

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université SAAD DAHLAB de Blida

Faculté des Sciences -Département de chimie



Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules
(LCSNBioM)

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

**Etude chimique, évaluation de l'activité
antimicrobienne et du pouvoir antioxydant de
l'espèce *Azolla pinnata***

Présenté par :

YKRELEF Hadjer et DAIKACHE Maria

Devant le jury composé de :

M. EI HATTAB	Prof	Univ Blida1	Président
S. SABOUR	MCB	Univ Blida1	Examineur
N. BOUZIDI	Prof	Univ Blida1	Promotrice
N. RIAD	MCB	Univ Tipaza	Co-promotrice

Promotion 2024/2025.

REMERCIEMENTS

Louange à Dieu, le Tout-Puissant, le Clément et le Miséricordieux, pour nous avoir accordé la force, la patience et la santé nécessaires à l'aboutissement de ce travail.

*Nous exprimons notre profonde gratitude à **Madame la Professeure N. Bouzidi**, notre encadrante, pour sa confiance, ses orientations claires et pertinentes, et son suivi rigoureux. Sa disponibilité et son soutien constant ont été essentiels à la progression et à la réussite de ce projet.*

*Nos remerciements vont également à **Dr N. Riad**, co-promotrice de ce travail, pour son accompagnement, sa bienveillance et ses conseils précieux tout au long de cette étude.*

*Nous tenons à adresser notre reconnaissance la plus sincère à **Monsieur le Professeur EL Hattab**, président du jury, pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'évaluer ce mémoire. Nous le remercions vivement pour l'attention qu'il a portée à notre travail, la richesse de ses remarques, ainsi que pour la rigueur et la générosité intellectuelle dont il fait toujours preuve envers les étudiants.*

*Nos remerciements s'adressent également à **Dr S. Sabour**, examinateur, pour son implication et ses observations constructives qui ne manqueront pas d'enrichir la suite de nos travaux.*

Nos remerciements vont également à l'équipe du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules pour leur accueil, leur aide précieuse et leur disponibilité tout au long de notre travail expérimental.

Nous remercions profondément nos parents pour leur soutien indéfectible, leur patience et leur encouragement tout au long de notre parcours.

Dédicaces

اللهم اني اسألك دوام النجاح ودوام عطايك لنا، فاللهم اني أسجد إليك وأشكرك شكراً يليق بجلال وجهك العظيم
"الكريم"

Je remercie Dieu, dont le soutien m'a permis de persévérer et de garder la force nécessaire tout au long de ce parcours. Je me remercie également pour l'engagement et les efforts constants déployés dans la réalisation de ce travail.

*PAPA **Abd Elatif**, merci d'avoir toujours été là, de m'avoir encouragé avec amour et patience chaque jour. Tu as facilité chaque étape, tu m'as aidé à surmonter les difficultés, et ta présence a été un pilier essentiel pour avancer. Je ne pourrai jamais oublier tout ce que tu as fait pour moi.*

*MAMA **Fatima El Zahraa**, merci pour ta douceur, ta bienveillance, et tes prières quotidiennes qui m'ont donné la force de continuer, même dans les moments les plus difficiles. Que Dieu te protège toujours.*

*À mon frère **Mustapha**, à son épouse **Wissem**, et à leurs filles **Yakoute** et **Salwa**,
Merci à vous d'avoir toujours été présents et pour votre soutien fidèle.*

*À ma sœur **Hania**, son mari **Boualem**, et leurs enfants **Achwak**, **Houda**, **Mohamed** et **Ali**,
Je vous remercie pour votre présence sincère et votre aide précieuse.*

*À ma sœur **Nawel** et son mari **Hamid**, Merci pour vos conseils avisés et votre accompagnement constant. Vous avez toujours été à mes côtés avec le cœur.*

*À ma petite sœur **Houria**, Merci pour ta gentillesse et ta présence toujours précieuse.*

*À mes amies **Fatima**, **Norhan**, **Khadija**, **Aïcha**, **Imen**,*

*Merci pour les moments partagés, les échanges, et votre soutien moral. Une pensée toute particulière pour **Chaïma**, Merci d'avoir été à mes côtés sans jamais faiblir, même dans les
instants les plus exigeants. Ta générosité et ta patience ont été inestimables tout au long de ce chemin.*

*À mon binôme, **Maria**, Merci pour ta patience et ton engagement sans faille. Traverser ce parcours ensemble a été une vraie chance, et je t'en suis profondément reconnaissante.*

Avec toute ma gratitude,

À Monsieur le Professeur M. El Hattab,

Votre appui, votre patience et vos conseils ont largement dépassé le simple cadre d'un encadrement. Vous avez été pour moi une source constante d'inspiration, un guide attentif et bienveillant tout au long de ce travail. Merci pour votre présence précieuse, votre écoute et votre encouragement à toujours donner le meilleur de moi-même. Ce mémoire vous est dédié avec tout mon respect et ma reconnaissance.

YKRELEF Hadjer.

Dédicaces

Louange à Dieu, pour Sa miséricorde infinie, Sa lumière dans les ténèbres et Sa force dans mes faiblesses. Sans Lui, rien n'aurait été possible.

Je dédie ce mémoire...

À mon père, cet homme au cœur immense, qui m'a guidé, protégé et aimé sans condition. Ton absence me pèse chaque jour, mais ton souvenir me porte et m'élève. Que cette réussite monte jusqu'à toi, là-haut au paradis, comme une prière murmurée, portée par l'amour et la gratitude que je te dois.

*À ma mère **Fatiha**, source de courage et de tendresse. Ton amour a été mon refuge dans les tempêtes, ta patience mon inspiration. Rien n'aurait été possible sans toi.*

*À ma sœur **Sabrina** pour sa présence rassurante et ses mots d'encouragement dans les moments de doute.*

*À mes frères **Farid, Mohammed, Youcef et Walid**, mes piliers. Vous êtes ma fierté, ma force et ma stabilité. Merci pour votre présence, vos encouragements et votre confiance.*

*À mes amies de cœur : **Linda, Amina, Fatima, Yasmine** et **Cherifa**, pour votre amitié sincère, vos sourires dans les moments de doute, et vos mots réconfortants quand tout semblait flou. Votre présence a été un véritable cadeau.*

*À mes cousines : **Ikram, Yasmine, Lina** et **Nihad**, pour votre présence lumineuse, vos sourires sincères et votre affection constante qui m'ont toujours réconfortée.*

*À mes tantes : **Fatma, Yamina, Fadila** et **Hizia**, pour votre amour inconditionnel, vos prières et votre bienveillance qui m'ont accompagnée) tout au long de ce parcours.*

*À ma binôme **Hadjer**, pour ton calme, ton écoute et ton soutien indéfectible tout au long de ce chemin. Merci d'avoir partagé chaque étape de cette aventure.*

À Monsieur le Professeur M. El Hattab,

pour l'intérêt sincère qu'il a manifesté à l'égard de ce travail, pour ses encouragements constants ainsi que pour la pertinence de ses remarques et observations.

Sa disponibilité, sa bienveillance et son exigence académique ont constitué pour moi une véritable source d'inspiration et de motivation.

DAIKACHE Maria.

Résumé

Cette étude a porté sur l'analyse chimique de la fougère aquatique *Azolla pinnata* ainsi que sur l'évaluation de ses propriétés antioxydants et antibactérienne. Deux types de plantes (une cultivée et l'autre achetée) ont été utilisés, présentant des taux d'humidité de 5.61 % et 8.32 %, respectivement. Les extraits obtenus par macération avec différents solvants ont montré des rendements allant de 7.63 % à 13.08 %, tandis que les huiles essentielles, obtenues par hydrodistillation et entraînement à la vapeur, ont présenté des rendements très faibles (0.01 % et 0.006 %, respectivement). L'analyse par CG-SM de l'huile essentielle issue de l'entraînement à la vapeur a permis d'identifier 31 composés, dont le heptadécane (22.04 %), le γ -costol (21.70 %), le hexahydrofarnesyl acetone (7.47 %) et le phytol (3.07 %). En complément, l'analyse ATR-IRTF a confirmé la présence de groupes fonctionnels caractéristiques tels que O–H, C–H, C=O et C=C, mettant en évidence la diversité structurale des composés présents dans les extraits et l'huile essentielle. L'évaluation du pouvoir antioxydant par la méthode du piégeage du DPPH a révélé une activité modérée pour l'extrait méthanolique et plus faible pour l'huile essentielle, avec des valeurs d'IC₅₀ de 0,23 mg/mL et 3,93 mg/mL, respectivement. Les tests antibactériens ont montré une efficacité des extraits contre les quatre souches avec (CMI entre 5 et 10 mg/mL), tandis que l'huile essentielle a affiché une activité remarquable contre *Staphylococcus aureus* (CMI = 0.156 mg/mL), soulignant le potentiel bioactif de *Azolla pinnata*.

Mots clés : *Azolla pinnata*, huile essentielle, analyse CG-SM, analyse ATR-IRTF, activité antioxydante, Activité antibactériennes.

ملخص

تناولت هذه الدراسة التحليل الكيميائي للسرخس المائي، بالإضافة إلى تقييم خصائصها المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا. تم استخدام نوعين من النباتات: أحدهما مزروع محليًا والآخر مشترى، بمحتوى رطوبي بلغ 5.61% و8.32% على التوالي. أظهرت المستخلصات المستخلصة عن طريق النقع باستخدام مذيبات مختلفة مردودًا تراوح بين 7.63% و13.08%، في حين أظهرت الزيوت العطرية المستخلصة عن طريق التقطير المائي والتقطير البخار مردودًا أقل بكثير (0.01% و0.006% على التوالي). أظهر التحليل بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بمطياف الكتلة (GC-MS) للزيت العطري الناتج عن التقطير البخار وجود 31 مركبًا كيميائيًا، من بينها الهبتاديكان (22.04%)، γ -كوستول (21.70%)، هيكساهيدروفارنيسيل أسيتون (7.47%)، والفيتول (3.07%). كما أكد تحليل مطيافية الأشعة تحت الحمراء بتحويل فورييه باستخدام الانعكاس الكلي المضعف (ATR-FTIR) وجود مجموعات وظيفية مميزة مثل $O-H$ ، $C-H$ ، $C=O$ ، و $C=C$ ، مما يعكس تنوعًا بنيويًا كبيرًا في المركبات النشطة بيولوجيًا. أظهر التقييم المضاد للأكسدة باستخدام اختبار تثبيط جذور DPPH نشاطًا معتدلاً لكل من المستخلص الميثانولي والزيت العطري، بقيم IC_{50} بلغت 0.23 ملغ/مل و3.93 ملغ/مل على التوالي. أما الاختبارات المضادة للبكتيريا فقد أظهرت فعالية متوسطة للمستخلصات ضد الأنواع الأربعة المختبرة، حيث تراوحت تراكيز الحد الأدنى المثبط (CMI) بين 5 و10 ملغ/مل. ومن اللافت أن الزيت العطري أظهر نشاطًا بكتيريًا ملحوظًا ضد *Staphylococcus aureus* بتركيز MIC قدره 0.156 ملغ/مل، مما يبرز الإمكانات الحيوية الواعدة لنبات *Azolla pinnata*.

الكلمات المفتاحية : بيناتا، الزيت العطري، التحليل بواسطة CG-SM، التحليل بواسطة ATR-IRTF،

النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.

Abstract

This study focused on the chemical analysis of the aquatic fern *Azolla pinnata* as well as the evaluation of its antioxidant and antibacterial properties. Two types of plants (one cultivated and the other purchased) were used, exhibiting moisture contents of 5.61% and 8.32%, respectively. Extracts obtained by maceration using different solvents showed yields ranging from 7.63% to 13.08%, while essential oils obtained by hydrodistillation and steam distillation presented very low yields (0.01% and 0.006%, respectively). GC-MS analysis of the essential oil from steam distillation enabled the identification of 31 compounds, including heptadecane (22.04%), γ -costol (21.70%), hexahydrofarnesyl acetone (7.47%), and phytol (3.07%). Additionally, ATR-FTIR analysis confirmed the presence of characteristic functional groups such as O–H, C–H, C=O, and C=C, highlighting the structural diversity of the compounds present in the extracts and essential oil. The evaluation of antioxidant activity using the DPPH radical scavenging method revealed moderate activity for the methanolic extract and lower activity for the essential oil, with IC_{50} values of 0.23 mg/mL and 3.93 mg/mL, respectively. Antibacterial tests demonstrated the effectiveness of the extracts against all four strains (MIC between 5 and 10 mg/mL), while the essential oil showed remarkable activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 0.156 mg/mL), underscoring the bioactive potential of *Azolla pinnata*.

Keywords: *Azolla pinnata*, essential oil, GC-MS analysis, ATR-IRTF analysis, antioxidant activity, antibacterial activity.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	I
Dédicaces.....	II
Résumé.....	IV
ملخص	V
Abstract.....	VI
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
CHAPITRE I : Synthèse bibliographique	
I.1 Généralités sur <i>Azolla</i>	4
I.1.1 Distribution géographique.....	6
I.2 <i>Azolla pinnata</i>	Error! Bookmark not defined.
I.2.1 Description botanique	6
I.2.2 Classification de <i>A.pinnata</i>	7
I.2.3 Morphologie de <i>A.pinnata</i>	7
I.2.4 Écophysiologie (Conditions de culture optimales d' <i>Azolla pinnata</i>).....	8
I.3 Composition biochimique de <i>A.pinnata</i>	8
I.4 Utilisation d' <i>Azolla pinnata</i>	9
I.5 Composition chimique de <i>A.pinnata</i>	10
I.6 Activités biologiques de <i>A.pinnata</i>	10
I.6.1 Méthode d'extraction	11
I.7 Huiles essentielles des plantes aquatiques	16

I.7.1	Les travaux antérieurs sur les plantes aquatiques	16
CHAPITRE II : Partie expérimentale		
II.1	Introduction.....	19
II.2	Matériel végétal.....	21
II.2.1	Culture et séchage de l' <i>Azolla</i>	21
II.3	Détermination du taux d'humidité	22
II.4	Préparation des extraits et des (HEs).....	22
II.4.1	Préparation des extraits	22
II.4.1.1	À partir de la plante cultivée	22
II.4.1.2	À partir de la plante achetée	22
II.4.2	Préparation des HEs.....	23
II.4.2.1	Extraction d'HE à partir de la plante cultivée par hydrodistillation.....	23
II.4.2.2	À partir de la plante achetée sèche par (entraînement à la vapeur)	24
II.5	Rendement	24
II.6	Analyse de l'HE par chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).....	25
II.7	Analyse des extraits et HE par ATR-IRTF.....	25
II.8	Évaluation de l'activité antioxydante par la méthode (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) DPPH 26	
II.8.1	Préparation des solutions.....	26
Solution étalon d'acide ascorbique		26
Solution de DPPH.....		26
Solution d'HE (B).....		26
Solution de l'extrait méthanolique.....		26
II.8.2	Protocole de la détermination de l'activité antioxydante	27
II.9	Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits et l'HE de <i>A.pinnata</i>	27
a)	Préparation du milieu de culture	27
b)	Repiquage des souches bactériennes	27
c)	Préparation de précultures	28
d)	Méthode de microdilution en milieu liquide.....	28

CHAPITRE III : Résultats et discussion

III.1	Évaluation de la biomasse d' <i>Azolla pinnata</i> en culture domestique	31
III.2	Caractéristiques organoleptiques des extraits et de l'huile essentielle d' <i>Azolla pinnata</i> 31	
III.3	Taux d'humidité	32
III.4	Rendement	32
III.4.1	Rendement d'extraction des extraits	32
III.4.2	Rendement d'extraction des huiles essentielles	33
III.5	Etude chimique de l'HE par CG-SM	34
III.6	Analyse des extraits et de l'HE d' <i>Azolla pinnata</i> par ATR-IRTF	44
III.6.1	Analyse des extraits d' <i>Azolla pinnata</i> par ATR-IRTF	44
III.6.2	Analyse de l'HE d' <i>Azolla pinnata</i> par spectroscopie ATR-IRTF	46
III.7	Activité antioxydante.....	47
III.8	L'activité antibactérienne	49
	Conclusion	54
	Références	57

LISTE DES FIGURES

Figure I.1: Genre <i>Azolla</i> [12].	5
Figure I.2: Distribution géographique d' <i>Azolla</i> [3].	6
Figure I.3: <i>Azolla pinnata</i> [15].	7
Figure I.4: Morphologie de <i>Azolla pinnata</i> [6].	7
Figure II.1: Organigramme représentant la préparation et l'évaluation des activités biologiques des extraits et HES des deux plantes <i>A.pinnata</i> .	20
Figure II.2: Avant et après la culture de <i>A.pinnata</i> .	21
Figure II.3: Extraction liq-liq d'HE de <i>A.pinnata</i> .	24
Figure II. 4: Appareil d'analyse ATR-IRTF.	26
Figure II. 5: Plaques de microdilution utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.	29
Figure III.1: Chromatogramme de l'huile essentielle d' <i>Azolla pinnata</i> .	34
Figure III.2: Répartition des familles des composés chimiques d'HE de <i>A.pinnata</i> .	35
Figure III. 3: Spectre de masse du composé 13.	43
Figure III. 4: Spectre de masse de géraniol [96].	43
Figure III. 5: Schémas de fragmentation menant aux ions caractéristiques $m/z = 41, 43$ et 69 .	43
Figure III.6: Spectre ATR-FTIR des extraits d' <i>Azolla pinnata</i> .	46
Figure III. 7: Spectre ATR-FTIR de l'huile essentielle d' <i>Azolla pinnata</i> .	47
Figure III.8: Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.	48
Figure III.9: Droite d'étalonnage extrait méthanolique.	48
Figure III.10: Droite d'étalonnage de l'HE.	48
Figure III.11: CMI des échantillons de <i>A.pinnata</i> selon les bactéries ciblées.	50

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1: Espèces d' <i>Azolla</i>	5
Tableau I.2: Composition biochimique de <i>A.pinnata</i>	9
Tableau I.3: Analyse des extraits de <i>A.pinnata</i>	11
Tableau I.4: Résultats des tests biologiques des extraits de <i>A.pinnata</i>	13
 Tableau II.1: Type des souches bactériennes utilisées pour l'activité antibactérienne.....	28
 Tableau III.1: Caractéristiques organoleptiques des extraits et de l'huile essentielle d' <i>Azolla pinnata</i>	31
Tableau III.2: Taux d'humidité des échantillons de <i>A.pinnata</i>	32
Tableau III.3: Rendements d'extraction des extraits.....	32
Tableau III.4: Rendement des huiles essentielles.....	33
Tableau III. 5: Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Azolla pinnata</i>	36
Tableau III. 6: CMI des extraits et l'HE de <i>A.pinnata</i> (mg/mL).....	49

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abs : Absorbance.

ABTS : Acide 2,2-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

ATCC : Américain Type Culture Collection.

A.pinnata : *Azolla pinnata*.

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane.

DMSO : Diméthylsulfoxyde.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

DZI : Diamètres des zones d'inhibition.

FRAP : Pouvoir Antioxydant de Réduction du Fer.

CG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

HE : Huile essentielle.

HPLC : Chromatographie liquide haute performance.

IC₅₀ : Concentration inhibitrice, à laquelle le radical est réduit de 50%.

IR : Indice de rétention.

LB : Milieu Luria-Bertani.

MeOH : Méthanol

PI : Pourcentage d'inhibition.

Réf : Référence

SPF : Facteur de protection solaire.

UV-VIS : Ultraviolet-visible.

Introduction générale

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les plantes représentent depuis toujours une source essentielle de composés naturels bioactifs, largement exploités dans les domaines de la santé, de l'agriculture et de l'industrie [1]. Leur diversité chimique, associée à une multitude de propriétés thérapeutiques, fait d'elles des candidates idéale dans la recherche de nouvelles substances à potentiel pharmacologique ou agro-industriel [2]. Parmi elles, les plantes aquatiques occupent une place particulière en raison de leur richesse en métabolites secondaires, de leur croissance rapide et de leur capacité à s'adapter à des milieux humides variés [3]. Dans ce contexte, elles possèdent des caractéristiques physiologiques et écologiques qui les distinguent des plantes terrestres [4]. Leur environnement spécifique induit la biosynthèse de molécules originales, souvent dotées d'activités biologiques intéressantes, telles que des effets antioxydants, antibactériens, antifongiques, ou encore insecticides [5]. Ces molécules, qu'elles soient extraites sous forme brute ou sous forme d'huiles essentielles, suscitent un intérêt croissant dans un contexte de développement durable, où la recherche de substances naturelles alternatives aux produits chimiques synthétiques devient une priorité.

