
8. Canaux de distribution

### **Plan de production et organisation**

1. Le processus de production
2. L'approvisionnement
3. La main d'œuvre
4. Les principaux partenaires
5. Les activités clés

### **Plan financier**

1. Coûts et charges d'installation
2. Coûts et charges de Production Mensuels
3. Quantité de Production et Prix de Vente
4. Les comptes de résultats escomptés
5. Fonds de Roulement

### **Prototype expérimental**

## Liste des tableaux

Tableau (1) : les coûts et les charges d'installation

Tableau (2) : les couts des charges de production mensuels

Tableau (3) : les quantités et les prix de vente journalière

Tableau (4) : le chiffre d'affaires annuel

Tableau (5) : Résultats brut Annuel

Tableau (6) : Fonds de roulement (pour 2 mois de production)

## **L'élaboration du BMC**

Pour l'élaboration du BMC de notre projet, on a suivi une formation sur le BMC

Des sessions de formation sur le BMC ont eu lieu au niveau de l'incubateur "Blue Start" de notre école ENSSMAL, Elles nous ont permis d'approprier l'outil managérial en question et assimiler ses principes. Cette formation étalée du mois d'avril 2024 au 01/06/2024, nous a donné la possibilité d'orienter nos enquêtes qui se faisaient en parallèle et d'apporter des éléments de réponses à nos questionnements.

Divers aspects de l'entrepreneuriat ont été explorés et appliqués à notre étude de cas, incluant le comportement entrepreneurial, la gestion de projet, la gestion financière, les propriétés intellectuelles, le label projet innovant, ainsi que le marketing et l'analyse du marché.

## Présentation du projet

### 1. Idée du projet

L'idée de ce projet a germé dans le cadre du projet de fin d'études. En étudiant les propriétés bioactives d'une plante présentant un fort potentiel agronomique l'Azolla, nous avons découvert ses richesses en vitamines, protéines et acides aminés. Cette découverte a ouvert la voie à l'exploration de son utilisation comme source alternative et durable d'alimentation animale.

Donc notre projet consiste à cultiver l'*Azolla pinnata*, dans une serre en vue de sa commercialisation.

**Domaine d'activité : Agriculture**

**Code d'activité : 107608**

**Statut juridique : SARL**

**Nom commercial : AZOLLACEA**



## 2. Les Valeurs suggérées

Produit locale, présent une durabilité, performance nutritionnelle, impact positif sur la santé animale.

Conception et qualité : Garantir un produit de qualité supérieure, répondant aux besoins des animaux et aux attentes des clients.

L'azolla présente de nombreuse valeur :

- Peu exigeant, facile à multiplier, cultiver et entretenir.
- L'Azolla humide contient 94 à 96 % d'eau, 20 à 30 % de protéines en poids sec, 2,5 à 3,0 % de potassium, 0,5 à 1,5 % de calcium et 1,0 à 1,2 % de magnésium. à 1,5% de zinc et de cuivre, de 0,5 à 1% de phosphore, de 3 à 3,5% de matières grasses, de 4 à 5 d'azote, de 8,0 à 10% de fibres, en plus des vitamines A, B12, antitoxines, antioxydants, stimulateurs de croissance , antifongiques, et des antimicrobiennes.
- Croissance rapide et très importante. Forte capacité de multiplication. L'*Azolla* peut doubler de biomasse en 5 à 10 jours.

Voici des photos qui montrent la consommation d'*Azolla* par les animaux



### **3. Equipe de travail**

L'équipe de travail est constituée de :

BENTCHIKOU Latifa

- ✓ Enseignante/ Chercheur
- ✓ Magister, Procédés chimiques et environnement
- ✓ A encadrer et suivi les étudiantes dans la réalisation de l'idée de projet

CHAYANI Ilham :

- ✓ Etudiante en 3ème année 2ème cycle
- ✓ Spécialité Biotechnologie Marine
- ✓ A suivi la formation sur l'entrepreneuriat et création d'entreprise dans l'incubateur BlueStart de l'ENSSMAL

MILAT Aziz :

- ✓ Etudiante en 3ème année 2ème cycle
- ✓ Spécialité Biotechnologie Marine
- ✓ A suivi la formation sur l'entrepreneuriat et création d'entreprise dans l'incubateur BlueStart de l'ENSSMAL

### **4. Objectifs du projet**

Le projet vise à commercialiser l'*Azolla*, pour remplacer les ingrédients importés coûteux et polluants dans l'alimentation animale et l'agriculteur

### **5. Le planning de réalisation du projet**

Les tâches / Mois	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Étude préalable : préparation des documents nécessaires	<b>X</b>											
Commande des équipements	<b>X</b>											
Construction d'un siège de production		<b>X</b>										
Installation des équipements		<b>X</b>										
Achat de matières premières			<b>X</b>									
Réalisation du projet et la production				<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>

## Aspects innovants du projet

### Nature d'innovant

Le projet présenté dans le cadre de notre BMC ne présente pas un aspect innovant ; il s'agit donc d'un projet de micro-entreprise.