Parmi ces plantes aquatiques, le genre *Azolla*, appartenant à la famille des *Salviniaceae*, suscite un intérêt particulier en raison de ses multiples atouts : sa capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à une symbiose avec des cyanobactéries [6], sa valeur nutritionnelle élevée, sa capacité à purifier les eaux, mais aussi sa richesse en composés bioactifs. L'espèce *Azolla pinnata*, en particulier, est largement répandue dans les régions tropicales et subtropicales [7]. Elle constitue une biomasse abondante, peu coûteuse et renouvelable, ce qui en fait une candidate idéale pour des applications en pharmacologie ou en valorisation industrielle [8]. Les travaux scientifiques menés jusqu'à présent sur *Azolla pinnata* ont mis en évidence la présence de plusieurs groupes de composés secondaires, suggérant des activités biologiques potentielles [6], en particulier des effets antioxydants (liés à la capacité à neutraliser les radicaux libres) [9] et antimicrobiens (pouvant agir contre diverses souches pathogènes) [10]. Ces propriétés biologiques intéressantes ont été principalement attribuées à des extraits sachant que l'étude chimique de son huile essentielle n'a, à notre connaissance, jamais été explorée. Cette lacune représente une opportunité scientifique précieuse, en particulier dans le contexte actuel de la recherche sur les huiles essentielles naturelles. Dans ce cadre, le présent travail s'inscrit dans une démarche de valorisation d'une plante aquatique locale peu étudiée, en mettant en évidence la diversité chimique de ses extraits et leur potentiel biologique. L'objectif principal est de caractériser les composés bioactifs d'*Azolla pinnata* présents dans l'huile essentielle et les

extraits végétaux, et d'en évaluer les activités antioxydante et antimicrobienne à travers des méthodes analytiques et biologiques appropriées.

Le présent mémoire est structuré en trois chapitres complémentaires :

- Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique. Il présente une vue d'ensemble sur les plantes aquatiques et leur potentiel bioactif, avant de se concentrer sur le genre *Azolla* et particulièrement sur l'espèce *Azolla pinnata*. Ce chapitre aborde sa description botanique, sa composition biochimique, ainsi qu'une revue non exhaustive des travaux antérieurs relatifs au mode d'extraction, d'analyse et de détermination de ses activités biologiques et effet antioxydant.
- Le deuxième chapitre est dédié à la partie expérimentale. Il décrit les matériaux et méthodes utilisés tout au long de l'étude, incluant les techniques d'extraction appliquées (notamment pour l'huile essentielle), les procédés de préparation des extraits, ainsi que les méthodes analytiques pour la caractérisation chimique (telles que la CG-SM, UV-visible et FTIR) et les tests biologiques (antioxydants et antimicrobiens).
- Le troisième chapitre regroupe les résultats obtenus, leur interprétation et leur discussion à la lumière des données existantes dans la littérature scientifique. Ce chapitre permet d'évaluer la pertinence des résultats par rapport aux objectifs fixés, et d'ouvrir des perspectives pour de futurs travaux.

À travers cette étude, nous voulons mettre en valeur le potentiel chimique et biologique d'*Azolla pinnata*, et contribuer à enrichir les connaissances scientifiques autour des plantes aquatiques en tant que sources prometteuses de molécules naturelles bioactives.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

I.1 Généralités sur *Azolla*

Les plantes aquatiques, aussi appelées hydrophytes, sont des plantes adaptées à vivre dans l'eau ou dans des sols saturés en eau de façon permanente. Elles regroupent une grande diversité d'espèces, incluant des fougères, des plantes à fleurs (monocotylédones et dicotylédones), des algues microscopiques (phytoplancton), des algues fixées (périphyton) et des macrophytes (plantes aquatiques visibles à l'œil nu). Entourées en permanence par l'eau, ces plantes ne souffrent pas de perte hydrique, ce qui explique l'absence de structures protectrices et de soutien développées comme celles que possèdent les plantes terrestres. Elles n'ont pas besoin de mécanismes sophistiqués pour limiter la transpiration. Les plantes aquatiques jouent un rôle écologique fondamental, elles sont des producteurs primaires des écosystèmes aquatiques. Grâce à la photosynthèse, elles transforment l'énergie solaire en énergie chimique, en présence de nutriments tels que le phosphore, l'azote, le fer ou encore le zinc. Elles constituent ainsi la base de la chaîne alimentaire, nourrissant le zooplancton, les invertébrés, les crustacés et les poissons. On distingue trois grands types de plantes aquatiques, le phytoplancton (micro-algues flottantes dans la colonne d'eau), le périphyton (algues fixées sur des substrats), les macrophytes (plantes aquatiques de grande taille) [1].

Parmi ces plantes, *Azolla* ce genre comprend des fougères aquatiques flottantes appartenant à la famille des *Salvinaceae*. Ces ptéridophytes hétérospores sont caractérisés par leur petite taille, leur croissance rapide et leur aptitude à coloniser les milieux aquatiques calmes tels que les étangs, les rizières et les canaux [2]. Leur particularité réside dans leur symbiose avec la cyanobactérie *Anabaena Azollae*, qui leur permet de fixer l'azote atmosphérique. Cette capacité confère à *Azolla* une grande valeur agronomique, notamment dans les systèmes de culture du riz, où elle est utilisée comme engrais vert naturel [11]. L'*Azolla* se reproduit à la fois sexuellement et asexuellement, mais la reproduction végétative par fragmentation est plus. Elle peut se multiplier végétativement par fragmentation et se reproduire sexuellement via la production de spores. Seule *A. Mexicana* produit des spores tout au long de l'année, tandis que pour les autres espèces, la reproduction sexuée se limite à certaines périodes de l'année. Le genre regroupe sept espèces représentées dans la Figure I.1.

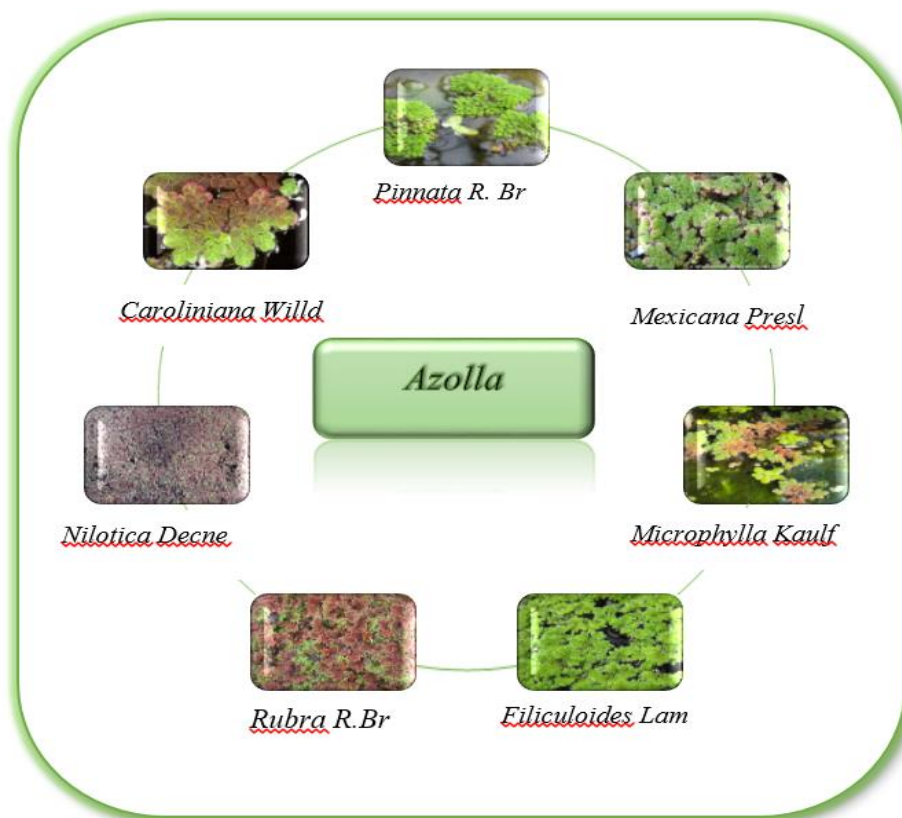


Figure I.1:Genre *Azolla* [12].

Azolla est divisé en deux sous-genres distincts, *EuAzolla* et *Rhizosperma*, comme le présente dans le tableau I.1.

Tableau I.1:Espèces d'*Azolla* [5].

<i>EuAzolla</i>	<i>Rhizosperma</i>
<i>A. caroliniana</i> Willd	<i>A. nilotica</i> Decne
<i>A. filiculoides</i> Lam	<i>A.pinnata</i> R. Br
<i>A. mexicana</i> Presl	/
<i>A. microphylla</i> Kaulf	/
<i>A. rubra</i> R. Br	/

I.1.1 Distribution géographique

L'*Azolla* est présente dans les habitats d'eau douce des régions tropicales (Figure I.2), subtropicales et tempérées chaudes du monde entier [3].



Figure I.2:Distribution géographique d'*Azolla* [3].

Parmi les différentes espèces du genre *Azolla*, cette étude est particulièrement portée sur *A.pinnata*, une espèce largement répandue en Asie et le long des côtes de l'Afrique tropicale.

I.2 *Azolla pinnata*

I.2.1 Description botanique

A.pinnata, représentante de la famille *Azollaceae*, est une fougère aquatique de petite taille, dont le diamètre varie entre 1 et 2,5 cm. Elle se caractérise par une tige courte, ramifiée et flottante, portant des racines fines qui pendent dans les eaux stagnantes des zones tropicales et subtropicales, telles que les étangs, fossés et rizières. *A.pinnata* est connue sous divers noms vernaculaires tels que fougère moustique, fougère lentille d'eau, mousse féerique, mine d'or verte ou encore velours aquatique, et elle est principalement répandue sur les territoires africains et asiatiques [14]. Chaque feuille présente un lobe dorsal, épais, aérien et vert grâce à la chlorophylle, et un lobe ventral, mince, incolore et flottant. La présence de pigments anthocyaniques peut donner à la plante une couleur rougeâtre dans certaines conditions environnementales, tandis qu'elle peut apparaître vert foncé dans d'autres. Les plantes du genre *Azolla* ont généralement une forme triangulaire ou polygonale et flottent à la surface de l'eau, soit individuellement, soit en formant des tapis denses [11].

I.2.2 Classification de *A.pinnata*

A.pinnata suit la classification botanique suivante (Figure I.3).

	L'embranchement : <i>Ptéridophytes</i> La classe : <i>Filicophytes</i> L'ordre : <i>Salviniales</i> La famille : <i>Azollaceae</i> (anciennement parfois reconnue séparément, aujourd'hui souvent intégrée aux <i>Salviniaceae</i>) Le genre : <i>Azolla</i> Espèce : <i>A.pinnata</i>
---	--

Figure I.3: *Azolla pinnata* [15].

I.2.3 Morphologie de *A.pinnata*

A.pinnata est une petite fougère aquatique flottante avec une structure bien particulière. Ses feuilles minuscules sont alignées par paires sur des tiges fines et ramifiées. Chaque feuille possède deux parties, un lobe supérieur (dorsal), exposé à l'air, couvert de poils fins qui retiennent de l'air pour aider à la flottaison, un lobe inférieur (ventral), immergé dans l'eau, qui contient des cyanobactéries (*Anabaena Azollae*) capables de fixer l'azote atmosphérique (Figure I.4). Ses racines fines et pendantes absorbent les nutriments présents dans l'eau et aident à stabiliser la plante. Les tiges flottantes soutiennent les feuilles et les racines [16].

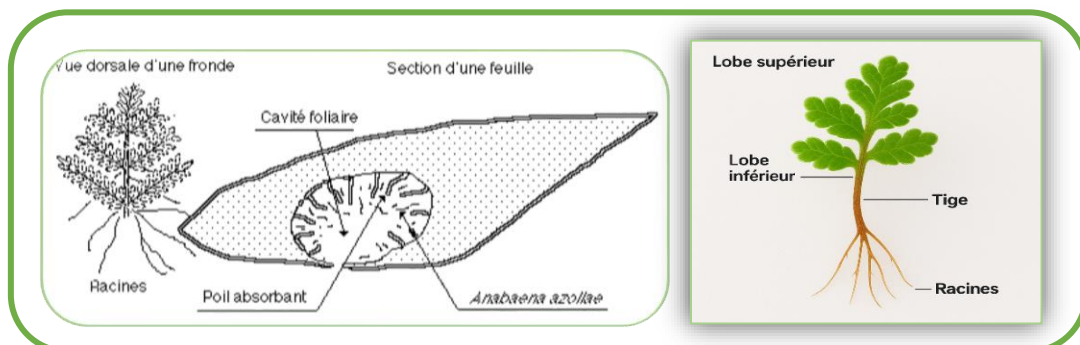


Figure I.4: Morphologie de *Azolla pinnata* [6].

I.2.4 Écophysiologie (Conditions de culture optimales d'*Azolla pinnata*)

La culture de *A.pinnata* nécessite des conditions environnementales spécifiques afin d'optimiser sa croissance et sa productivité. Cette fougère aquatique se développe idéalement à des températures comprises entre 20 et 30 °C, dans un environnement légèrement acide à neutre, avec un pH optimal situé entre 5,5 et 6,5 [7,8]. Elle requiert une lumière modérée, naturelle ou artificielle, correspondant à une intensité lumineuse de 100 à 300 $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$ [13]. La culture est généralement réalisée dans une faible profondeur d'eau, de l'ordre de 5 à 15 cm, avec une préférence pour environ 10 cm d'eau stagnante ou faiblement renouvelée [11]. Bien qu'*Azolla* possède la capacité de fixer l'azote atmosphérique grâce à son symbiote cyanobactérien (*Anabaena Azollae*), elle nécessite un apport en phosphore (1 à 2 ppm) et en potassium pour assurer un développement optimal [17]. Une biomasse fraîche de départ de 200 à 500 g/m² est généralement recommandée pour l'inoculation [11]. De plus, pour éviter les effets néfastes du vent, des pluies intenses ou d'une évaporation excessive, il est conseillé de cultiver *Azolla* dans des bacs ou des bassins protégés à l'aide d'un filet d'ombrage [18]. Enfin, le renouvellement hebdomadaire de l'eau ou selon la turbidité permet de maintenir un environnement stable et propice à la croissance. Une caractéristique remarquable d'*Azolla* réside dans sa capacité à adapter sa morphologie en réponse à divers stress abiotiques ou nutritionnels. Une exposition prolongée à une lumière intense entraîne, par exemple, une pigmentation rouge pourpre des frondes, tandis qu'une carence en éléments nutritifs se manifeste par des altérations morphologiques spécifiques. Ces modifications visibles constituent de précieux indicateurs physiologiques, permettant un diagnostic rapide du stress subi et facilitant la mise en œuvre de mesures correctives adaptées [16].

I.3 Composition biochimique de *A.pinnata*

La composition biochimique de *A.pinnata* est caractérisée par la présence des protéines, d'acides aminés, de glucides, de vitamines et de lipides. Le Tableau I.2 présente la composition biochimique de *A.pinnata* [24].

Tableau I.2:Composition biochimique de *A.pinnata* [24].

Constituants biochimiques	Teneur (%)	Remarques
Protéines	25 – 35 %	Teneur élevée, favorable à la nutrition animale
Minéraux	10 – 15 %	Incluant calcium, phosphore, potassium, fer, cuivre, magnésium...
Acides aminés, bioactifs, bio polymères	7 – 10 %	Contribuent à la croissance et à la santé du bétail
Vitamines	—	Vitamine A, vitamine B12, bêta-carotène (présentes, mais non quantifiées)
Glucides	Très faible	Faible valeur énergétique
Lipides	Très faible	Favorise une digestion rapide
Lignine	Faible	Rend la plante facilement digestible pour les animaux

I.4 Utilisation d'*Azolla pinnata*

Azolla pinnata est une petite plante aquatique très utile dans l'agriculture et l'environnement. Elle peut capter l'azote présent dans l'air grâce à une bactérie spéciale (cyanobactérie) qui vit à l'intérieur de ses feuilles, ce qui en fait un bon engrais naturel dans les rizières [20]. Une certaine variété d'*Azolla* peut même pousser dans les eaux usées traitées, et la plante obtenue peut ensuite être utilisée sans danger comme engrais ou compost, après un simple lavage [21]. Contrairement à la plupart des plantes, *Azolla* fabrique elle-même son engrais à partir de l'air, ce qui permet de produire localement des engrais, des aliments pour animaux, de la nourriture ou même du carburant, tout en réduisant le CO₂ dans l'atmosphère [22]. Cette plante a aussi des vertus médicinales : elle est antiseptique et peut être appliquée sur les plaies sous forme de pâte [23]. En plus, *Azolla* est utilisée comme plante décorative dans les bassins ou les aquariums. Elle est aussi ajoutée à l'alimentation des poulets, ce qui améliore leur croissance et leur efficacité alimentaire [24]. Elle peut aussi servir d'aliment pour d'autres animaux comme l'ormeau (un coquillage marin) [25] ou la carpe [26]. En Inde, cette plante a été testée pour nettoyer les sols pollués [27]. Des expériences ont aussi montré que lorsqu'elle pourrit, *Azolla* aide à éliminer le diesel dans l'environnement [28]. En plus, certains extraits d'*Azolla* peuvent

tuer ou empêcher la croissance de parasites des racines (nématodes), de virus des plantes comme le virus de la mosaïque verte du concombre, ou même de certains mollusques nuisibles comme *Biomphalaria alexandrina* [29]. Enfin, dans plusieurs pays, les agriculteurs utilisent *Azolla* pour fertiliser les rizières ou pour lutter contre les moustiques [15].

I.5 Composition chimique de *A.pinnata*

Une synthèse des principaux travaux scientifiques ayant porté sur l'extraction, l'identification et la caractérisation des composés bioactifs présents dans *A.pinnata*. Cette revue comparative met en évidence la diversité des approches méthodologiques adoptées, tant au niveau des techniques d'extraction (macération, décoction, ultrasons, reflux, Soxhlet) [30] que des solvants utilisés, appliquées à différentes formes de la plante. Les rendements d'extraction varient significativement selon les conditions expérimentales. Les analyses phytochimiques sont principalement réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) [31], chromatographie liquide à haute performance (HPLC) [32], ou spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) [33]. Ces techniques ont permis l'identification de nombreuses classes de métabolites secondaires, notamment les polyphénols, flavonoïdes, pigments (chlorophylles, caroténoïdes, β -carotène), acides gras, hydrocarbures, composés volatils et stérols. Le tableau I.3 résume l'analyse des extraits d'*A.pinnata*.

I.6 Activités biologiques de *A.pinnata*

A.pinnata, est étudiée pour ses nombreuses propriétés biologiques, notamment son potentiel antioxydant [34] et antibactérien [35], qui la rendent prometteuse dans plusieurs domaines. Le résumé des résultats des tests biologiques des extraits de *A.pinnata* est présent dans le (Tableau I. 4).

Tableau I.3: Analyse des extraits de *A.pinnata*.

Matrice	Analyte	I.6.1 Méthode d'extraction	Technique / Méthode	Résultat	Réf.
<i>A.pinnata</i> séchée	Extrait brute	Macération et décoction ultrasons 24-48h		Méthanol 23.8–26.5% ; Méthanol (80 %) 13.07–14.7% ; Acétone (90%) 9.5–10.6% ; Chloroforme 6.2–7.4%, Eau 14.3–12.5%	[36]
<i>A.pinnata</i> séchée (étuve & lyophilisation)	Polyphénols flavonoïdes, pigments, glucides	Ultrasons, reflux, ultrasons + reflux avec solvants aqueux	Folin-Ciocalteu, $AlCl_3/NaOH$, phénol- H_2SO_4	Polyphénols : 182.09 ± 9.04 mg GAE/g ES Flavonoïdes : 173.02 mg ECA/g ES Chlorophylle a) : 125.665 mg/g ES Chlorophylle b : 43.173 mg/g ES Caroténoïdes : 21.389 mg/g ES Glucides : 5.4 ± 0.87 µg/g ES	[37]
<i>A.pinnata</i> séchée	Composés chimiques	Macération : 60g/1L méthanol, 7 j, Soxhlet : 40g/1L méthanol, 3h à 70°C	CG-SM	Macération : neophytadiene (27.85 %), hexadecanoate de méthyle (14.18 %), Phytol (10.04%). Soxhlet : methylphosphonate (17,96 %)	[38]

<i>A.pinnata</i>	Extrait brute	Macération et décoction (ultrasons vs sans ultrasons) avec solvants : méthanol, eau, etc.	HPLC (UV 280 nm, C18)	Méthanol : 23.8–27.3 % ; Méthanol (80 %) : 11.4–14.7 % ; Acétone (90 %) : 8.4–10.6 % ; Chloroforme : 5.8–7.6 % ; Eau: 12.03–14.3% Acide syringique: 124.35 ± 0.23 µg/g; Acide gallique: 110.44 ± 1.23 µg/g; Acide rosmarinique: 24.69 ± 1.35 µg/g; Acide chlorogénique: 23.14 ± 0.62 µg/g; Acide férulique: 5.8 ± 1.17 µg/g; Acide 3,5-dihydroxybenzoïque: 18.27 ± 0.43 µg/g; 5-Hydroxymethylfurfural: 18.71 ± 1.28 µg/g; Acide 9-octadecénoïque: 15.04 µg/g	[39]
<i>A.pinnata</i>	Composés chimiques Groupes fonctionnels	Soxhlet avec solvants (méthanol, acétone, eau, chloroforme), 3 h à 70 °C	CG-SM FTIR	Méthanol : 12.32% ; Acétone : 6.2%; Eau : 9.37% ; Chloroforme : 7.27 % neophytadiene, heneicosane, squalène. O–H (3280-3293 cm ⁻¹), C–H (2855-2918 cm ⁻¹), C=O (1627-1630 cm ⁻¹) et –COO ⁻ (1417-1527 cm ⁻¹)	[40]
	Composés organiques volatils	Extraction à l'acétone Extraction à méthanol	CG-SM	Glycérine (8,63 %): -'1,1-Bicyclooctyl (0,23 %): Benzofuran, 2,3-dihydro (3,27 %), n-Hexadécanoïque acid (6,46%), Oleic acid (3,99 %) Cis-11, 12-Epoxytetradécène-1-ol, (13, 36%) Stigmastane-3, 6-dione (7, 58 %) Glycerin (9, 37 %), methyl ester (5, 99 %), a– Hexadecanoic acid (11, 91 %), Phytol (3, 22 %), Oleic acid (1,89 %) Alpha-tocopherol (2, 90 %), Gamma-sitosterol (5, 34 %)	[9]

Tableau I.4:Résultats des tests biologiques des extraits de *A.pinnata*

Type d'activité	Méthode / Paramètres	Résultats	Réf
Activité insecticide	Exposition progressive des larves et adultes de <i>Tribolium castaneum</i> (8h à 24h)	Extrait aqueux très efficace dès 8h (60 % mortalité). Extrait méthanolique actif à partir de 10h. Toxicité attribuée aux phénols, tanins, saponines.	[41]
Activité antioxydante	DPPH FRAP	IC50 Trolox (référence) :0.08 mg/ml, IC50 extrait méthanolique : 3.4 mg/ml, IC50 extrait aqueux : 9.5 mg/ml, IC50 extrait hydro-méthanolique : 4.05 mg/ml L'extrait méthanolique a montré un meilleur pouvoir réducteur par rapport aux autres extraits, bien qu'aucune valeur exacte d'absorbance ou de concentration équivalente à l'ascorbique n'ait été indiquée	[42]
	DPPH : Mélanger 1 ml d'extrait (concentrations de 5 à 100 µg/ml) avec 3 ml de solution de DPPH (0,004% dans le méthanol). Incuber 30 min à température amb dans le noir. L'abs à 517 nm. FRAP : 1 ml d'extrait (5 à 100 µg/ml), 2,5 ml de tampon phosphate (200 mM, pH 6,6), 2,5 ml de K ₃ Fe(CN) ₆ à 1%. Incuber 20 min à 50°C. Ajouter 2,5 ml de TCA (10%) et 0,5 ml de FeCl ₃ (0,1%). L'abs à 700 nm après 10 min	IC50 acide ascorbique : 1.39 µg/ml IC50 extrait méthanolique : 7.32 µg/ml Le pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique augmente avec la concentration (5 à 100 µg/ml). Une élévation progressive de l'absorbance à 700 nm a été observée, indiquant une activité antioxydante croissante. L'extrait montre une capacité de réduction du fer, mais inférieure à celle de l'acide ascorbique	[43]

	Méthode DPPH. Absorbance mesurée à 517 nm. Extraits testés : 10 µl et 20 µl. Comparaison avec acide ascorbique.	À 10 µl: Ascorbique (standard) : Inhibition = 74 % ; Extrait benzénique : Inhibition = 58.47 % ; Extrait éthanolique : Inhibition = 63 %; À 20 µl: Ascorbique (standard) : Inhibition = 75 % ; Extrait benzénique : Inhibition = 60.81% ; Extrait éthanolique : Inhibition = 65 %.	[44]
Activité anticancéreuse	Test de viabilité cellulaire (lignées HeLa)	IC₅₀ méthanolique = 820.47 µg/ml. IC₅₀ aqueux > 1000 µg/ml (moins actif).	[42]
Activité antibactérienne	Diffusion sur disque contre <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	Méthanol 12.1 mm sur <i>S. aureus</i>, hydro méthanol faible contre <i>E. coli</i> (3.4 mm). <i>P. aeruginosa</i> inhibé uniquement par méthanol et acétone.	[42]
	Test in vitro par méthode de diffusion en puits contre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Escherichia coli</i> .	Extrait d'acétate d'éthyle <i>S. aureus</i> : 20±0.9 mm <i>P. aeruginosa</i> : 11±0.3 mm; <i>E. coli</i> : 15±0.5 mm; Extrait méthanolique <i>S. aureus</i> : 10±0.14 mm; <i>P. aeruginosa</i> : 10±0.1 mm; <i>E. coli</i> : 11±0.1 mm.	[12]
	Méthode de diffusion en puits. Bactéries testées : <i>Staphylococcus</i>, <i>Bacillus</i>, <i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus</i> extrait au benzène → 20 µl: 4 mm, 30 µl: 8 mm; Extrait à l'éthanol → 20 µl: 0 mm, 30 µl: 1 mm; <i>Pseudomonas</i> extrait au benzène → 20 µl: 1 mm, 30 µl: 3 mm, extrait à l'éthanol → 20 µl: 1 mm, 30 µl: 2 mm ; <i>Staphylococcus</i> extrait au benzène → 20 µl: 7 mm, 30 µl: 9 mm.	[44]

	La méthode de diffusion sur glose (par disque ou par puits), en mesurant les zones d'inhibition en millimètres.	<i>Bacillus subtilis</i> E1 (CM-SOX): 2.33 ± 0.58 mm E2 (CM-SFE): 2.67 ± 1.53 mm E3 (AB-SOX): 0.67 ± 1.15 mm E4 (AB-SFE): 1.67 ± 0.58 mm	<i>Staphylococcus aureus:</i> E1: 0.67 ± 1.15 mm E2: 1.00 ± 1.00 mm E3: 1.67 ± 2.89 mm E4: 1.33 ± 1.53 mm	<i>Escherichia coli:</i> E1, E2, E3, E4: NA (aucune activité observée) <i>Pseudomonas aeruginosa:</i> E1, E2, E3, E4: NA (aucune activité observée)	[10]
Activité antifongique	Diffusion en puits sur agar contre champignons pathogènes	Meilleure activité avec extrait méthanolique (zone inhibition jusqu'à 14.7 mm pour <i>F. redolens</i>), extrait aqueux moins actif sauf pour <i>F. redolens</i> (12.1 mm).			[42]

CM : extrait des parties centrales de la plante (tiges et feuilles centrales) ; **AB** : extrait des parties supérieures de la plante ; **E1** :CM-SOX ; **E2** :CM-SFE ; **E3** : AB-SOX

I.7 Huiles essentielles des plantes aquatiques

Les huiles essentielles (HEs) sont des mélanges naturels, volatils et odorants produits par les plantes comme métabolites secondaires. Elles sont extraites principalement par distillation à la vapeur d'eau et contiennent des composés majoritairement terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes), ainsi que des alcools, cétones, esters, phénols et composés aromatiques[47]. Les HE des plantes aquatiques représentent une source précieuse de composés bioactifs aux propriétés variées, allant des activités antioxydantes aux effets antimicrobiens, insecticides et neuroprotecteurs. Ces huiles sont souvent caractérisées par une composition chimique complexe incluant des terpénoïdes, des hydrocarbures insaturés, des phénylpropanoïdes et d'autres familles de métabolites secondaires qui confèrent à ces plantes un potentiel pharmacologique et industriel significatif. Cependant, l'extraction de ces huiles peut s'avérer délicate, notamment en raison de leur faible teneur dans certains végétaux aquatiques [48].

I.7.1 Les travaux antérieurs sur les plantes aquatiques

Les HE des plantes aquatiques telles que *Nelumbo nucifera*, *Nymphaea alba* var et *Acorus calamus* présentent une diversité chimique notable qui explique leurs différentes activités biologiques et leur intérêt pharmacologique. L'HE des graines de *Nelumbo nucifera* est principalement composée de sesquiterpènes oxygénés, une famille de composés connue pour ses puissantes propriétés antioxydantes et neuroprotectrices. Parmi les composés identifiés, on retrouve notamment des sesquiterpènes tels que le caryophyllène et l'humulène, qui contribuent à l'inhibition significative des enzymes cholinestérases (acétylcholinestérase et butyrylcholinestérase), mécanisme clé dans la prévention des maladies neurodégénératives comme Alzheimer. Par ailleurs, l'extrait éthylacétoxyde et l'HE de *N. nucifera* manifestent des activités marquées de piégeage des radicaux libres DPPH, ABTS et super oxyde anion, traduisant un fort potentiel antioxydant. L'HE de *Nymphaea alba* var., extraite par une méthode innovante d'extraction subcritique assistée par ultrasons, contient une large gamme de composés hydrocarbonés, comprenant des alkynes (notamment 8-hexadécane, 31.04%), des alcènes comme l'8-heptadécène (9.21%), ainsi que des cétones telles que le dodécane-2-one (6.04%). Ces composés, appartenant majoritairement aux familles des hydrocarbures insaturés et des cétones, sont reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes modérées, bien que l'activité antioxydante de cette huile soit inférieure à celle des antioxydants

synthétiques tels que le Hydroxytoluène butylé (BHT). La richesse en alcynes et alcènes confère cependant un intérêt potentiel dans la formulation de produits cosmétiques ou pharmaceutiques à base de plantes aquatiques [49]. L'HE d'*Acorus calamus* se distingue par une forte concentration en β -asarone, un phénylpropanoïde qui représente jusqu'à 96% des composés dans certains cytotypes indiens. Ce composé est largement étudié pour ses activités pharmacologiques variées, incluant des propriétés anticonvulsivantes, anxiolytiques, antifongiques et antibactériennes [50]. Les huiles essentielles d'*A. calamus* contiennent également des monoterpènes comme le géraniol acétate et des sesquiterpènes tels que le β -farnésène, qui complètent le profil bioactif de cette plante. La variabilité chimique liée au cytotype et à la provenance géographique influence la concentration relative de ces composés, ce qui affecte l'efficacité biologique des extraits. De plus, les propriétés insecticides et larvicides de cette HE en font une source naturelle intéressante pour le développement d'agents de biocontrôle [51].

Chapitre II

Partie expérimentale

CHAPITRE II : Partie expérimentale

II.1 Introduction

La valorisation des composés bioactifs issus de *A.pinnata* nécessite l'application de protocoles rigoureux, tenant compte à la fois des conditions de préparation de la matière végétale et des techniques d'extraction adaptées. Deux types de matière végétale ont été utilisés : une plante cultivée localement, séchée à l'air libre, et une plante achetée, séchée dans une pièce ventilée. La plante cultivée a fait l'objet d'une macération avec un mélange méthanol/dichlorométhane (1 :1) et d'une hydrodistillation par 'Clevenger' pour obtenir l'huile essentielle. La plante achetée a été extraite par macération avec différents solvants [méthanol pur, méthanol/dichlorométhane (1:1), méthanol/eau (1:1)], ainsi que par entraînement à la vapeur à l'aide d'un alambic, conduisant également à l'extraction d'une huile essentielle. Les extraits obtenus ont été filtrés, concentrés puis analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), tandis que l'huile essentielle a été soumise à une analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Enfin, l'évaluation des activités biologiques. L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée par le test de piégeage du DPPH, tandis que l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de microdilution pour l'évaluation des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Le schéma présenté dans la Figure II.1 illustre les principales étapes expérimentales suivies dans cette étude.

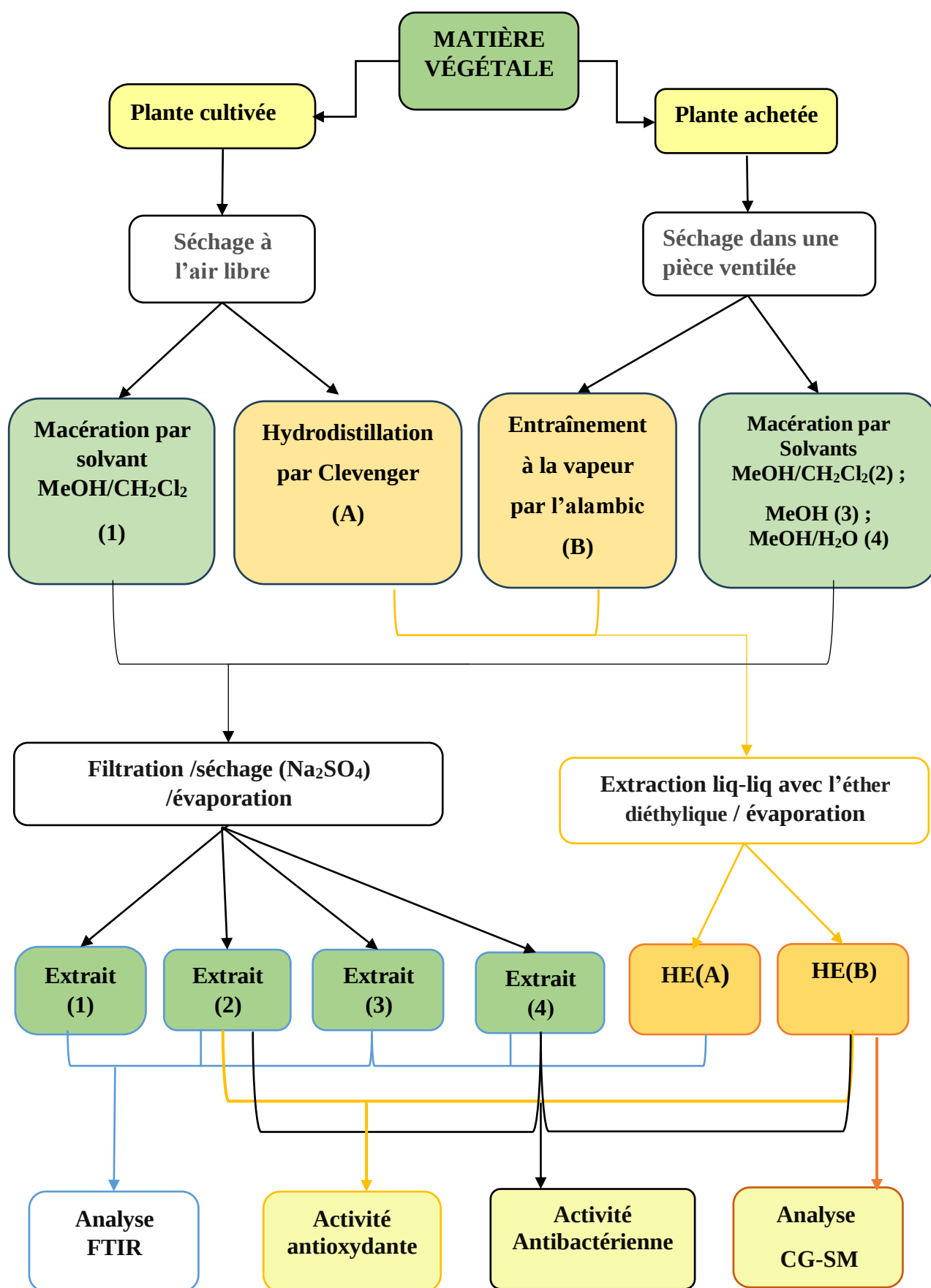


Figure II.1: Organigramme représentant la préparation et l'évaluation des activités biologiques des extraits et HEs des deux plantes *A.pinnata*.

II.2 Matériel végétal

Deux types d'échantillons de *A.pinnata* ont été utilisés dans ce travail :

- **Plante cultivée localement** : A partir d'une plante achetée à Blida (Bougara).
- **Plante achetée déjà séchée** : Provenant de Aïn Defla, séchée à l'air libre dans une pièce bien ventilée à température ambiante.

II.2.1 Culture et séchage de l'*Azolla*

L'espèce *Azolla pinnata* utilisée dans cette étude a été acquise sous forme de plante vivante, la reproduction de cette fougère aquatique ne s'effectuant pas par graines, mais par multiplication végétative. Le matériel végétal a été collecté dans la région de Bougara (wilaya de Blida, Algérie). La culture a été mise en place dans un bac en plastique peu profond, rempli d'eau du robinet préalablement reposée pendant 24 heures afin de favoriser l'évaporation du chlore résiduel. Un engrais organique a été préparé en mélangeant du fumier bovin à une petite quantité de sol naturel, puis incorporé à l'eau du bac. Après un temps de décantation de 4 heures, visant à stabiliser les matières en suspension, 0,5 kg de biomasse fraîche d'*Azolla* a été déposée à la surface du milieu de culture. Le dispositif a été maintenu en conditions extérieures, sous lumière naturelle diffuse, pendant une durée de 10 jours, période durant laquelle la croissance et le développement de la plante ont été surveillés. Au terme de cette phase, la biomasse végétale a été récoltée manuellement, puis séchée à l'air libre pendant 4 jours à l'ombre, dans un environnement aéré et à l'abri de la lumière directe, en vue de préserver l'intégrité de ses composés bioactifs (Figure II.2).

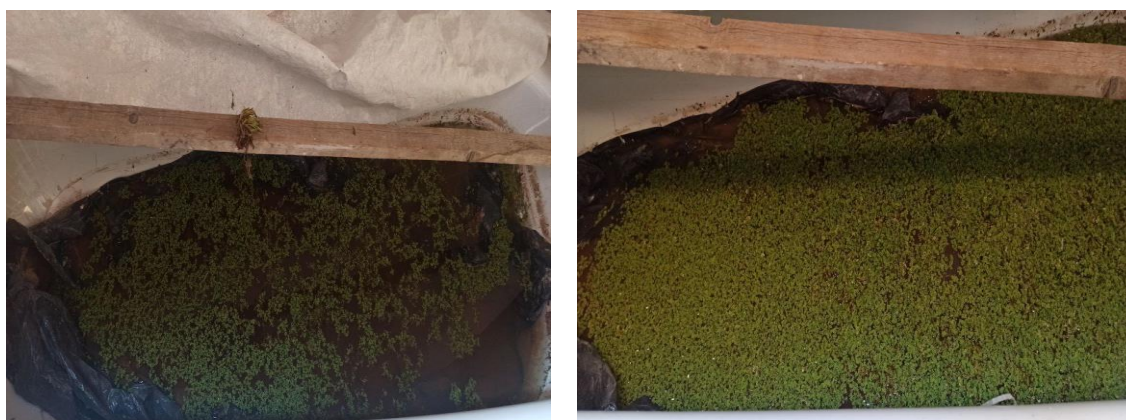


Figure II.2: Avant et après la culture de *A.pinnata*.