## Analyse stratégique du marché

### 1. Marché potentiel

Le marché potentiel de cette plante dépendra de la demande pour des alternatives durables et économiques dans l'agriculture, ainsi que de l'adoption par les agriculteurs et les éleveurs pour améliorer la productivité tout en minimisant les impacts environnementaux.

- **Demande croissante pour des solutions durables** : Avec l'accent accru sur l'agriculture durable et la réduction des intrants chimiques, *Azolla* représente une alternative attrayante en tant qu'engrais vert naturel. Sa capacité à fixer l'azote atmosphérique et à améliorer la fertilité du sol peut attirer les agriculteurs cherchant à améliorer leur rendement de manière écologique.
- **Utilisation dans l'alimentation animale** : *Azolla* est également utilisée comme complément alimentaire aux animaux (bétail, volaille, poissons...) en raison de sa richesse en protéines, vitamines et minéraux. La demande pour des sources alternatives de protéines végétales dans l'alimentation animale pourrait stimuler son utilisation à plus grande échelle.
- **Potentiel pour la bioénergie** : En tant que biomasse à croissance rapide, *Azolla* peut être explorée pour la production de biocarburants ou d'autres formes de bioénergie, contribuant ainsi à diversifier les sources d'énergie renouvelable.
- **Domaine de recherche** : Des efforts continus de recherche et de développement pour améliorer la culture, la récolte et l'utilisation d'*Azolla* pourraient ouvrir de nouvelles applications et marchés, notamment dans les industries pharmaceutique, cosmétique et alimentaire.

### 2. Marché cible (le segment)

Pour le lancement initial du projet, le marché cible local est :

- ✓ Les agricultures (en tant qu'engrais vert naturelle).
- ✓ Les éleveurs des animaux (en tant qu'aliment).

### **3. Raisons du choix de ce marché cible**

- **Fort potentiel de croissance** : La demande pour des aliments de haute qualité et durables dans ces segments est en augmentation.
- **Retour sur investissement rapide** : La croissance rapide de l'*Azolla* permet de répondre rapidement aux besoins alimentaires des volailles et des poissons, assurant ainsi un retour rapide sur investissement.
- **Études et preuves existantes** : De nombreuses études montrent les bénéfices de l'*Azolla* dans l'alimentation des animaux, ce qui facilite la mise en place et la démonstration des avantages à ces segments de marché.

Des études scientifiques ont démontré les effets bénéfiques de l'*Azolla* sur la performance des animaux d'élevage. L'incorporation de 1,5 à 2 kg d'*Azolla* dans les aliments concentrés a entraîné une augmentation globale de la production laitière de 15 à 20%.

Dans le cas des poulets de chair, l'ajout de 40% d'*Azolla* à leur alimentation a eu un impact positif sur leurs performances zootechniques (poids moyen) sans altérer leurs paramètres biochimiques, et augmente la production d'œufs de 20 % pour les Poules pondeuses.

**Fixation d'azote** : *Azolla* a une relation symbiotique avec une cyanobactérie qui lui permet de fixer l'azote atmosphérique. En intégrant *Azolla* dans les systèmes agricoles, elle enrichit le sol en azote disponible pour les cultures suivantes, réduisant ainsi le besoin d'engrais azotés synthétiques et les coûts associés.

Elle est largement utilisée comme engrais vert dans les systèmes de riziculture, en particulier en Asie du Sud-Est. Dans certaines régions, elle est intégrée dans les pratiques agricoles traditionnelles et est couramment utilisée pour améliorer la fertilité du sol et augmenter les rendements de riz.

### **4. Possibilité de conclure des contrats d'achat avec certains clients importants**

Pour maximiser la réussite du projet, il est essentiel d'identifier et de conclure des contrats d'achat avec des clients clés dans les segments cibles. Voici une stratégie pour y parvenir :

#### **1/ identifier les clients :**

**Les producteurs des animaux** : Entreprises possédant des fermes des animaux (volaille, bétail, poisson) à grande échelle. Ces producteurs cherchent souvent à améliorer la santé de leurs animaux.