II.3 Détermination du taux d'humidité

Le taux d'humidité a été évalué par méthode gravimétrique [52]. Des échantillons pour les deux types de plantes (la plante cultivée et la plante achetée sèche) ont été pesés, puis séchés dans une étuve à 40 °C jusqu'à obtention d'une masse constante. La perte de masse a permis de calculer le taux d'humidité selon la formule :

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = \frac{m_{\text{initial}} - m_{\text{final}}}{m_{\text{initial}}} \times 100$$

II.4 Préparation des extraits et des (HEs)

II.4.1 Préparation des extraits

Les extraits ont été préparés à partir de deux types de matière végétale : la plante cultivée et la plante achetée sèche.

II.4.1.1 À partir de la plante cultivée

Extrait 1 : méthanol/ dichlorométhane (1:1)

10 g de la plante cultivée, préalablement séchée, a été macérée dans un flacon ambré contenant un mélange de méthanol et de dichlorométhane (1:1). La macération a duré 7 jours à température ambiante, à l'abri de la lumière. Après filtration, le solvant a été évaporé sous vide à 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait concentré a été conservé dans un flacon hermétique à 4°C.

II.4.1.2 À partir de la plante achetée

Extrait 2 : méthanol pur

100 g de la plante sèche ont été macérés dans 1,2 L de méthanol pur. La macération a été effectuée pendant 7 jours à température ambiante, dans un flacon ambré à l'abri de la lumière. Après filtration, le solvant a été éliminé par évaporation sous vide à 40 °C.

Extrait 3 : méthanol/ dichlorométhane (1 :1)

10 g de la plante a été macérée dans un mélange méthanol/dichlorométhane (1:1), pendant 7 jours à température ambiante dans un flacon ambré. Après filtration et évaporation à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40 °C.

Extrait 4 : méthanol/ eau (1 :1)

10 g de la plante dans un mélange méthanol/eau (1 :1) pendant 7 jours dans un cristalliseur fermé. Après filtration, l'extrait a été séché à l'étuve à 40 °C pendant 3 jours.

Traitement des extraits

Les extraits 1, 2 et 3, obtenus après évaporation du solvant initial, ont ensuite fait l'objet d'un traitement par extraction liquide-liquide afin d'éliminer les composés indésirables et de concentrer les fractions organiques. Pour cela, chaque extrait a été redissous dans une petite quantité d'eau distillée, puis transféré dans une ampoule à décanter. Une extraction a été réalisée en ajoutant de l'acétate d'éthyle, permettant le transfert des composés organiques vers la phase organique. Après agitation et séparation des phases, la phase organique (acétate d'éthyle) a été isolée, séchée à l'aide de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), puis filtrée. La solution a ensuite été concentrée une deuxième fois par évaporation par évaporateur rotatif à 40 °C. Les extraits obtenus après ce traitement ont été conservés dans des flacons hermétiques, à l'abri de la lumière et à température de 4°C jusqu'aux analyses ultérieures.

II.4.2 Préparation des HEs

Les HEs ont été préparées à partir des deux types de plantes selon des méthodes adaptées citées ci-dessous.

II.4.2.1 Extraction d'HE à partir de la plante cultivée par hydrodistillation

31,4 g de plante cultivée sèche a été introduite dans un ballon de 2 litres contenant de l'eau distillée, remplissant environ les deux tiers du volume total. Le mélange a ensuite été soumis à une hydrodistillation pendant 2 heures 30 minutes, à l'aide d'un montage de Clevenger.

Extraction liquide-liquide

Le distillat recueilli a été transféré dans une ampoule à décanter pour procéder à une extraction liquide-liquide avec de l'éther diéthylique, solvant organique permettant de séparer les composés hydrophobes. La phase organique a ensuite été séchée à l'aide de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) afin d'éliminer les traces d'eau, filtrée puis concentrée par évaporation sous vide à 40°C à l'aide d'un rot à vap. L'HE obtenue a été conservée dans un flacon ambré hermétique pour éviter sa dégradation.

II.4.2.2 À partir de la plante achetée sèche par (entraînement à la vapeur)

a) Entraînement à la vapeur

400 g de plante sèche ont été placés dans un alambic contenant 7 litres d'eau distillée. L'entraînement à la vapeur a été réalisé pendant 1 heure 30 minutes. La vapeur chargée en composés aromatiques volatils a été dirigée vers un condenseur à reflux, équipé d'un système de refroidissement par circulation d'eau froide. Ce dispositif a permis la condensation de la vapeur en distillat liquide, recueilli ensuite dans un réservoir collecteur.

b) Extraction liquide-liquide

Le distillat obtenu a été transféré dans une ampoule à décanter puis extrait avec de l'éther diéthylique (Figure II.3). La phase organique a été séchée avec du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), filtrée, puis concentrée par évaporation sous vide à 40 °C à l'aide par l'évaporateur rotatif .L'HE a été ensuite pesée et conservée dans un flacon, à l'abri de la lumière.

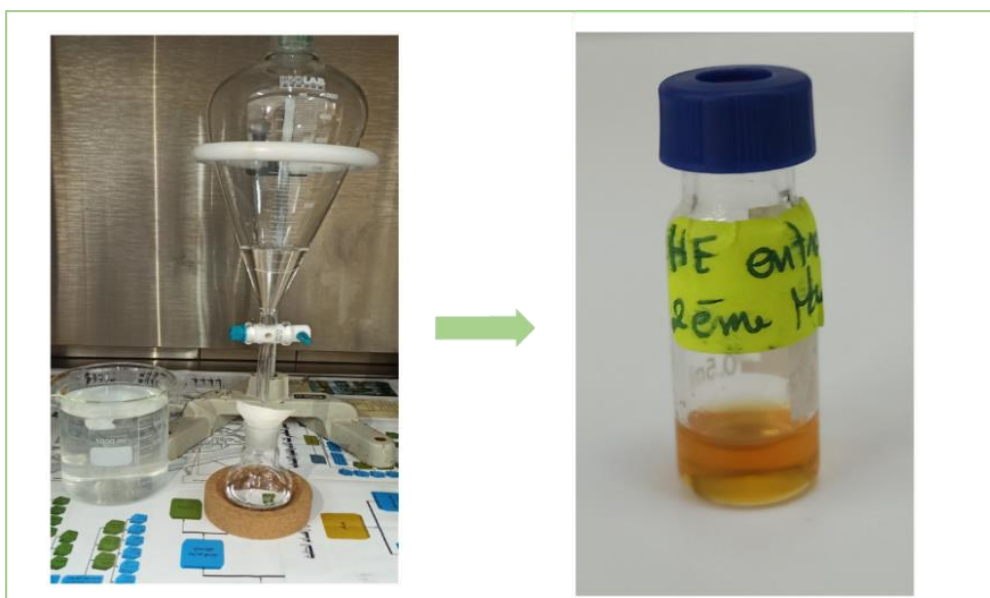


Figure II.3:Extraction liq-liq d'HE de *A.pinnata*.

II.5 Rendement

Le rendement est défini comme la quantité totale d'un soluté que l'on retrouve dans l'extrait par rapport à la masse initiale de l'échantillon [53]. Il est exprimé en pourcentage (%) et calculé en utilisant la formule indiquée dans l'équation suivante :

$$R (\%) = (m_1/m_2) \times 100.$$

m_1 : la masse en gramme (g) de l'extrait évaporé.

m_2 : la masse en gramme (g) de la matière sèche.

II.6 Analyse de l'HE par chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

L'identification de la composition chimique de l'HE de *A.pinnata* a été réalisée qualitativement par (CG/SM) pour la détermination des teneurs en masse des différents constituants. Les analyses CG/SM ont été effectuées sur un système GC2010 (Shimadzu, Kyoto, Japon). Le système d'analyse est équipé d'un injecteur à échantillonneur automatique et d'une colonne de séparation capillaire en silice fondue HP-5 (30 m x 0,25 mm i.d., df 0,25 μ m). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 28,8 ml/min et à une vitesse linéaire constante de 33,3 cm/s, ce qui correspond à une pression d'entrée de 43,6 kPa. La température de l'injecteur a été réglée à 250 °C. La température du four a été maintenue à 70°C pendant 5 minutes, puis augmentée à 250°C à une rampe de 3°C.min⁻¹. Les températures de l'interface et de la source d'ions étaient respectivement fixées à 250°C et 200°C. L'acquisition a été réalisée en mode balayage complet dans la gamme de masse 35 à 550 m/z, avec un intervalle de balayage de 0,2 s. L'échantillon de l'HE de *A.pinnata* a été dissous dans de l'acétate d'éthyle (10 mg/mL), puis 1 μ L a été injecté en mode division split avec un rapport de division (split ratio) de 1:50. Le traitement des données est réalisé à l'aide du logiciel LabSolution ver. 5,97 (Shimadzu, Kyoto, Japon). L'identification a été réalisée en appliquant deux filtres, une correspondance de similarité spectrale supérieure à 90 % et une correspondance de l'indice de rétention linéaire (IRL) calculée à l'aide d'une série d'homologues de n-alcanes saturés C7 et C40 (1000 g/ml, 49452-U) fournis par Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne) avec une fenêtre de filtrage de ± 10 unités IRL. Une identification plus poussée a été réalisée sur la base des spectres de masse rapportés par des spécialistes [54]. Pour caractériser et identifier la composition chimique, les bases de données suivantes ont été utilisées : W11N17 (Wiley11-Nist17, Wiley, Hoboken, NJ, USA ; et FFNSC 3.0 (Shimadzu, Kyoto, Japon).

II.7 Analyse des extraits et HE par ATR-IRTF

L'analyse qualitative des extraits et d'HE d'*Azolla pinnata* a été réalisée à l'aide d'un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de marque THERMO SCIENTIFIC type (Nicolet s10), équipé d'un accessoire Smart ITR, d'une source infrarouge moyen (4000-400cm⁻¹), d'un détecteur DTGS (détecteur triglycéride sulfate), d'un rayonnement laser et une

séparatrice XT-KBR ont été utilisés. L'acquisition des spectres a été effectuée avec une résolution de 4cm^{-1} et un nombre de balayage égal à 10 scans. Le traitement des spectres est réalisé avec le logiciel OMNIC sous le système d'exploitation Microsoft Windows 7.



Figure II. 4:Appareil d'analyse ATR-IRTF.

II.8 Évaluation de l'activité antioxydante par la méthode (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) DPPH

II.8.1 Préparation des solutions

Solution étalon d'acide ascorbique

Une solution de référence a été préparée en dissolvant 10 mg d'acide ascorbique dans 10 ml de méthanol, sous agitation jusqu'à dissolution complète. La concentration finale de la solution obtenue était de 1 mg/mL.

Solution de DPPH

Une solution du radical libre DPPH a été préparée en dissolvant 4 mg de DPPH dans 100 ml du méthanol. Le mélange a été protégé de la lumière et agité pendant 30 minutes afin d'assurer une dissolution complète. L'absorbance de la solution a ensuite été mesurée à 517 nm et ajustée entre 0.7 et 0.8 pour optimiser la sensibilité de la détection.

Solution d'HE (B)

Une solution d'HE a été préparée à une concentration de 8 mg/ml, en dissolvant 2.6 mg de celle-ci dans 325 μL de méthanol. La solution a été homogénéisée par agitation manuelle.

Solution de l'extrait méthanolique

E (2) a été préparé à partir d'une masse de 18,4 mg d'extrait dissous dans du méthanol, puis dilué de manière appropriée afin d'obtenir une solution à une concentration de 0.25 mg/mL, adaptée à l'analyse spectrophotométrique.

II.8.2 Protocole de la détermination de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée sur microplaque de 96 puits selon le principe de la réduction du radical DPPH [55]. Pour chaque échantillon (acide ascorbique, E (2), HE(B)), 160 μ L de la solution préparée ont été déposés dans le premier puits de la première colonne. Une dilution sérielle par ligne a ensuite été effectuée en ajoutant 80 μ L de méthanol dans les puits suivants. À l'aide d'une micropipette, 80 μ L de la solution du premier puits ont été transférés dans le deuxième puits, homogénéisés, puis 80 μ L de ce deuxième puits ont été transférés au suivant, et ainsi de suite, afin de créer une gamme de concentrations décroissantes. Dans chaque puits, 320 μ L de la solution du DPPH ont été ajoutés. Un blanc (témoin) a été préparé en mélangeant uniquement 80 μ L de méthanol avec 320 μ L de la solution du DPPH, sans ajout de substance antioxydante. La microplaque a ensuite été incubée à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. La lecture de l'absorbance a été effectuée à une longueur d'onde égale à 517 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque de type ELISA.

II.9 Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits et l'HE de *A.pinnata*

La méthode de microdilution en milieu liquide a été employée pour évaluer de manière quantitative l'activité antibactérienne, en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits et de l'HE. La CMI correspond à la plus faible concentration de l'agent testé capable d'inhiber la croissance des souches pathogènes étudiées [56].

a) Préparation du milieu de culture

Le milieu nutritif utilisé pour la croissance des souches bactériennes est le Luria-Bertani (LB) [57]. La préparation consiste à dissoudre 12.5 g de poudre LB dans 500 ml d'eau distillée, sous agitation continue jusqu'à dissolution complète. Le pH est ensuite ajusté à 7 à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) (1M). Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes.

b) Repiquage des souches bactériennes

Quatre souches bactériennes de référence ont été sélectionnées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne. Chaque souche, conservée à 4 °C, a été repiquée dans des boîtes de Petri, contenant le milieu LB solide stérile, puis incubée à 37 °C pendant 24 heures afin d'obtenir une culture fraîche et active. Ces souches sont présentées dans le Tableau II.1.

Tableau II.1:Type des souches bactériennes utilisées pour l'activité antibactérienne

Bactérie	Type de Gram	Référence ATCC
<i>Escherichia coli</i> (EC)	Négatif	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	Positif	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i> (EF)	Positif	ATCC 29212
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA)	Négatif	ATCC 27853

c) Préparation de précultures

La préculture de chaque souche bactérienne a été préparée en introduisant quelques colonies de chaque bactérie dans des flacons contenant le milieu LB liquide stérile, et ensuite incubée à 37 °C pendant 24 heures.

Afin de garantir une concentration bactérienne homogène, les cultures obtenues ont été diluées dans de l'eau distillée stérile.

La densité cellulaire a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm, puis ajustée pour obtenir une densité optique (DO) comprise entre 0,08 et 0,12.

d) Méthode de microdilution en milieu liquide

Nous avons évalué l'activité antibactérienne des extraits par la méthode de microdilution en microplaque (96 puits), avec quelques ajustements. Trois extraits ont été testés : (E2), l'extrait (E4) et HE(B), chacun dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration initiale appropriée. Pour préparer la microplaque, 270 µL de milieu LB stérile ont été ajoutés dans les puits de la première colonne, et 150 µL dans ceux des colonnes 2 à 12. Ensuite, 30 µL de l'extrait, à une concentration initiale de 10 mg/ml, sont déposés dans le premier puits, suivis d'une dilution en série binaire jusqu'au 10e puits, par transfert de 150 µL entre puits avec homogénéisation. Le 10e puits est ensuite vidé de 150 µL pour maintenir un volume constant. Nous ajoutons 20 µL de la suspension bactérienne, préalablement préparée et standardisée à une densité optique appropriée, dans tous les puits sauf ceux de la colonne 11, qui servent de contrôle négatif (milieu sans bactéries). La microplaque est incubée à 37 °C pendant 24 heures. L'activité antibactérienne est évaluée par l'absence de trouble dans les puits, signe d'absence de croissance bactérienne, et peut être confirmée par une lecture spectrophotométrique à 630 nm. La CMI correspond à la plus faible concentration d'extrait empêchant toute croissance visible (Figure II. 5).



Figure II. 5:Plaques de microdilution utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

Chapitre III

Résultats et discussion

III.1 Évaluation de la biomasse d'*Azolla pinnata* en culture domestique

La culture expérimentale d'*Azolla pinnata*, réalisée dans un bac peu profond en conditions extérieures, a permis d'évaluer la capacité de croissance de la plante dans un environnement domestique simplifié. À partir d'une biomasse initiale de 0,5 kg, placée dans un milieu enrichi en fumier bovin et sol naturel, une biomasse finale de 1 kg a été obtenue après 10 jours de culture, soit un doublement du poids frais. Ce résultat démontre que les conditions mises en place lumière diffuse et engrais organique naturel, sont globalement favorables à la croissance de l'*Azolla*, bien que simples. Cependant, comparé aux méthodes de culture optimisées décrites dans la littérature, qui permettent des récoltes journalières de 500 à 600 g grâce à des apports nutritifs réguliers (superphosphate, guano, microéléments), la productivité obtenue reste modérée. L'absence d'apports nutritifs supplémentaires pendant les 10 jours de culture pourrait expliquer cette croissance limitée par rapport au potentiel maximal de la plante [106]. Ces résultats mettent en évidence l'importance des éléments nutritifs et du suivi technique (fréquence des apports, qualité du substrat) pour améliorer le rendement de l'*Azolla* en contexte domestique.

III.2 Caractéristiques organoleptiques des extraits et de l'huile essentielle d'*Azolla pinnata*

Les caractéristiques organoleptiques des extraits et de l'huile essentielle d'*Azolla pinnata* ont été observées afin de décrire leur aspect visuel et leur odeur, comme présenté dans le tableau (Tableau III.1).

Tableau III.1:Caractéristiques organoleptiques des extraits et de l'huile essentielle d'*Azolla pinnata*

<i>Azolla pinnata</i>	Couleur	Odeur	Aspect / Texture
Extraits	Vert foncé à brunâtre	Herbacée avec nuances d'algues marines	Pâteux
Huile essentielle (HE)	Jaune orangé à jaune foncé	Herbacée avec note d'algues marines	Liquide, visqueux, homogène

III.3 Taux d'humidité

Le Tableau III.2 illustre les taux d'humidité mesurés pour les deux échantillons d'*Azolla* analysés. La plante cultivée présente un taux d'humidité de 5.61 %, nettement inférieur à celui de la plante achetée, qui atteint 8.32 %. Cette différence peut être expliquée par plusieurs paramètres, tels que la méthode et la durée de séchage, le temps de stockage ou encore les conditions environnementales avant l'analyse. Comparativement à des travaux antérieurs[58] qui ont indiqué que le taux d'humidité de l'*Azolla* peut descendre jusqu'à 6,38 % après un séchage en étuve durant 5 heures. Le taux encore plus faible observé pour notre échantillon cultivé suggère un séchage particulièrement efficace, ou bien des conditions de conservation plus strictes.

Tableau III.2:Taux d'humidité des échantillons de *A.pinnata*

Type de plante	Taux d'humidité (%)
Cultivée	5,61
Achetée	8,32

III.4 Rendement

Le rendement d'extraction dépend du solvant, de sa polarité et de la méthode utilisée. Cela est crucial pour préserver les composés volatils, notamment dans les huiles essentielles. Le tableau ci-dessous illustre les rendements obtenus selon le type de solvant et le type de plante.

III.4.1 Rendement d'extraction des extraits

Tableau III.3:Rendements d'extraction des extraits

Extraits	Type de solvant	Type de plante	Rendement d'extraction (%)
1	Méthanol/Dichlorométhane	Cultivée	9,91
2	Méthanol	Achetée	9,37
3	Méthanol/Dichlorométhane	Achetée	7,63
4	Méthanol/Eau	Achetée	13,08

Dans Tableau III.3 l'extrait (1) obtenu à partir de la plante cultivée présente un rendement de 9,91 %, ce qui témoigne de l'efficacité de ce mélange binaire pour extraire à la fois des composés polaires et apolaires.

L'extrait (2), issu de la plante achetée, affiche un rendement légèrement inférieur de 9,37 %. Ce résultat est nettement plus faible que celui rapporté par la littérature [59]. Cette différence pourrait être liée aux conditions expérimentales, le lieu de la culture, la saison de la récolte, les conditions de séchage et de stockage.

L'extrait (3) à partir de la plante achetée donne un rendement de 7,63 %, inférieur à celui de l'extrait 1, ce qui pourrait s'expliquer par les conditions d'obtention. L'extrait (4) présente un rendement de 13,08 %, supérieur à celui obtenu par une étude antérieure (11,4 %) [60]. Ce résultat met en évidence la bonne capacité du mélange hydrométhanolique à extraire des composés hydrosolubles.

III.4.2 Rendement d'extraction des huiles essentielles

Tableau III.4:Rendement des huiles essentielles

Huile	Méthode d'extraction	Plante	Rendement d'extraction (%)
1	Hydrodistillation	Cultivée	0,01
2	Entraînement à la vapeur	Achetée	0,006

Dans Tableau III.4 Les rendements des huiles essentielles obtenus sont très faibles, avec environ 0,01 % pour l'extraction par hydrodistillation de la plante cultivée et 0,006 % pour l'entraînement à la vapeur de la plante achetée. Cette différence entre les deux méthodes peut s'expliquer par plusieurs facteurs. L'hydrodistillation réalisée avec un appareil de type Clevenger est mieux adaptée aux faibles quantités, car elle offre un meilleur contrôle de la température et permet une récupération directe des vapeurs, limitant ainsi les pertes. En revanche, l'entraînement à la vapeur, souvent effectué avec un alambic sur des volumes plus importants, peut entraîner des pertes liées à une condensation moins efficace ou à l'adsorption des composés sur les parois de l'appareil. Par ailleurs, la qualité de la matière première, notamment l'état de séchage, les conditions de stockage et la variété de la plante, influence également de manière importante le rendement final. Ces résultats restent cohérents avec d'autres travaux sur des plantes aquatiques, comme l'algue brune *Cystoseira tamariscifolia*, pour laquelle un rendement faible d'environ 0,06 % ($\pm 0,02$) a été rapporté, soulignant la difficulté générale d'extraire des huiles essentielles en grande quantité dans ce type de végétaux [48].

III.5 Etude chimique de l'HE par CG-SM

L'analyse phytochimique de l'huile essentielle d'*Azolla pinnata* a été réalisée par CG-SM. Le chromatogramme obtenu (Figure III.1) illustre la complexité chimique de l'échantillon, avec plusieurs pics bien distincts. Les temps de rétention des composés identifiés s'étendent de 4,23 à 53,99 minutes, traduisant la présence d'une large gamme de molécules de polarités et de volatilités variées

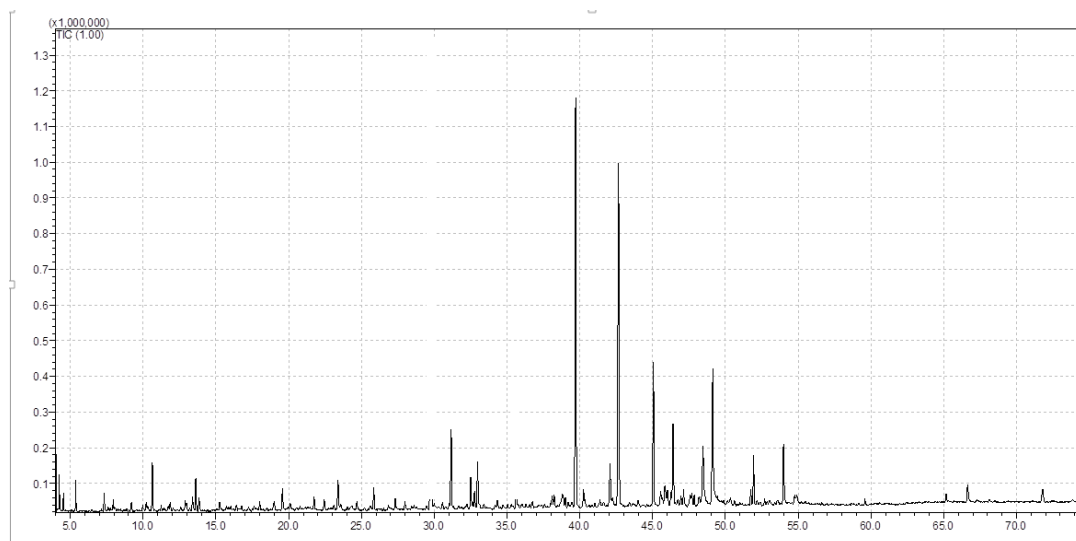


Figure III.1:Chromatogramme de l'huile essentielle d'*Azolla pinnata*.

La répartition des familles chimiques identifiées est illustrée par un cercle relatif (Figure III.2), permettant une visualisation synthétique des grandes classes présentes dans l'huile. Les terpènes et dérivés terpéniques dominent, représentant 29,30 % de la composition totale, suivis des alcools (28,22 %), des hydrocarbures saturés (alcane) (22,36 %), et des acides gras et dérivés (17,97 %). Les cétones atteignent 11,69 %, tandis que les aldéhydes comptent pour 6,10 %. Des familles chimiques minoritaires telles que les phénols, esters aromatiques, et hétérocycles oxygénés sont également détectées (ensemble 5,93 %). Enfin, les composés non identifiés (NI) constituent 7,26 % de la composition totale.

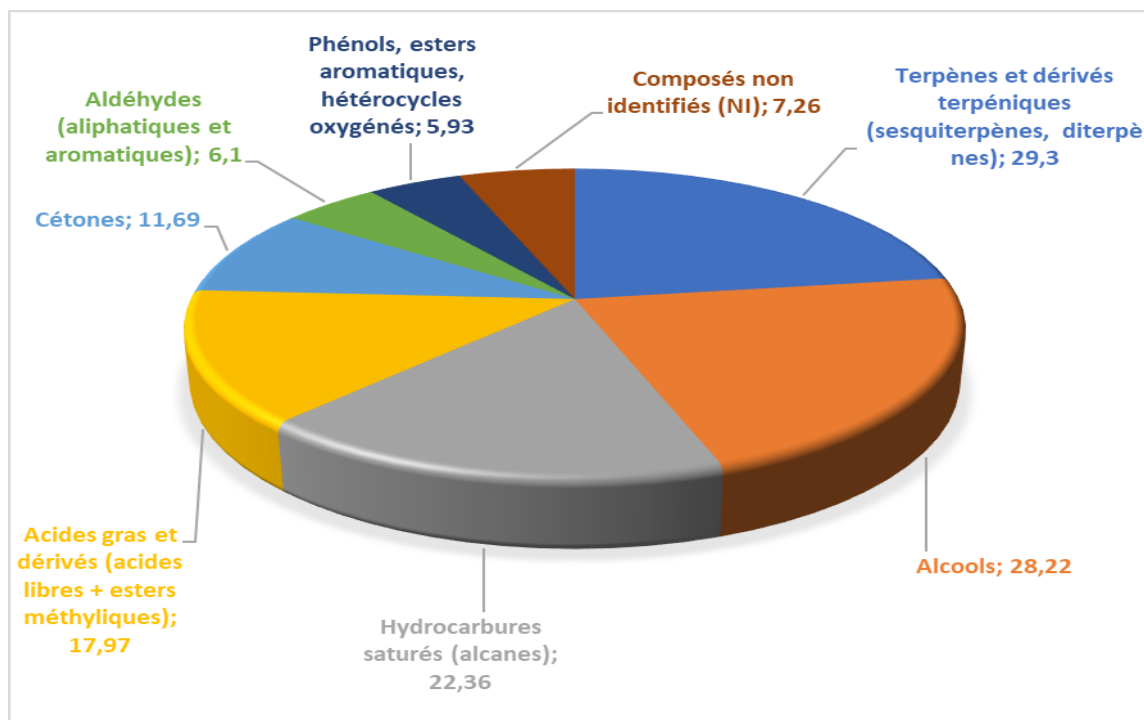


Figure III.2: Répartition des familles des composés chimiques d'HE de *A.pinnata*.

Le Tableau III.5 récapitule les caractéristiques détaillées des 36 composés identifiés l'huile essentielle. Il inclut pour chaque molécule : le nom, la formule moléculaire, le poids moléculaire, le temps de rétention, l'indice de rétention (IR), la température d'ébullition, ainsi que le pourcentage relatif de surface.

Tableau III. 5: Composition chimique de l'huile essentielle d'*Azolla pinnata*.

Ordre d'élution	Nom du composé	Formule	Temps de rétention	% de l'aire	Température ébullition	IR cal	IR lit	Poids moléculaire g/mol
1	2-Hexenal	C ₆ H ₁₀ O	4.235	1	146 - 149 °C	846	845[61]	98.1430
2	Hexanol	C ₆ H ₁₄ O	4.485	0.45	157 °C	864	867 ¹	102,177
3	Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	5.368	0.93	152,8 °C	905	904 ¹	114,19
4	Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	7.323	0.61	178,1 °C	982	961 ¹	106,12
5	1-Octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	7.948	0.32	175 °C	969	978[62]	128.2120
6	2,4-Heptadienal	C ₇ H ₁₀ O	9.200	0.22	177.00 to 178.00 °C.	1013	1012.3 [63]	110.1537
7	Benzeneacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	10.630	2.08	195 °C	1045	1045 [64]	120.1485
8	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	13.390	0.43	195 °C	1107	1104 ¹	142.2386
9	3,4-Dimethylcyclohexanol	C ₈ H ₁₆ O	13.619	1.44	190 C°	1111	1126 [65]	128.2120
10	Benzeneethanol	C ₈ H ₁₀ O	13.843	0.67	219 °C	1116	1114 [66]	122.1644
11	Safranal	C ₁₀ H ₁₄ O	18.008	0.26	215 °C	1203	1205 [67]	150.2176

12	1H-Pyrrole-2,5-dione, 3-ethyl-4-methyl-	C ₇ H ₉ NO ₂	19.574	0.95	253°C	1236	1234.8 [68]	139.1519
13	NI	43(100%) ; 69(79,04%) ; 86(34,18%) ; 109 (62,05)	21.742	0.49	/	1281	/	/
14	4-Vinyl Guaiacol	C ₉ H ₁₀ O ₂	23.388	1.35	224°C	1317	1309 ¹	152.1904
15	Oxide de pipéritenone	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	25.844	1.06	255.00 to 256.00 °C	1370	1371 [69]	166.2170
16	NI	43(26,34%) ; 81(29,39%) ; 95(100%) ; 122 (16,47%) ; 149 (11,50%) ; 164(10,54%)	27.322	0.42	/	1403	/	/
17	(E)-beta-ionone	C ₁₃ H ₂₀ O	31.154	4.10	258 °C	1491	1490 ¹	192,297 3
18	NI	55(60,94%) ; 81 (31,26%) ; 82 (21,03%) ; 124(100%) ; 137(72,38%) ; 165(7,92%) ; 180 (28,27%)	32.763	0.72	/	1530	/	/

19	2(4H)-Benzofuranone, 5, 6, 7,7a-tetrahydro- 4, 4,7a-trimethyl-, (R)-	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	32.972	2.57	296.1°C	1535	1531 [70]	180.2435
20	τ-Muurolol	C ₁₅ H ₂₆ O	38.090	0.43	303 to 305 °C	1662	1654 [71]	222.3663
21	NI	41(83,25%) ; 79 (82,60%) ; 91 (100%) ; 109(77,70%) ; 133 (40,55%) ; 161 (28,97 %) ; 187 (32,63%)	38.234	0.61	/	1666	/	/
22	Heptadecane	C ₁₇ H ₃₆	39.707	22.04	302 °C	1704	1700 ¹	240.4677
23	Pentadecanal	C ₁₅ H ₃₀ O	40.249	0.57	284 to 286 °C	1718	1719 [72]	226.3981
24	Acide tétradécanoïque	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	42.079	2.29	326,2 °C	1768	1769 ¹	228.3709
25	γ-costol	C ₁₅ H ₂₄ O	42.657	21.70	/	1783	1752.3 ¹	220.3505
26	2-Pentadécanone, 6,10,14-triméthyl-	C ₁₈ H ₃₆ O	45.047	7.59	389,85 °C	1851	1855 [73]	268.4778
27	1-Hexadecanol	C ₁₆ H ₃₄ O	46.259	0.54	334 °C	1886	1883 [74]	242.4406
28	NI	41(20,14%) ; 79(32,60%) ; 91(100%) ;	46.405	5.02	/	1890	/	/

		108 (92,13%) ; 147 (52,27%) ; 175(20,47)						
29	Nonadecane	C ₁₉ H ₄₀	46.930	0.32	330°C	1905	1900 ¹	268.5209
30	Hexadéc-9-énoate de méthyle	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	47.122	0.64	395,66 °C	1911	1886 ¹	268.4348
31	Acide hexadécanoïque, ester méthylique	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	47.855	0.46	417° C	1932	1933 [75]	270.4507
32	Acide palmitoléique	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	48.463	2.84	363° C	1950	1949.4 [76]	254.4082
33	Acide hexadécanoïque	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	49.130	8.62	351 °C	1969	1964[77]	256,4241
34	Acide arachidonique	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	51.740	0.60	328°C	2044	2398 ¹	304,47
35	Ester méthylique de l'acide docosapentaénoïque	C ₂₃ H ₃₆ O ₂	51.935	2.52	429.9 °C	2050	2515 ¹	344.5
36	Phytol	C ₂₀ H ₄₀ O	53.994	3.07	335.5 °C	2110	2111 [78]	296.5310

IR Cal, indices de rétention calculés sur la colonne HP-5 MS ; **IR Lit**, indices de rétention rapportés dans la littérature ; **1**, identification basée sur la correspondance informatique des spectres de masse des pics avec les bibliothèques Wiley11-Nist17 et FFNSC 3.0.

La diversité chimique et la variation des temps de rétention montrent que l'HE de *A.pinnata* a un profil complexe et unique, ce qui pourrait expliquer ses propriétés aromatiques, pharmacologiques et biologiques.

Le heptadécane (22,04 %), hydrocarbure linéaire saturé, représente le composé majoritaire de l'HE. Il agit comme métabolite végétal et composant volatil, naturellement présent dans diverses huiles essentielles [79]. Il est fréquemment utilisé comme standard interne en chromatographie pour comparer les profils d'extraits [60], et peut être intégré dans certaines formulations cosmétiques en raison de ses propriétés sensorielles [61]. Par ailleurs, il joue un rôle écologique important comme étant une phéromone sexuelle femelle chez la mouche *Lycoriella mali* [80].

Le γ -costol (21,70 %) et le τ -muurolol (0,43 %), sont des sesquiterpènes oxygénés qui sont réputés pour leurs activités pharmacologiques, notamment les activités anti-inflammatoires, antioxydantes [63] et antifongiques [64]. Leur structure complexe, comprenant des fonctions alcool et cétone, leur permet d'interagir avec diverses cibles biologiques, contribuant ainsi à l'efficacité thérapeutique des huiles essentielles. Le τ -muurolol est un composé majeur de l'HE de *Pueraria tuberosa*, ce qui souligne son importance dans diverses huiles essentielles aux propriétés thérapeutiques [81].

La 2-pentadécanone, 6,10,14-triméthyl- (7,47 %), également connue sous le nom de hexahydrofarnesyl acétone, est une cétone terpénique présente en quantité significative dans l'HE de *A.pinnata*. Ce composé possède une large gamme d'activités biologiques, incluant des effets antimicrobiens, anti-inflammatoires, antioxydants et anticancéreux [82]. Il est également étudié pour son activité analgésique dans divers systèmes biologiques expérimentaux. En plus de son rôle potentiel en santé humaine, il contribue à la modulation des odeurs grâce à ses propriétés volatiles, ce qui renforce sa valeur dans les formulations cosmétiques et thérapeutiques. Sa structure chimique lui permet de neutraliser les radicaux libres, participant ainsi à la protection cellulaire contre le stress oxydatif [83].

Le phytol (3,07 %), un alcool diterpénique. Il se distingue par ses effets anti-inflammatoires et ses propriétés antioxydantes puissantes. Le phytol est largement étudié pour ses capacités à protéger les cellules contre les radicaux libres et à moduler les réponses immunitaires, ce qui en fait un composant d'intérêt pour des applications pharmaceutiques et cosmétiques [15, 16].

En plus de ces composés majoritaires, l'HE contient plusieurs alcools, tels que le 1-hexanol (1,09 %) et le phényléthanol (0,67 %). Ces alcools contribuent non seulement à l'arôme

caractéristique de l'huile mais possèdent également des propriétés antimicrobiennes reconnues, agissant notamment contre diverses bactéries et champignons [17, 18].

Les aldéhydes identifiés, bien que minoritaires, contribuent significativement à l'activité biologique de l'HE. Le 2-hexénal (1,0 %), le benzèneacétaldéhyde (ou phénylacétaldéhyde, 2,08 %), le benzaldéhyde (0,62 %) et le heptanal (0,66 %) présentent des activités antibactériennes et antifongiques, en perturbant notamment les membranes cellulaires microbiennes [20]. Le benzène acétaldéhyde se distingue aussi par ses propriétés aromatiques, largement exploitées en parfumerie et dans les produits aromatisés, ainsi que par son rôle comme attractif d'insectes et intermédiaire en synthèse organique, ce qui renforce l'intérêt multifonctionnel de ces aldéhydes [90].

La présence d'acides gras et de leurs esters, comme l'acide palmitoléique (2,85 %), l'acide arachidonique (0,61 %) et l'acide tétradécanoïque (0,34 %), apportent une dimension supplémentaire à l'huile. Ces acides gras jouent un rôle clé dans la structure membranaire et la signalisation cellulaire, participant aux processus anti-inflammatoires et à la cicatrisation, et renforçant ainsi le potentiel thérapeutique global de HE [22, 23].

Les monoterpènes oxygénés, tels que le safranal (0,26 %) et l'oxyde de pipériténone (1,06 %), bien que présents en faible proportion, jouent un rôle important dans l'activité biochimique globale de l'HE. Le safranal, principal composé aromatique du safran, est reconnu pour ses puissantes propriétés antioxydantes, agissant comme piègeur de radicaux libres, ainsi que pour son activité antimicrobienne démontrée contre diverses souches pathogènes [24,25]. De son côté, l'oxyde de pipériténone, identifiée dans certaines huiles de menthe, possède également des effets antioxydants et antimicrobiens [95].

La richesse chimique d'HE de *A.pinnata* est dominée par des hydrocarbures linéaires, des sesquiterpènes oxygénés, des alcools, des aldéhydes, des monoterpènes oxygénés et des acides gras qui lui confèrent un large éventail de propriétés pharmacologiques intéressantes. Ces composés sont susceptibles d'expliquer les effets antioxydants, antimicrobiens et anti-inflammatoires observés, suggérant un potentiel d'utilisation dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et thérapeutique.

Identification et analyse comparative du composé 13 par spectrométrie de masse :

Le composé 13 a été identifié comme un monoterpène oxygéné apparenté au géraniol (Figure III. 3), en se basant sur la comparaison des spectres de masse avec les bases de données. Une analyse plus fine du spectre du composé 13 révèle néanmoins quelques différences par rapport au spectre du géraniol standard (Figure III. 4).

Le pic de base du spectre du composé 13 est situé à $m/z = 43$, correspondant à un ion isopropyle $(CH_3)_2CH^+$, particulièrement stable. Ce fragment est courant dans la fragmentation des monoterpènes linéaires. En revanche, dans le spectre du géraniol, le pic dominant est souvent observé à $m/z = 41$, attribué à l'ion isopropényle $(CH_2=CCH_3^+)$. La présence marquée du $m/z = 43$ dans le composé 13, alors qu'il est de faible intensité chez le géraniol, suggère une fragmentation différente, possiblement liée à un réarrangement structural ou à une stabilité accrue de l'ion isopropyle dans le composé analysé. Cette variation peut refléter des différences subtiles dans la structure, comme la position des doubles liaisons ou la conformation de la chaîne carbonée. Le fragment à $m/z = 69$, typique d'une unité isoprénique (ion isoprenyl), est bien présent dans les deux spectres. Ce fragment est courant chez les monoterpènes et résulte du clivage entre deux unités isopréniques (Figure III. 5).

Le fragment à $m/z = 86$ pourrait provenir de la rupture d'une liaison proche du groupement aldéhyde ou d'une double liaison conjuguée, caractéristique de la structure du géraniol. De même, le fragment à $m/z = 109$, présent dans les deux spectres mais en intensité plus faible chez le géraniol, pourrait résulter de la perte d'un groupement éthényle, traduisant une légère différence dans le comportement de fragmentation entre les deux composés.