**Distributeurs d'aliments pour les animaux** : Entreprises spécialisées dans la fourniture des aliments, qui pourraient intégrer l'*Azolla* dans leurs produits.

#### **2/ Sensibilisation :**

En mettant en avant les avantages de l'*Azolla pinnata* et en offrant des incitations attractives pour encourager l'adoption.

#### **3/ Réduction de prix**

Dans l'achat plus de 10kg, le prix devient 600DA /kg

## **5. La mesure de l'intensité de la concurrence**

D'après nos recherches, les concurrents les plus importants sur le marché local qui produisent l'*Azolla* sont classés selon leur part de marché comme suit :

Concurrence directe : moyenne, peu d'acteurs proposent la vente d'*Azolla*.

Concurrence indirecte : Forte, marché des aliments pour les animaux dominés par les produits importés aussi le marché des engrais chimique présente un potentiel significatif.

## **6. La stratégie marketing**

C'est l'ensemble des techniques utilisées afin de sensibiliser les clients potentiels à acheter nos produits.

Dans la commercialisation de nos produits, nous appuyons sur une stratégie de commercialisation à des prix compétitifs grâce à notre contrôle de la réduction des coûts. Et on a directement basé sur la stratégie de marketing mix (Produit, Prix, Places, Promotion).

## **7. Relations Clients :**

- Les réseaux sociaux (Facebook, instagram...) recueillir régulièrement les commentaires des clients
- Service après-vente (s'assure que les clients sont satisfaits)
- Des remises et des cartes de fidélité  
Dans l'achat plus de 10kg, le prix devient 600DA /kg

## **8. Canaux de distribution**

- Les réseaux sociaux (Facebook, instagrame)
- Les publicités
- La livraison de produit
- Participation à des salons et des évènements agriculture
  - ✓ SIPSA FILAHA (26-29/05/2025),
  - ✓ AGRIPRO EXPO ORAN (du 29/01 au 01/02/2025)
  - ✓ AGROPACK EXPO (du 11 au 14/02/2025)

Pour atteindre nos clients, nous favoriserons le canal de distribution en face à face, permettant une remise directe au client. Comme prévu dans notre politique commerciale, l'*Azolla* sera transporté par nos agents directement aux clients concernés, où il sera remis en mains propres au client.

## Plan de production et organisation

### 1. Le Processus de production

Culture d'*Azolla pinnata* : le projet présent offre un produit d'alimentation des animaux et un engrais vert naturelle à base d'*Azolla pinnata*.

#### ➤ Fabrication

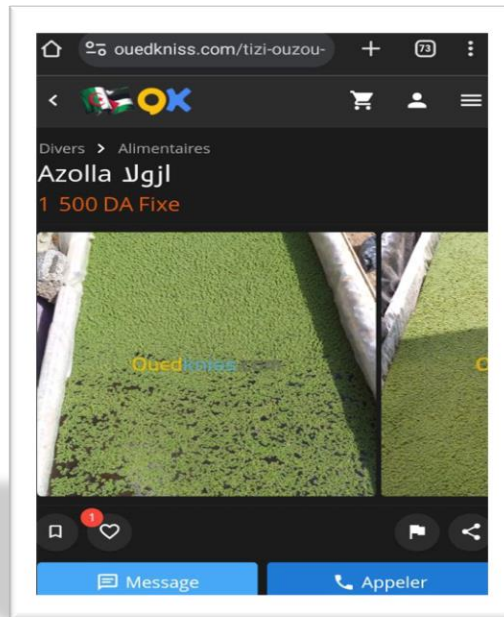
Après l'installation de la serre (de 15 mètre/30mètre), il suffit de creuser des bassins (de 2mètre/9,5) d'une vingtaine de centimètres, de le couvrir avec une bâche imperméable et de le remplir d'eau et de temps en temps un peu d'engrais pour pouvoir cultiver ces plantes aquatiques flottantes, qui donnent en quelques jours déjà un résultat, explique-t-on de même source.

Voici photo qui montre une serre d'*Azolla*



#### ➤ Achat de matières premières

L'achat de matière première se déroule par téléphone avec le fournisseur.