Par ailleurs, les indices de rétention des deux composés sont proches, avec 1281 pour le composé 13 et 1267 pour le géraniol, ce qui soutient l'hypothèse d'une structure très proche, possiblement un isomère ou un dérivé réarrangé du géraniol.

En résumé, les données spectrales et chromatographiques suggèrent que le composé 13 est un monoterpène oxygéné proche du géraniol, avec des différences subtiles dans la fragmentation traduisant une légère modification structurale.

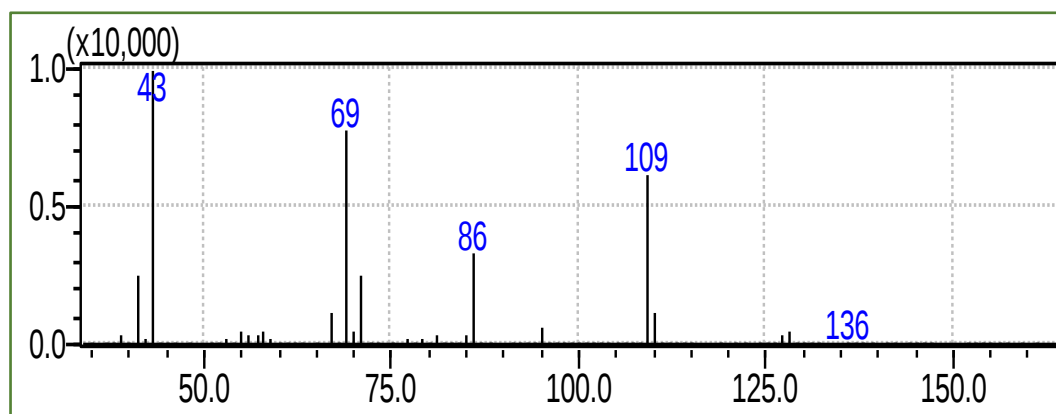


Figure III. 3:Spectre de masse du composé 13.

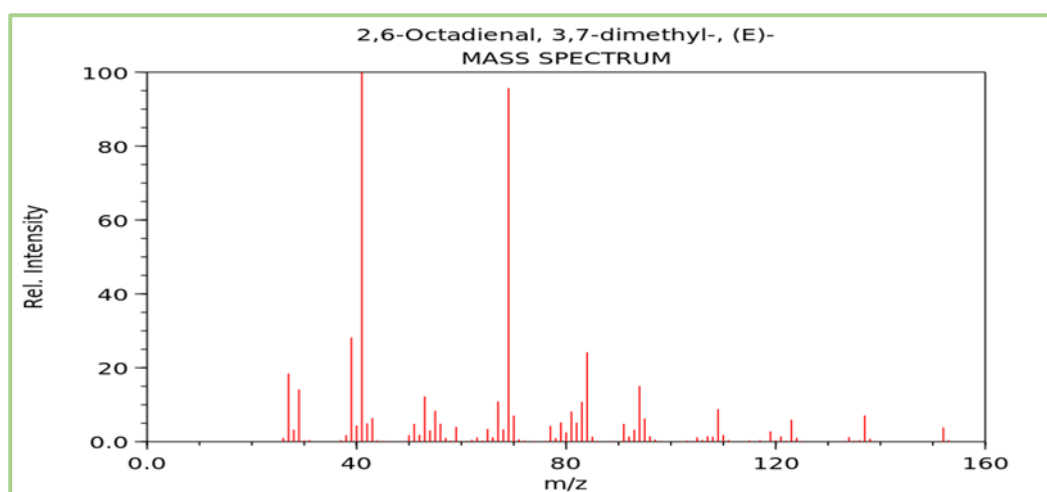


Figure III. 4:Spectre de masse de géranial [96].

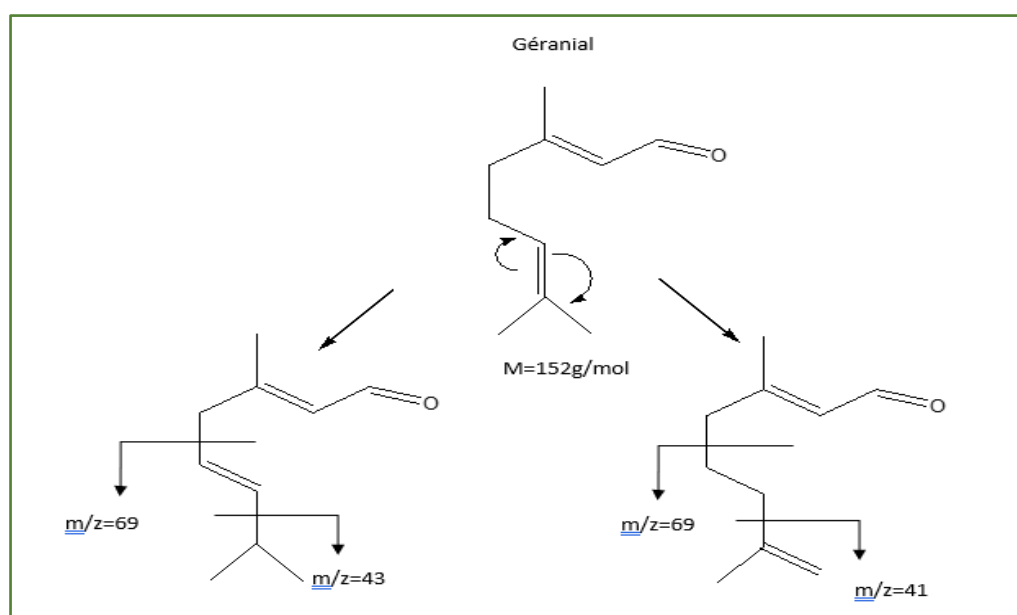


Figure III. 5: Schémas de fragmentation menant aux ions caractéristiques $m/z = 41$, 43 et 69.

III.6 Analyse des extraits et de l'HE d'*Azolla pinnata* par ATR-IRTF

III.6.1 Analyse des extraits d'*Azolla pinnata* par ATR-IRTF

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, associée à la réflexion totale atténuée (ATR-IRTF), s'impose comme une méthode rapide, sensible et non destructive pour la caractérisation des extraits naturels. Cette approche permet d'accéder à une empreinte spectrale globale de l'échantillon, révélant les principaux groupes fonctionnels par l'intermédiaire de leurs vibrations moléculaires spécifiques. Elle présente l'avantage de ne nécessiter aucune préparation complexe et peut être appliquée directement sur des extraits sous forme liquide, pâteuse ou solide, avec une très faible quantité de matière.

Le choix du solvant ou du mélange de solvants utilisé lors de l'extraction conditionne fortement la nature des composés extraits à partir d'un végétal. En effet, la solubilité des métabolites dépend principalement de leur polarité, ce qui rend la polarité du solvant déterminante dans le profil phytochimique obtenu. L'ajustement de la polarité du solvant selon les objectifs analytiques permet ainsi d'optimiser le rendement et la diversité chimique des extraits. Les spectres des extraits 1, 2, et 3 présentent des bandes de vibration similaires mais d'intensité moins dans le cas de l'extrait méthanolique (2). Le méthanol, solvant polaire, est particulièrement efficace pour solubiliser les polyphénols, flavonoïdes, tanins, acides phénoliques, saponines et alcaloïdes hydrosolubles [97]. Le mélange binaire CH_2Cl_2 : MeOH offre une polarité intermédiaire et permet d'enrichir et d'élargir le spectre des composés extraits. Ce mélange est couramment utilisé pour extraire à la fois des composés lipophiles et des substances modérément polaires. Ces trois spectres sont caractérisés par une bande large dans la région $3620\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$ résultant des vibrations des liaisons O–H des alcools et phénols. La bande faible à 3011 cm^{-1} est spécifique à la vibration $=\text{CH}$ des noyaux aromatiques. La région entre 3000 et 2800 cm^{-1} concerne les vibrations des liaisons C–H aliphatiques indiquant la présence de chaînes hydrocarbonées. La zone $1650\text{ -}1780\text{ cm}^{-1}$ correspondant à la vibration d'élongation de la liaison C=O dans les acides gras, aldéhydes et cétones. Les bandes situées à 1465 cm^{-1} et 1373 cm^{-1} sont respectivement attribuées aux déformations asymétrique et symétrique des groupes méthyles (CH_3). Dans la région comprise entre 1000 et 1300 cm^{-1} , les bandes observées traduisent principalement les vibrations d'élongation des liaisons C–O, fréquemment rencontrées dans les structures d'esters, d'alcools, d'acide carboxylique ou de composés phénoliques. Le spectre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) de l'extrait obtenu à partir d'un mélange eau : méthanol (50 :50, v/v) est différent des autres spectres (Figure III.6). Il met en évidence plusieurs bandes d'absorption caractéristiques, traduisant une

matrice chimique complexe dominée par des composés polaires, notamment des polyphénols, acides organiques, flavonoïdes glycosylés et, dans une moindre mesure, certains composés aliphatiques. Ces observations sont cohérentes avec les profils généralement rapportés pour ce type d'extraction [79,80]. Une bande d'absorption large, s'étendant de 3670 à 2600 cm^{-1} , est attribuée aux vibrations d'élongation de la liaison O–H, caractéristiques des groupements hydroxyles présents dans les phénols, les acides carboxyliques et autres composés hydrophiles. L'élargissement de cette bande est imputable aux liaisons hydrogène, fréquentes dans les extraits végétaux [99]. Deux épaules peu marquées à environ 2940 cm^{-1} et 2880 cm^{-1} correspondent aux vibrations C–H asymétrique et symétrique des groupes méthyle ($-\text{CH}_3$) et méthylène ($-\text{CH}_2-$). Leur faible intensité traduit une présence modérée de structures aliphatiques, probablement issues de certains acides gras ou terpènes [100].

Dans la région 1500–1780 cm^{-1} , une bande unique est observée, vraisemblablement issue de la superposition de plusieurs vibrations moléculaires. Cette zone comprend les vibrations d'élongation des liaisons C=O des acides, esters et cétones, ainsi que les vibrations C=C aromatiques ou conjuguées. Elle peut également inclure des contributions d'amides I et II, notamment en cas de présence de peptides ou d'alkaloïdes azotés [101].

Une autre bande, de moyenne intensité, est détectée entre 1235 et 1490 cm^{-1} . Elle regroupe diverses vibrations : déformations angulaires des liaisons C–H, vibrations C–N, ainsi que déformations en plan des groupes hydroxyles phénoliques. Cette région peut également accueillir des vibrations aromatiques secondaires, résultant de la structure substituée des cycles aromatiques des flavonoïdes, telles que décrites dans la littérature spectroscopique [99].

Enfin, une bande intense, localisée entre 1235 et 945 cm^{-1} , est attribuée aux vibrations d'élongation des liaisons C–O, caractéristiques des alcools, acides carboxyliques, esters ainsi que des groupements glycosidiques (C–O–C) présents dans les polyphénols glycosylés. L'intensité de cette bande est généralement corrélée à une forte teneur en composés hydrophiles oxygénés, tels que ceux retrouvés dans les extraits hydroalcooliques [97].

Dans l'ensemble, ce spectre met en évidence une composition dominée par des groupes hydroxyles, carbonyles, aromatiques et éther-oxygénés, ce qui reflète la nature polaire de l'extrait et confirme la présence majoritaire de composés phénoliques, flavonoïdes glycosylés, d'acides organiques et de constituants .

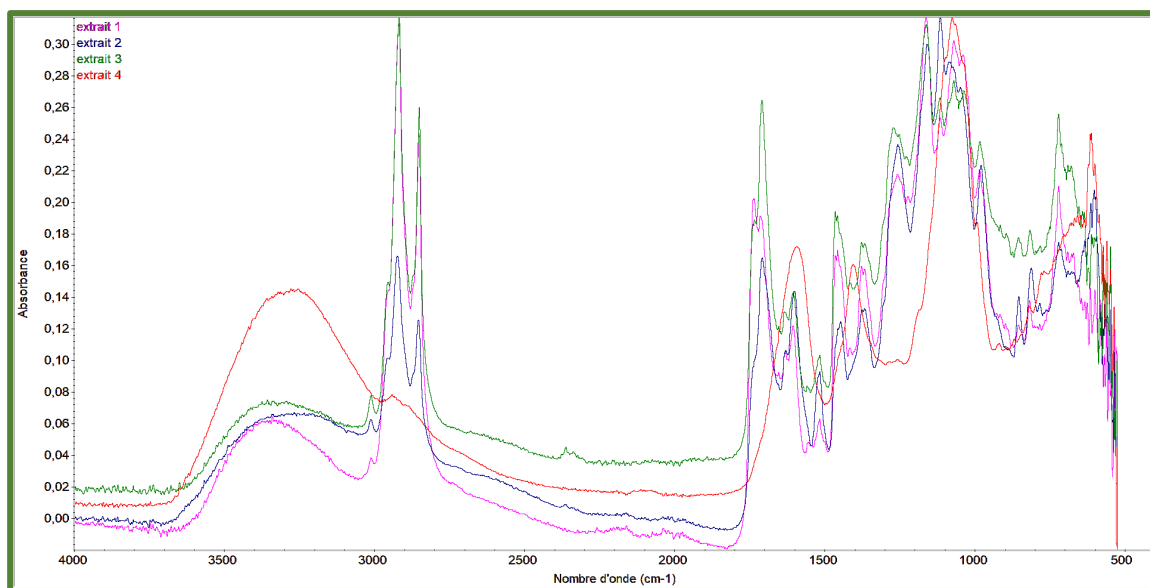


Figure III.6:Spectre ATR-FTIR des extraits d'*Azolla pinnata*.

III.6.2 Analyse de l'HE d'*Azolla pinnata* par spectroscopie ATR-IRTF

Bien que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) constitue la méthode de référence pour l'analyse détaillée des huiles essentielles, notamment en permettant l'identification et la quantification précise de leurs composés volatils, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) représente une technique complémentaire pertinente. L'analyse ATR - IRTF permet une analyse rapide, non destructive et sans préparation de l'échantillon, offrant une empreinte spectrale caractéristique basée sur les vibrations des liaisons chimiques. Le spectre infrarouge, exprimé en nombre d'onde (cm^{-1}), permet de mettre en évidence les groupes fonctionnels présents dans la matrice étudiée. Bien que moins spécifique que la CG-SM, l'IRTF constitue une méthode efficace pour la caractérisation globale des huiles essentielles, permettant d'évaluer leur composition fonctionnelle, leur pureté, ainsi que d'éventuelles modifications physico-chimiques.

Pour l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation (HD), le spectre infrarouge (Figure III. 7) présente une bande large autour de 3400 cm^{-1} , généralement attribuée aux vibrations d'élongation des liaisons O–H, caractéristiques des groupes hydroxyles présents dans les alcools et les phénols [98]. Les vibrations des liaisons C–H aliphatiques sont localisées entre 3000 et 2850 cm^{-1} , traduisant la présence de chaînes hydrocarbonées saturées, typiques des terpènes ou acides gras [99]. Une bande de moyenne intensité vers 1715 cm^{-1} est attribuée à la vibration d'élongation de la liaison C=O, présente dans les esters ou les cétones [100]. En outre,

les bandes situées dans la région $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons C–O, typiques des alcools, éthers ou esters.

Concernant l'huile essentielle obtenue par entraînement à la vapeur d'eau, l'analyse par spectroscopie IRTF (Figure III. 7) révèle également une bande large entre 3009 et 3600 cm^{-1} , attribuée principalement à la vibration des liaisons O–H, mais pouvant aussi inclure une contribution des liaisons N–H, notamment dans des structures azotées comme les pyrroles [100]. La bande faible à 3009 cm^{-1} est caractéristique de la vibration d'élongation de la liaison =C–H, observée dans les composés aromatiques ou alcéniques. Les bandes enregistrées entre 2990 et 2840 cm^{-1} sont caractéristiques.

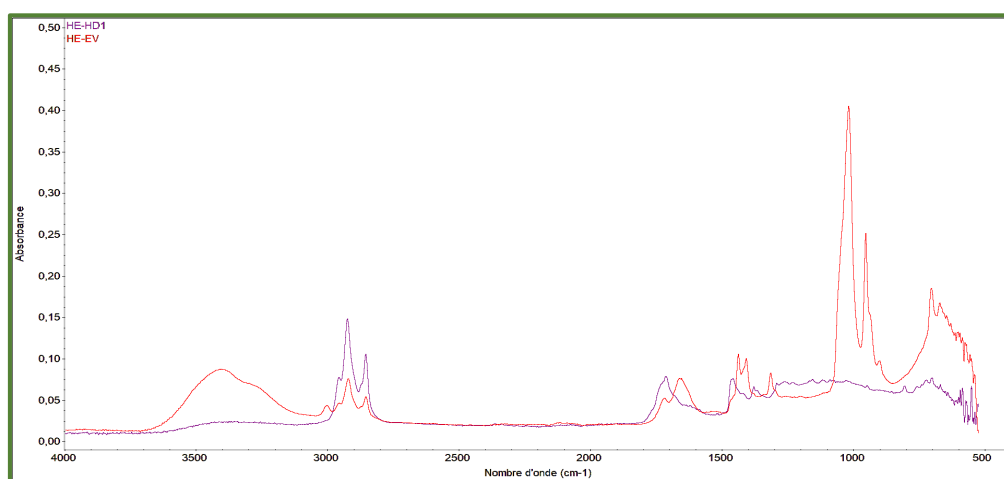


Figure III. 7: Spectre ATR-FTIR de l'huile essentielle d'*Azolla pinnata*

III.7 Activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *A. pinnata* a été réalisée par le test au radical DPPH, méthode largement utilisée pour mesurer la capacité des composés à neutraliser les radicaux libres. Trois échantillons ont été testés : l'extrait méthanolique, l'huile essentielle (HE) de plante achetée, et l'acide ascorbique en tant que standard antioxydant. La courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (Figuré III.8) a permis de déterminer une IC_{50} de $0,014\text{ mg/ml}$, indiquant une activité antioxydante très élevée. Cette efficacité est attribuée à sa structure chimique simple, la présence de plusieurs groupements hydroxyles, et sa forte solubilité dans les solvants polaires comme le méthanol, facilitant une réactivité rapide avec le radical DPPH. Les droites d'étalonnage d'extrait et de l'HE testés sont représentées dans la

(Figuré III.9) pour l'extrait méthanolique et la (Figuré III.10) pour l'huile essentielle. Leurs IC_{50} respectives témoignent de différences significatives de pouvoir antioxydant.

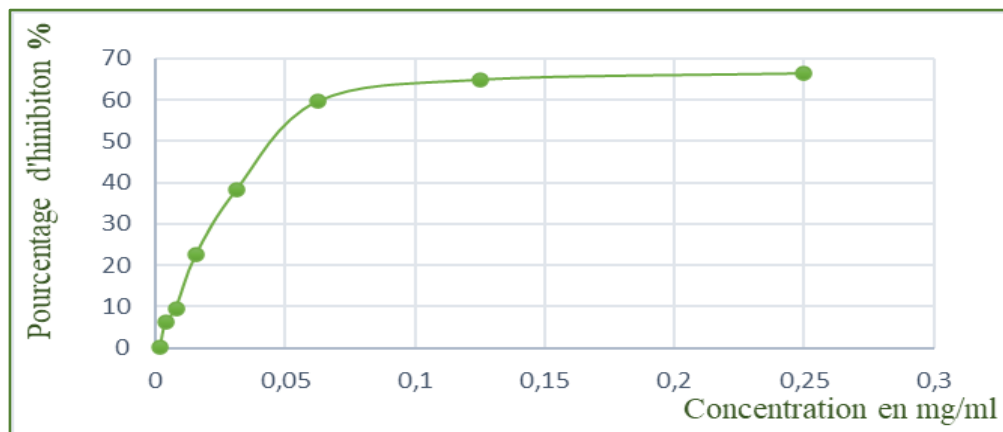


Figure III.8: Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique.