## **2. L'Approvisionnement**

- **Détermination de la politique d'achat :**  
Pour la matière première, l'achat est en ligne avec livraison domicile  
Pour l'eau et l'engrais, l'achat s'effectue par contact téléphonique avec livraison à domicile.
- **Les fournisseurs les plus importants :**  
Nous avons acheté un échantillon d'*Azolla pinnata* au niveau de la région des Issers - Wilaya de Boumerdes pour lancer une culture primaire et effectué un prototype, donc on va le recommander pour ce même fournisseur la quantité nécessaire pour lancer notre projet.
- **La politique de paiement**  
Maine à main, ou bien par ccp.

## **3. La main d'œuvre**

Notre projet crée 02 postes d'emploi direct :  
Ingénieure en agriculture.  
Transporteur.

## **4. Les Principaux partenaires**

Incubateur de l'ENSSMAL (Blue start)  
Financement familial (les parents)  
Fournisseur de la matière première (OMAR Hassane, wilaya de Boumerdes)  
Fournisseur d'engrais (CHAYANI Ramzi, wilaya de Bouira)

## **5. Les activités clés**

La culture et la commercialisation d'Azolla pinnata  
La surveillance et la récolte

### **Plan financier**

#### **1. Coûts et Charges d'Installation**

<b>Equipement d'installation</b>	<b>Coûts</b>
Serres en nylon	300 000 DA
Balance	6 500 DA
Citerne de 500L	10 000 DA
Tuyau de 50 mètres	3 500 DA
<b>Total</b>	<b>320 000 DA</b>

Tableau (1) : les coûts et les charges d'installation

#### **2. Coûts et charges de Production Mensuels**

<b>Les charges</b>	<b>Coûts</b>
Ingénieur	40 000 DA
Transporteur	30 000 DA
Eau de culture	500 DA
Remplissage de la citerne	1 000 DA
Emballage	30 000 DA
Engrais	3 317,50 DA
Matière première	5 343,75 DA/
<b>Total</b>	<b>110 161,25 DA</b>

Tableau (2) : les couts des charges de production mensuels

- Changement d'eau de culture (tous les 6 mois) :  $3\ 000\ \text{DA} / 6 = 500\ \text{DA/mois}$
- Remplissage de la citerne (tous les 2 mois) :  $2\ 000\ \text{DA} / 2 = 1\ 000\ \text{DA/mois}$
- Emballage (4 contenants de 5kg par jour) :  $4 \times 250\ \text{DA} \times 30\ \text{jours} = 30\ 000\ \text{DA/mois}$
- Engrais (tous les 6 mois),  $1\ \text{kg} / 4\ \text{m}^2$  :  $171\ \text{m}^2 / 4\ \text{m}^2 * 1\ \text{kg} = 42,75\ \text{kg}$   
 Coût pour 10 kg d'engrais : 4 700 DA  
 Coût pour 42,75 kg :  $42,75\ \text{kg} / 10\ \text{kg} * 4\ 700\ \text{DA} = 19\ 905\ \text{DA} / 6 = 3\ 317,50\ \text{DA/mois}$
- Matière première (achat une fois seulement) :  $171\ \text{m}^2 / 4\ \text{m}^2 * 1,5\ \text{kg} = 64,125\ \text{kg}$   
 Coût pour 1kg d'*Azolla* =1000DA  
 Coût pour 64,125 kg x 1 000 DA =  $64\ 125\ \text{DA} / 12 = 5\ 343,75\ \text{DA/mois}$

### 3. Quantité de Production et Prix de Vente

- La production quotidienne par jour est  $1\ \text{kg}/4\ \text{m}^2$ , donc :
- Pour 9 bassines de  $19\ \text{m}^2$ , qui donne une surface totale de  $171\ \text{m}^2$ , on a  $42,75\ \text{kg/jour}$
- Ventes au client spécial :  $10\ \text{kg/jour} \times 365\ \text{jours} \times 600\ \text{DA/kg} = 2\ 190\ 000\ \text{DA/an}$
- Ventes restantes :  $32,75\ \text{kg/jour} \times 240\ \text{jours} \times 800\ \text{DA/kg} = 6\ 288\ 000\ \text{DA/an}$
- Chiffre d'affaires total :  $2\ 190\ 000\ \text{DA} + 6\ 288\ 000\ \text{DA} = 8\ 478\ 000\ \text{DA/an}$

Clients	Quantité (kg/jour)	Prix (DA/kg)
Client spécial	10kg	600DA
Autre clients	32,75kg	800DA
<b>Total</b>	42,75 kg	32 200 DA/kg