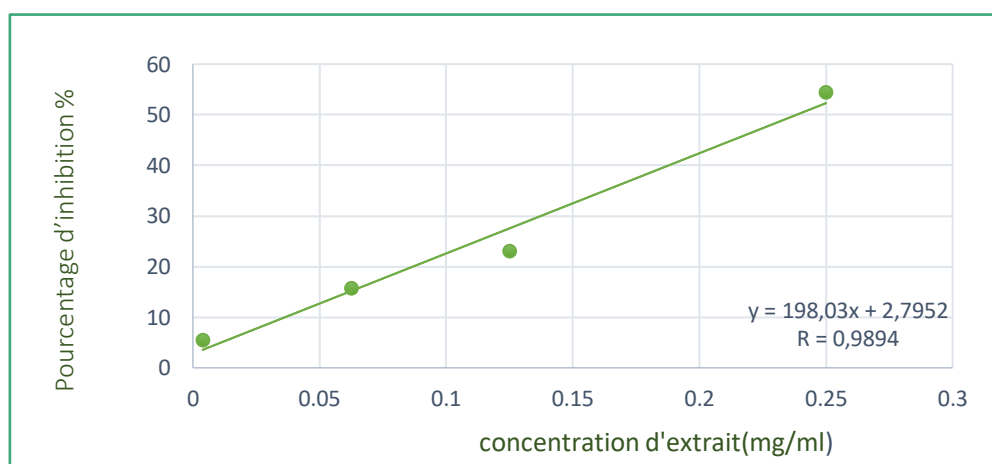


Figure III.9: Droite d'étalonnage extrait méthanolique.

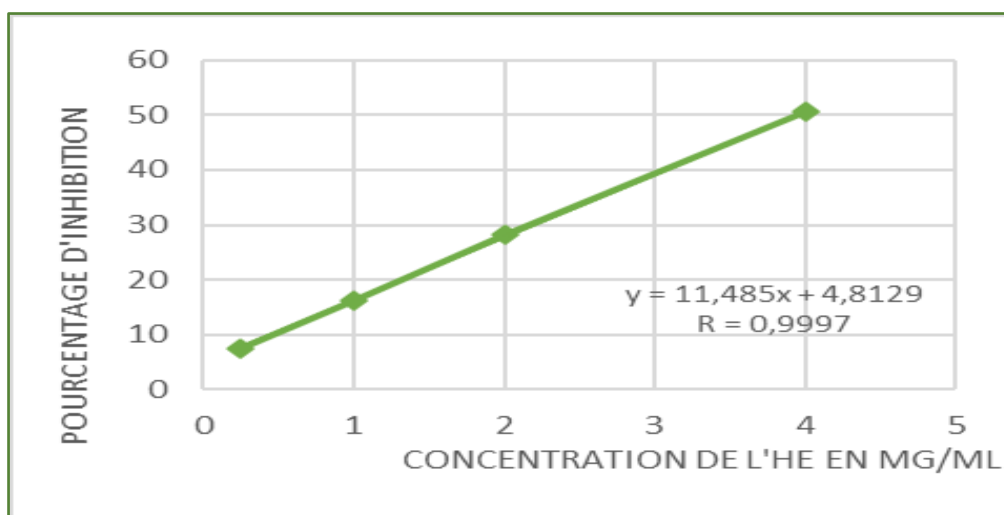


Figure III.10: Droite d'étalonnage de l'HE d'*Azolla pinnata*.

L'extrait méthanolique a montré une IC_{50} de 0.23 mg/mL, indiquant une activité antioxydante notable. Ce résultat s'explique par la présence de polyphénols, flavonoïdes et autres composés phénoliques capables de céder des électrons pour stabiliser les radicaux libres. Comparée à une étude antérieure ayant rapporté une IC_{50} de 7,32 mg/ml pour un extrait similaire, notre extrait se distingue par une efficacité supérieure, probablement en lien avec la richesse qualitative et quantitative des antioxydants extraits [102]. En revanche, l'huile essentielle de *A.pinnata* a présenté une IC_{50} de 3.94 mg/mL, traduisant une capacité antioxydante relativement faible. L'analyse CG-SM a révélé une composition dominée par des monoterpènes et sesquiterpènes majoritairement apolaires, peu réactifs avec le DPPH. Par ailleurs, leur faible solubilité dans le méthanol limite leur répartition homogène dans le milieu de réaction, réduisant leur accessibilité au radical libre. Une comparaison avec une autre plante aquatique, *Mentha aquatica*, montre que son huile essentielle présente une IC_{50} de 0,976 mg/ml, soit une activité antioxydante supérieure à celle de l'huile de *A.pinnata*. Cette différence pourrait être attribuée à une plus grande proportion de composés oxygénés actifs (alcools, phénols) dans l'huile de *Mentha aquatica* [103]. Ainsi, parmi les extraits étudiés, l'extrait méthanolique de *Azolla pinnata* s'est révélé être le plus prometteur en tant que source d'antioxydants naturels, surpassant nettement l'huile essentielle et se rapprochant des valeurs d'antioxydants standards.

III.8 L'activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de microdilution en microplaque, permettant de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits et l'HE contre quatre souches bactériennes : (PA), (EC), (SA) et (EF).

Les résultats obtenus sont présentés dans (Tableau III. 6) ainsi que sous forme graphique dans la (Figure III.11).

Tableau III. 6: CMI des extraits et l'HE de *A.pinnata* (mg/mL).

Souches bactériennes	CMI (mg/mL) E2	CMI (mg/mL) L'HE(B)	CMI (mg/mL) E4
(PA)	10	10	NC
(EC)	10	5	10
(SA)	10	0,156	10
(EF)	5	5	NC

NC : Aucune activité inhibitrice détectée à la concentration initiale testée (10 mg/mL).

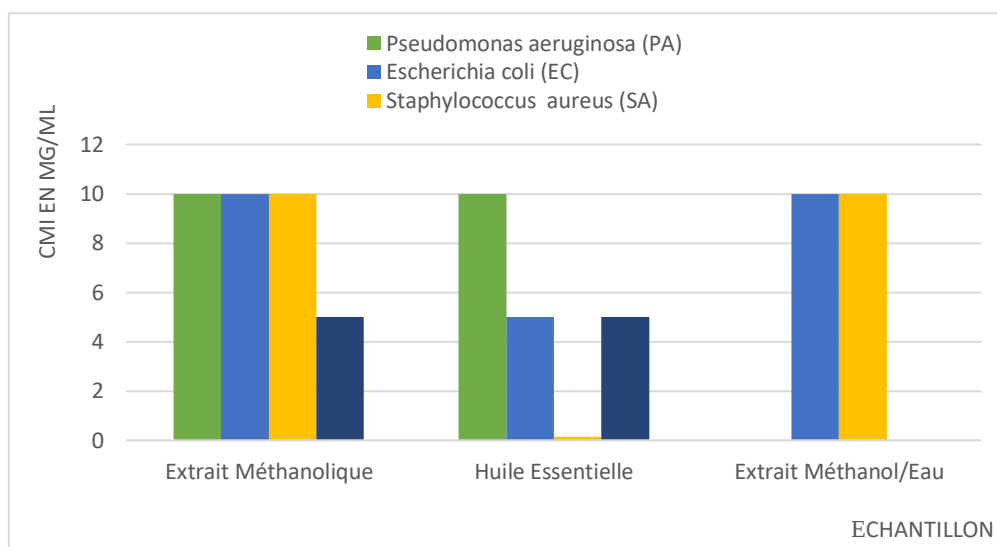


Figure III.11: CMI des échantillons de *A.pinnata* selon les bactéries ciblées.

Les résultats obtenus montrent que l'HE (B) de *A.pinnata* présente une activité antibactérienne la plus marquée parmi les échantillons analysés. Elle s'est révélée particulièrement efficace contre *Staphylococcus aureus*, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) très faible de 0.156 mg/mL, traduisant une forte sensibilité de cette bactérie Gram positive aux composés volatils présents dans l'huile. Une activité modérée a également été observée contre *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* (CMI = 5 mg/ml), tandis que l'efficacité reste plus limitée contre *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 10 mg/ml), souche réputée pour sa résistance naturelle à de nombreux agents antimicrobiens. En comparaison, l'HE de *Dillenia membranacea* a montré une forte activité antibactérienne contre *S. aureus* et *Agrobacterium tumefaciens*, avec une CMI de 1519 µg/mL (1.519 mg/mL) [104]. Cette valeur, bien que plus élevée que celle observée pour l'HE de *A.pinnata*, confirme l'intérêt des huiles essentielles végétales riches en composés volatils pour leur potentiel antimicrobien. La différence de CMI entre ces deux huiles peut s'expliquer par des variations dans leur composition chimique spécifique, influencée par les espèces végétales et les conditions d'extraction, ce qui modifie leur efficacité contre certaines souches bactériennes.

L'extrait (2) a présenté une activité modérée uniquement contre *E. faecalis* (CMI = 5 mg/mL), mais une efficacité plus faible contre les autres souches, avec des CMI de 10 mg/mL. Ces résultats suggèrent la présence de composés polaires ou semi-polaires bioactifs capables d'exercer une inhibition bactérienne partielle, en particulier contre les bactéries Gram positives. En comparaison, un extrait méthanolique de *Azolla* a montré une CMI de 0.125 mg/mL contre *S. aureus*, soit une efficacité nettement supérieure à celle observée dans notre cas (10 mg/mL), ce qui souligne l'influence des conditions d'extraction et de concentration des extraits [105].

L'extrait méthanol/eau a révélé une activité antibactérienne globalement faible, avec une absence d'effet inhibiteur contre *P. aeruginosa* et *E. faecalis*, et une CMI élevée de 10 mg/mL contre *E. coli* et *S. aureus*. Cette faible efficacité pourrait être due à une dilution des composés actifs ou à leur faible affinité pour ce type de solvant.

En conclusion, l'HE de *A. pinnata* se distingue par une forte activité antibactérienne, notamment contre *S. aureus*, en raison de sa richesse en composés volatils bioactifs, tandis que les extraits méthanolique et méthanol/eau présentent une efficacité plus limitée. La comparaison avec l'huile essentielle de *D. membranacea* confirme le potentiel prometteur des huiles essentielles végétales dans le développement d'agents antimicrobiens, sous réserve de prendre en compte la diversité chimique liée à chaque espèce.

Les résultats obtenus montrent que l'HE de *A. pinnata* présente l'activité antibactérienne la plus marquée parmi les extraits analysés. Elle s'est révélée particulièrement efficace contre *Staphylococcus aureus*, avec une CMI très faible de 0.156 mg/mL, traduisant une forte sensibilité de cette bactérie Gram positive aux composés volatils présents dans l'huile. Une activité modérée a également été observée contre *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* (CMI = 5 mg/mL), tandis que l'efficacité est restée plus limitée contre *Pseudomonas aeruginosa* (CMI = 10 mg/mL), souche réputée pour sa résistance naturelle à de nombreux antimicrobiens. L'extrait méthanolique a présenté une activité modérée uniquement contre *E. faecalis* (CMI = 5 mg/mL), mais une efficacité plus faible contre les autres souches, avec des CMI de 10 mg/mL. Ces résultats suggèrent la présence de composés polaires ou semi-polaires bioactifs, capables d'exercer une inhibition bactérienne partielle, en particulier contre les bactéries Gram positives. En comparaison avec la littérature [106], un extrait méthanolique de *Azolla* a montré dans une étude antérieure une CMI de 0.125 mg/mL contre *S. aureus*, soit une efficacité nettement supérieure à celle observée dans notre cas (10 mg/mL). Cette différence peut s'expliquer par des variations dans les conditions d'extraction ou dans la concentration initiale de l'extrait testé 100 mg/mL, soulignant l'importance des paramètres expérimentaux dans l'évaluation de l'activité antimicrobienne. L'extrait méthanol/eau a, quant à lui, révélé une activité antibactérienne globalement faible. Aucun effet inhibiteur n'a été observé contre *P. aeruginosa* ni *E. faecalis*, et une CMI élevée de 10 mg/mL a été enregistrée contre *E. coli* et *S. aureus*. Cette faible efficacité pourrait être attribuée à une dilution des composés actifs dans le solvant hydrométhanolique, ou à leur faible affinité pour ce type de mélange.

En conclusion, l'HE de *A.pinnata* se distingue par une forte activité antibactérienne, notamment contre *S. aureus*, en raison de sa richesse en composés actifs. Les extraits méthanolique et méthanol/eau, en revanche, présentent une efficacité plus limitée, avec des CMI plus élevées ou une absence d'effet selon les souches. Ces données confirment que le type d'extrait, la polarité des solvants, ainsi que la nature des micro-organismes ciblés, influencent fortement les résultats obtenus.

Conclusion

Conclusion

Le présent travail porte sur l'étude de la composition chimique, l'activité biologique et l'activité antioxydante de l'huile essentielle et des extraits d'*Azolla pinnata*. Deux échantillons d'*Azolla pinnata* sont utilisés l'un cultivé et l'autre achetée. Les taux d'humidité sont 5.61 % et 8.32 %, respectivement. Ce qui reflète une bonne stabilité des échantillons et leur aptitude à la conservation et à l'extraction. Cette variabilité entre les deux formes de la plante pourrait être attribuée aux conditions de séchage et de stockage. Les extraits sont préparés par macération dans un solvant ou un mélange de solvants organiques. Les rendements en extraits bruts varient entre 7.63 % et 13.08 %, témoignant d'un bon potentiel extractif selon la polarité du solvant utilisé. Ces résultats suggèrent que la nature du solvant influence significativement l'efficacité de l'extraction des composés bioactifs présents dans *Azolla pinnata*, en particulier les composés phénoliques et flavonoïdes.

En ce qui concerne les huiles essentielles, obtenues par hydrodistillation et entraînement à la vapeur, les rendements sont nettement plus faibles, de 0.01 % et 0.006 %, respectivement. Ce qui est commun pour ce type de plante. Malgré ce faible rendement l'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) révèle la présence de 36 composés dans l'huile essentielle extraite par entraînement à la vapeur, dont 32 ont pu être identifiés. Les composés majoritaires sont le heptadécane (22,04 %), le γ -costol (21,70 %), la 2-pentadécanone, 6, 10,14-triméthyl- (7,47 %) et le phytol (3,07 %), connus pour leurs propriétés biologiques intéressantes, notamment antimicrobiennes et antioxydantes. Quatre composés supplémentaires n'ont pas pu être identifiés, ce qui ouvre la voie à de futures investigations plus approfondies, notamment par des techniques complémentaires comme la HPLC, la RMN.

L'analyse par spectroscopie ATR-IRTF a complété ces résultats en révélant une empreinte chimique riche, marquée par la présence de groupes fonctionnels caractéristiques des composés polaires. Les spectres ont montré des bandes d'absorption attribuées aux liaisons O–H (3670–2600 cm^{-1}), aux C–H aliphatiques, ainsi qu'aux vibrations C=O, C=C aromatiques, C–N et C–O. Ces observations confirment la dominance de composés tels que les polyphénols, flavonoïdes glycosylés, acides organiques, alcools, esters et glycosides dans les extraits, notamment ceux obtenus avec des solvants polaires ou des mélanges eau/méthanol.

L'étude du potentiel antioxydant par la méthode de réduction du radical DPPH mis en évidence une activité notable de l'extrait méthanolique, avec une IC_{50} estimée à 0.23 mg/mL, traduisant

une bonne capacité de piégeage des radicaux libres. En comparaison, l'huile essentielle montre une activité plus faible ($IC_{50} = 3.93 \text{ mg/mL}$), ce qui s'explique probablement par la moindre concentration en composés phénoliques dans la fraction volatile. Ces résultats mettent en lumière l'intérêt particulier des extraits méthanoliques d'*Azolla pinnata* en tant qu'agents antioxydants potentiels .

Concernant l'activité antimicrobienne, les extraits bruts ont montré une efficacité variable contre quatre souches bactériennes *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) comprises entre 2.5 et 10 mg/mL. Cette diversité d'action montre que la composition chimique des extraits leur confère une certaine sélectivité vis-à-vis des microorganismes testés. L'huile essentielle, quant à elle, a montré une activité plus ciblée, principalement contre *Staphylococcus aureus*, avec une CMI de 0,156 mg/ml, soulignant son efficacité notable contre cette bactérie à Gram positif.

Les résultats obtenus dans cette étude soulignent le fort potentiel bioactif d'*Azolla pinnata*, aussi bien sur le plan antioxydant qu'antibactérien. Ces résultats confirment les usages traditionnels rapportés dans certaines cultures, et apportent une base scientifique crédible pour son utilisation future.

Références Bibliographiques

Références

- [1] Les plantes : leurs effets bénéfiques, et leurs risques. ResearchGate. Disponible sur : https://www.researchgate.net/publication/366311479_Les_plantes_leurs_effets_benefiques_et_leurs_risques (consulté le 7 juin 2025).
- [2] Jacob, M. M., Jom, M., Sherin, A., & Shahla, B. (2020). *Azolla pinnata: Potential phytoremediation, antimicrobial, and antioxidant applications*. Life Sciences and Applied Natural Sciences, 9(4), 1673–1679. <https://doi.org/10.33263/LIANBS94.16731679>
- [3] Oyedeleji A.A., Abowei J.F.N. *The Classification, Distribution, Control and Economic Importance of Aquatic Plants*. 2012.
- [4] Wersal, R. M., & Madsen, J. D. Aquatic plants: Their uses and risks – A review of the global status of aquatic plants
- [5] Gülçin, İ., Kireççi, E., Akkemik, E., Topal, F., & Hisar, O. (s.d.). Antioxidant and antimicrobial activities of an aquatic plant: Duckweed (*Lemna minor* L.).
- [6] Jacob, M. M., Jom, M., Sherin, A., & Shahla, B. (2020). *Azolla pinnata: Potential phytoremediation, antimicrobial, and antioxidant applications*. Life Sciences and Applied Natural Sciences, 9(4), 1673–1679. <https://doi.org/10.33263/LIANBS94.16731679>
- [7] Small, E., & Darbyshire, S. J. (2011). Trésors florissants de la biodiversité. 35. Fougères moustiques (espèces *Azolla*) – minuscules « super plantes ». *Biodiversité*, 12(2), 119–128
- [8] Adhikari K., Bhandari S., Acharya S. *An overview of Azolla in rice production: A review. Review in Food and Agriculture*, 2020, vol. 2, p. 04–08. <https://doi.org/10.26480/rfna.01.2021.04.08>
- [9] Ravi R., Husna Zulkarnin N.S., Rozhan N.N., Nik Yusoff N.R., Mat Rasat M.S., Ahmad M.I., et al. *Evaluation of Two Different Solvents for Azolla pinnata Extracts on Chemical Compositions and Larvicidal Activity against Aedes albopictus (Diptera: Culicidae)*. *Journal of Chemistry*, 2018, Article ID 7453816, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2018/7453816>
- [10] Mahyuddin H.S., Roshidi M.A.H., Ferdosh S., Noh A.L. *Antibacterial activity of compounds from Azolla pinnata extracted using Soxhlet and supercritical fluid (SFE) methods*. *Science Heritage Journal*, 2020, vol. 4, p. 09–12. <https://doi.org/10.26480/gws.01.2020.09.12>

- [11] Lumpkin T.A., Plucknett D.L. *Azolla: Botany, physiology, and use as a green manure. Economic Botany*, 1980, vol. 34, p. 111–153. <https://doi.org/10.1007/BF02858627>.
- [12] AquaPortail. *Azolla (genre)*. Disponible sur <https://www.aquaportail.com/especes/taxonomie/genre/36/Azolla> (consulté le 28 mai 2025).
- [13] Wagner G.M. *Azolla: A review of its biology and utilization. Botanical Review*, 1997, vol. 63, p. 1–26. <https://doi.org/10.1007/BF02857915>
- [14] Peters G.A. *Azolla-Anabaena symbioses: Basic biology, use, and prospects for the future*. In : Silver W.S., Schröder E.C. (éds). *Practical Applications of Azolla in Rice Production. Proceedings of the International Workshop, Mayaguez, Puerto Rico, November 17–19, 1982*. Dordrecht : Springer Netherlands, 1984, p. 1–14. https://doi.org/10.1007/978-94-009-6201-9_1
- [15] Techno-Science. *Azolla – Définition et explications*. Disponible sur : <https://www.techno-science.net/glossaire-definition/Azolla.html> (consulté le 27 mai 2025).
- [16] Reynaud P.-A., Franche C. *Azolla pinnata var. africana : de la biologie moléculaire aux applications agronomiques = From molecular biology to use as a green manure*.
- [17] Whitton, B. A., & Roger, P. A. (1989). Use of blue-green algae and *Azolla* in rice culture. In R. Campbell & R. M. Macdonald (Eds.), *Microbial inoculation of crop plants* (Vol. 25, pp. 89–100). Society for General Microbiology. IRL Press at Oxford University Press
- [18] van Hove C., Lejeune A. *Does Azolla have any future in agriculture ?* In : Rahman M., Podder A.K., Van Hove C., Begum Z.N.T., Heulin T., Hartmann A. (éds). *Biological Nitrogen Fixation Associated with Rice Production. Proceedings of the International Symposium, Dhaka, Bangladesh, 28 November – 2 December 1994*. Dordrecht : Springer Netherlands, 1996, p. 83–94. https://doi.org/10.1007/978-94-015-8670-2_10
- [19] Pillai, P. K., Premalatha, S., & Rajamony, S. (2005, September). *Azolla: A sustainable feed for livestock*. LEISA Magazine.
- [20] GISD. *Species Full Account: Azolla pinnata (ID 204)*. Global Invasive Species Database.
- [21] Rai P.K. *Wastewater Management through Biomass of Azolla pinnata: An Eco-Sustainable Approach. Ambio*, 2007, vol. 36, p. 426–428.