Tableau (3) : les quantités et les prix de vente journalière

Clients	Chiffre d'affaires (DA/an)
Client spécial	2 190 000 DA/an
Autre clients	6 288 000 DA/an
<b>Total</b>	8 478 000 DA/an

Tableau (4) : le chiffre d'affaires annuel

#### **4. Comptes de Résultats Escomptés**

Chiffre d'Affaires Annuel	8 478 000 DA
Coûts de Production Annuel	1 321 935 DA
Amortissement des Coûts d'Installation	64 000 DA/an
Total des Coûts Annuel	1 385 935 DA
Résultat brut Annuel	7 092 065 DA

Tableau (5) : Résultats brut Annuel

- Coûts de Production Annuel :  $110\,161,25 \text{ DA/mois} \times 12 = 1\,321\,935 \text{ DA/an}$
- Amortissement des Coûts d'Installation (sur 5 ans) :  $320\,000 \text{ DA} / 5 = 64\,000 \text{ DA/an}$
- Total des Coûts Annuel :  $1\,321\,935 \text{ DA} + 64\,000 \text{ DA} = 1\,385\,935 \text{ DA}$
- Résultat brut Annuel :  $8\,478\,000 \text{ DA} - 1\,385\,935 \text{ DA} = 7\,092\,065 \text{ DA}$

#### **5.Fonds de Roulement**








<b>Les charges</b>	<b>Coûts</b>
Dépenses d'installation	320 000 DA
Matière première	64 125 DA
Les salariés	140 000DA
Eau et engrais	6 635DA
<b>Total</b>	<b>533 760DA</b>



Tableau (6) : Fonds de roulement (pour 2 mois de production)

Les dépenses d'installation + la matière première + les salaires (dépenses des 2 mois) +l'eau pour la culture et l'engrais :

$$320\,000 \text{ DA} + 64\,125 \text{ DA} + 140\,000\text{DA} + 3000\text{DA} + 6\,635\text{DA} = 533\,760\text{DA}$$

**Business Model Canvas**
**Conçu pour :**
**Conçu par :**
**Date :**
**Version :**

<b>Partenaires clés</b> 	<b>Activités Clés</b> 	<b>Propositions de</b> 	<b>Relation Client</b> 	<b>Clients</b> 
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incubateur de l'ENSSMAL (Blue start)</li> <li>- Financement familial (les parents)</li> <li>- Fournisseur de la matière premier (OMAR Hassane, willaya de Boumerdes)</li> <li>- Fournisseur d'engrais (CHAYANI Ramzi, willaya de Bouira)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- La culture et la commercialisation d'<i>Azolla pinnata</i></li> <li>- La surveillance et la récolte</li> </ul> <b>Ressources clés</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ressources humaines : Ingénieure en agriculture, Transporteur</li> <li>- Financement familial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Durabilité : valoriser une ressource locale et renouvelable</li> <li>- Performance : offrir une source nutritif qui améliore la santé et la production (Animale/ Végétale)</li> <li>- Accessibilité : proposer une solution accessible aux éleveurs locaux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les réseaux sociaux (Facebook, instagram...) recueillir régulièrement les commentaires des clients</li> <li>- Service après-vente (s'assure que les clients sont satisfaits)</li> <li>- Des remises et des cartes de fidélité Dans l'achat plus de 10kg, le prix devient 600DA /kg</li> </ul> <b>Canaux</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>- Les réseaux sociaux (Facebook, instagrame)</li> <li>- Les publicités</li> <li>- La livraison de produit</li> <li>- Participation à des salons et des évènements agriculture ✓ SIPSA FILAHA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les agricultures locaux (en tant qu'engrais vert naturelle).</li> <li>- Les éleveurs des animaux locaux (en tant qu'aliment).</li> </ul>

	- terrain		✓ AGRI PRO EXPO ORAN AGROPACK EX	
<b>Coûts</b>  <ul style="list-style-type: none"> <li>- Amortissement des Coûts d'Installation (DA/an) : 64 000 DA/an (serre en nylon, Balance, Citerne de 500L, tuyau de 50M)</li> <li>- Coûts de production annuel : 1 321 810 DA (Matière première, Salaires, Eau de la culture, Remplissage de la citerne, Emballage, Engrais)</li> <li>- Coût total : 1 385 935 DA</li> </ul>		<b>Revenus</b>  <p>Prix de vente de produit</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Chiffre d'Affaires Annuel : 8 478 000 DA</li> <li>- Total des Coûts Annuel 1 385 935 DA</li> </ul> <p>Résultat brut Annuel : 7 092 065 DA</p>		