- [22] The *Azolla* Foundation. *Helping to reduce man-made climate change and provide biofertilizer, livestock feed, food and renewable energy anywhere in the world*. Disponible sur : <https://theAzollafoundation.org/> (consulté le 27 mai 2025).
- [23] IUCN. (2018). *The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T168790A120142955*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T168790A120142955.en>
- [24] BB, MdAHP, MSR, SUT, BCR. *Azolla (Azolla pinnata) as a feed ingredient in broiler ration*. *International Journal of Poultry Science*, 2001, vol. 1, p. 29–34. <https://doi.org/10.3923/ijps.2002.29.34>.
- [25] Reyes, O. S., & Fermin, A. C. (2003). Terrestrial leaf meals or freshwater aquatic fern as potential feed ingredients for farmed abalone *Haliotis asinina* (Linnaeus 1758). *Aquaculture Research*, 34(8), 593–599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2003.00846.x>
- [26] Basudha C.H., Vishwanath W. Formulated feed based on aquatic weed *Azolla* and fish meal for rearing medium carp *Osteobrama belangeri* (Valenciennes) 1997.
- [27] Bhuvaneswari S.S., Kumudha D., Prabha T., Sivakumar T. *Azolla pinnata* R. Br.: An aquatic macrophyte as a potential therapeutic candidate. *Annals of Phytomedicine International Journal*, 2022, vol. 11. <https://doi.org/10.54085/ap.2022.11.1.13>.
- [28] Cohen M.F., Williams J., Yamasaki H. Biodegradation of diesel fuel by an *Azolla*-derived bacterial consortium. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 2002, vol. 37, p. 1593–1606. <https://doi.org/10.1081/ESE-120015423>.
- [29] Gettys L. *Azolla pinnata* (mosquito fern). *CABI Compendium*, 2024. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.8120>.
- [30] Aziz Z.A.A., Ahmad A., Setapar S.H.M., Karakucuk A., Azim M.M., Lokhat D., et al. Essential oils: Extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential – A review. *Current Drug Metabolism*, 2018, vol. 19, p. 1100–1110. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180723144850>.
- [31] Turner B.L. *The Comps of Mexico: A systematic account of the family Asteraceae. Chapter 24, Subtribe Milleriinae*. Gruver, Texas: Texensis Publishing; 2017.

- [32] Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Scheffer J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 2008, vol. 23, p. 213–226. <https://doi.org/10.1002/ffj.1875>.
- [33] Coates J. Interpretation of infrared spectra, a practical approach. In: Meyers R.A. (éd.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1re éd., Wiley, 2000. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5606>.
- [34] Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 1995, vol. 28, p. 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- [35] Wiegand I., Hilpert K., Hancock R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 2008, vol. 3, p. 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>.
- [36] Hêdji, C. C., Kpoguè Gangbazo, D. N. S., Houinato, M., & Fiogbe, É. D. (2014, novembre). Valorisation de *Azolla spp.*, *Moringa oleifera*, son de riz, et de co-produits de volaille et de poisson en alimentation animale : Synthèse bibliographique. *Journal des Biosciences Appliquées*, 81(1), 72–77. <https://doi.org/10.4314/jab.v81i1.4>
- [37] BOUAZZA, Z. (2024). *Optimisation de l'extraction des biomolécules d'Azolla pinnata en vue de leur exploitation* [Mémoire de master, Université Abou-Bekr Belkaid – Tlemcen, Faculté des Sciences, Département de Chimie].
- [38] Ravi R., Zulkarnin N.S.H., Rozhan N.N., Nik Yusoff N.R., Mat Rasat M.S., Ahmad M.I., et al. Chemical composition and larvicidal activities of *Azolla pinnata* extracts against *Aedes* (Diptera: Culicidae). *PLOS ONE*, 2018, vol. 13, e0206982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206982>.
- [39] Bouattou K., Ali-Nehar A., Djamai W., Bekhouche K. Assessment of the biological activities of *Azolla pinnata* growing in the North-West of Algeria. *Bionatura Journal*, 2024, vol. 1, p. 1–19. <https://doi.org/10.70099/BJ/2024.01.03.14>.
- [40] Rajalakshmi K.S.V., Paari K.A. A comprehensive study on the assessment of chemically modified *Azolla pinnata* as a potential cadmium sequestering agent. *International Journal of Experimental Research and Review*, 2023, vol. 36, p. 1–19. <https://doi.org/10.52756/ijerr.2023.v36.001>.

- [41] Mahyuddin, H. S., & Roshidi, M. A. H. (2020, avril). Activité antibactérienne des composés d'*Azolla pinnata* extraits par les méthodes Soxhlet et fluide supercritique (SFE). *Revue du patrimoine scientifique*, 4(1), 9–12. <https://doi.org/10.26480/gws.01.2020.09.12>
- [42] Bouattou K., Ali-Nehar A., Djamai W., Bekhouche K. (2024). Assessment of the biological activities of *Azolla pinnata* growing in the North-West of Algeria. *Bionatura Journal*, 1, 1–19. <https://doi.org/10.70099/BJ/2024.01.03.14>
- [43] Nawaz, A. S. N., Junaid, S., Dileep, N., Rakesh, K. N., & Kekuda, T. R. P. (2014). Antioxidant activity of *Azolla pinnata* and *Azolla rubra* – A comparative study. *Scholars Academic Journal of Biosciences*, 2(10), 719–723. <https://www.saspublisher.com>
- [44] *Azolla pinnata*: Potential Phytoremediation, Antimicrobial, and Antioxidant Applications. (2020). *Letters in Applied NanoBioScience*, 9, 1673–1679. <https://doi.org/10.33263/LIANBS94.16731679>
- [45] Mangesh Kumar T.T., Tribhuwan Sharma A.G. (2017). In vitro Screening of Antibacterial Potentials of *Achyranthes aspera*, *Azolla pinnata* and *Cissus quadrangularis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6, 483–488. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.057>
- [46] El-Sherbiny, G. M., Moghannem, S. A. M., & Sharaf, M. H. (2017). Activités antimicrobiennes et cytotoxicité de l'extrait de *Sisymbrium irio* L. contre les bactéries multirésistantes aux médicaments (MDRB) et *Candida albicans*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 1–13. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.001>
- [47] Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- [48] El Amrani Zerrihi S., El Khalloufi F., Mugani R., El Mahdi R., Kasrati A., Soulaïmani B., et al. (2020). Seaweed Essential Oils as a New Source of Bioactive Compounds for Cyanobacteria Growth Control: Innovative Ecological Biocontrol Approach. *Toxins*, 12, 527. <https://doi.org/10.3390/toxins12080527>

- [49] Zhao Y., Fan Y.-Y., Yu W.-G., Wang J., Lu W., Song X.-Q. (2019). Ultrasound-Enhanced Subcritical Fluid Extraction of Essential Oil from *Nymphaea alba* var. and Its Antioxidant Activity. *Journal of AOAC International*, 102, 1448–1454. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0337>
- [50] Raina V.K., Srivastava S.K., Syamasunder K.V. (2003). Essential oil composition of *Acorus calamus* L. from the lower region of the Himalayas. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 18–20. <https://doi.org/10.1002/ffj.1136>
- [51] Khan, S., Khan, H., Ali, F., Ali, N., Khan, F. U., & Khan, S. U. (2015). Antioxidant, cholinesterase inhibition activities and essential oil analysis of *Nelumbo nucifera* seeds. *Natural Product Research*, 29(12), 1335–1338. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1055743>.
- [52] Analyse gravimétrique. (2023). Wikipédia. [Online] Available: https://fr.wikipedia.org/wiki/Analyse_gravimétrique
- [53] Rendements d'extraction et analyse quantitative. *Techniques de l'Ingénieur*. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/chromatographie-et-techniques-separatives-42385210/extraction-sur-phase-solide-pour-l-analyse-de-composes-organiques-p1420/rendements-d-extraction-et-analyse-quantitative-p1420niv10003.html> (accessed June 1, 2025)
- [54] Adams, R. P. (2017). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry* (5th ed.). Texensis Publishing.
- [55] Chimactiv - Ressources pédagogiques numériques interactives dans l'analyse chimique de milieux complexes. <https://chimactiv.agroparistech.fr/fr/aliments/antioxydant-dpph/principe> (accessed May 26, 2025)
- [56] Kowalska-Krochmal B., Dudek-Wicher R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens*, 10, 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- [57] Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). *Brock biology of microorganisms* (15th ed.). Pearson.
- [58] Adzman N., Goh S.J., Johari A., Zainal Alam M.N.H., Kamaruddin M.J. (2022). Preliminary study on *Azolla* cultivation and characterization for sustainable biomass source.

Journal of Physics: Conference Series, 2259, 012018. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2259/1/012018>

[59] SL CB. Assessment of the biological activities of *Azolla pinnata* growing in the North-West of Algeria. *Bionatura Journal*. n.d. <http://bionaturajournal.com/2024.01.03.14.html> (accessed February 10, 2025)

[60] SL CB. Assessment of the biological activities of *Azolla pinnata* growing in the North-West of Algeria. *Bionatura Journal*. n.d. <http://bionaturajournal.com/2024.01.03.14.html> (accessed February 10, 2025)

[61] [Velasco-Negueruela, A.](#) ; [Sanz, J.](#) ; [Pérez-Alonso, MJ](#) ; [Palá-Paúl, J.](#) , *Les composants volatils des parties aériennes de Melittis melissophyllum L. subsp. melissophyllum récolté en Espagne* , Botanica Complutensis , 2004, 28, 133-136.

[62] National Institute of Standards and Technology (NIST). Chemical WebBook: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=3391-86-4> (consulté le 7 juin 2025).

[63] Zeng Y.-X., Zhao C.-X., Liang Y.-Z., Yang H., Fang H.-Z., Yi L.-Z., Zeng Z.-D., "Comparative analysis of volatile components from Clematis species growing in China," *Analytica Chimica Acta*, vol. 595, n° 1-2, pp. 328–339, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.12.022>

[64] Lucero, M. E., Estell, R. E., & Fredrickson, E. L. (2003). The essential oil composition of *Psoralea scoparius* (A. Gray) Rydb. *Journal of Essential Oil Research*, 15(2), 108–111. <https://doi.org/10.1080/10412905.2003.9712083>.

[65] PubChem. Compound ID 5715-23-1. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5715-23-1> .

[66] Asuming W.A., Beauchamp P.S., Descalzo J.T., Dev B.C., Dev V., Frost S., Ma C.W., "Essential oil composition of four Lomatium Raf. species and their chemotaxonomy," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 33, n° 1, pp. 17–26, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.06.005>

[67] Radulovic N., Blagojevic P., Palic R., "Comparative study of the leaf volatiles of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. and *Vaccinium vitis-idaea* L. (Ericaceae)," *Molecules*, vol. 15, n° 9, pp. 6168–6185, 2010. <https://doi.org/10.3390/molecules15096168>

[68] Andriamaharavo N.R., *Retention Data*, NIST Mass Spectrometry Data Center, 2014 .

[69] PubChem. Piperitenone oxide. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piperitenone-oxide>.

- [70] Nickavar B., Salehi-Sormagi M.H., Amin Gh., Daneshtalab M., "Steam volatiles of *Vaccinium arctostaphylos*," *Pharmaceutical Biology*, vol. 40, n° 6, pp. 448–449, 2002. <https://doi.org/10.1076/phbi.40.6.448.8449>
- [71] Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Kyriakopoulou I., Mitaku S., Chinou I.B., "Essential oils of *Phlomis* species growing in Greece: chemical composition and antimicrobial activity," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 19, n° 4, pp. 320–324, 2004. <https://doi.org/10.1002/ffj.1305>
- [72] Ogunwande I.A., Flamini G., Cioni P.L., Omikorede O., Azeez R.A., Ayodele A.A., Kamil Y.O., "Aromatic plants growing in Nigeria: essential oil constituents of *Cassia alata* (Linn.) Roxb. and *Helianthus annuus* L.," *Records of Natural Products*, vol. 4, n° 4, pp. 211–217, 2010.
- [73] Shang C., Hu Y., Deng C., Hu K., "Rapid determination of volatile constituents of *Michelia alba* flowers by gas chromatography - mass spectrometry with solid-phase microextraction," *Journal of Chromatography A*, vol. 942, n° 1-2, pp. 283–288, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01382-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01382-6)
- [74] Hazzit M., Baaliouamer A., Faleiro M.L., Miguel M.G., "Composition of the Essential Oils of *Thymus* and *Origanum* Species from Algeria and Their Antioxidant and Antimicrobial Activities," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 54, n° 17, pp. 6314–6321, 2006. <https://doi.org/10.1021/jf0606104>
- [75] Rout P.K., Rao Y.R., Sree A., Naik S.N., "Composition of essential oil, concrete, absolute, wax and headspace volatiles of *Murraya paniculata* (Linn.) Jack flowers," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 22, n° 5, pp. 352–357, 2007. <https://doi.org/10.1002/ffj.1804>
- [76] PubChem. Palmitoleic acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Palmitoleic-acid>.
- [77] Asuming W.A., Beauchamp P.S., Descalzo J.T., Dev B.C., Dev V., Frost S., et al., "Composition en huiles essentielles de quatre espèces de *Lomatium* Raf. et leur chimiotaxonomie," *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 33, pp. 17–26, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.06.005>
- [78] Kukic J., Petrovic S., Pavlovic M., Couladis M., Tzakou O., Niketic M., "Composition of essential oil of *Stachys alpina* L. ssp *dinarica* Murb.," *Flavour and Fragrance Journal*, vol. 21, n° 3, pp. 539–542, 2006. <https://doi.org/10.1002/ffj.1684>
- [79] PubChem. Heptadecane. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/12398> (consulté le 27 mai 2025).
- [80] ScienceDirect Topics. Heptadécane : aperçu. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/heptadecane> (consulté le 27 mai 2025).

- [81] Shkondrov A., Ivanova A., Kondeva-Burdina M., Krasteva I., "Essential oil in *Phlomis tuberosa*," *Pharmacia*, vol. 70, pp. 61–65, 2023. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.70.e97050>
- [82] Hexahydrofarnesyl acetone. GLP Bio. Disponible sur : <https://www.glpbio.com/fr/hexahydrofarnesyl-acetone.html> (consulté le 27 mai 2025).
- [83] Hexahydrofarnesyl acetone (6,10,14-Trimethyl-2-pentadecanone) | Bioactive Sesquiterpene. MedChemExpress. Disponible sur : <https://www.medchemexpress.com/hexahydrofarnesyl-acetone.html> (consulté le 27 mai 2025).
- [84] PHYTOL: A Phytoconstituent, Its Chemistry and Pharmacological Actions. ResearchGate. Disponible sur : https://www.researchgate.net/publication/348351025_phytol_a_phytoconstituent_its_chemistry_and_pharmacological_actions (consulté le 26 mai 2025).
- [85] Islam MT, Ayatollahi SA, Zihad SMNK, Sifat N, Khan MR, Paul A, et al. Phytol anti-inflammatory activity: Pre-clinical assessment and possible mechanism of action elucidation. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr.* 2020;66:264–269.
- [86] Kyoui D, Saito Y, Takahashi A, Tanaka G, Yoshida R, Maegaki Y, et al. Antibacterial Activity of Hexanol Vapor In Vitro and on the Surface of Vegetables. *Foods.* 2023;12:3097. <https://doi.org/10.3390/foods12163097>.
- [87] Jirovetz L, Buchbauer G, Schmidt E, Denkova Z, Slavchev A, Stoyanova A, et al. Purity, Antimicrobial Activities and Olfactory Evaluations of 2-Phenylethanol and Some Derivatives. *J Essent Oil Res.* 2008;20:82–85. <https://doi.org/10.1080/10412905.2008.9699429>.
- [88] Li S-F, Zhang S-B, Lv Y-Y, Zhai H-C, Hu Y-S, Cai J-P. L'heptanal inhibe la croissance d'*Aspergillus flavus* en perturbant l'intégrité de la membrane plasmique, la fonction mitochondriale et l'activité enzymatique antioxydante. *LWT.* 2022;154:112655. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112655>.
- [89] Ma W, Zhao L, Johnson ET, Xie Y, Zhang M. Natural food flavour (E)-2-hexenal, a potential antifungal agent, induces mitochondria-mediated apoptosis in *Aspergillus flavus* conidia via a ROS-dependent pathway. *Int J Food Microbiol.* 2022;370:109633. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109633>.

- [90] Phénylacétaldéhyde, 95 %. Thermo Scientific Chemicals. Disponible sur : <https://www.fishersci.fr/shop/products/phenylacetaldehyde-95-thermo-scientific/11404040> (consulté le 27 mai 2025).
- [91] **Calder, P. C. (2006).** Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 75(3), 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.05.012>
- [92] Acides gras essentiels. Zoelho. Disponible sur : https://www.zoelho.com/zoelho/fr/publish/Basiselementen/Voedingsstoffen/Lipiden/Essenti%C3%ABle_vetzuren.htm (consulté le 27 mai 2025).
- [93] Safranal: aperçu. ScienceDirect. Disponible sur : <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/safranal> (consulté le 27 mai 2025).
- [94] Hosseinzadeh, H., & Nassiri-Asl, M. (2013). Avicenna's (Ibn Sina) the Canon of Medicine and saffron (*Crocus sativus*): A review of potential therapeutic effects. *Phytotherapy Research*, 27(4), 475–483. <https://doi.org/10.1002/ptr.4784>.
- [95] Brada M, Bezzina M, Marlier M, Carlier A, Lognay G. Variabilité de la composition chimique des huiles essentielles de *Mentha rotundifolia* du Nord de l'Algérie. BASE. 2007.
- [96] Article référencé sous code 1-s2.0-S1021949813001348-main (détails non disponibles).
- [97] Azwanida NN. A review on the extraction methods used in medicinal plants: Principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*. 2015;4(3):196. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>.
- [98] Stuart B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Wiley; 2004.
- [99] Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. *Introduction to Spectroscopy*. 5e éd. Cengage Learning; 2015.
- [100] Silverstein RM, Webster FX, Kiemle DJ. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 8e éd. Wiley; 2014.
- [101] Nawaz ASN, Junaid S, Dileep N, Rakesh KN, Kekuda TRP. Antioxidant activity of *Azolla pinnata* and *Azolla rubra* – A comparative study. *Scholars Academic Journal of Biosciences*. 2014;2(10):719–723. <https://doi.org/10.36347/sajb.2014.v02i10.013>.

- [102] Mahboub N, Slimani N, Benine R, Redouani K, Khelil A. Physicochemical and biological characterization of essential oils extracted from a medicinal plant (*Mentha aquatica*) in the region of El Oued. *International Journal of Sciences and Research*. 2020;76(2/1):47–53. <https://doi.org/10.21506/j.ponte.2020.2.4>.
- [103] Riad N, Zahi MR, Trovato E, Bouzidi N, Daghbouche Y, Utczás M, et al. Chemical screening and antibacterial activity of essential oil and volatile fraction of *Dictyopteris polypodioides*. *Microchem J*. 2020;152:104415. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104415>.
- [104] Antibacterial activity of compounds from *Azolla pinnata* extracted using Soxhlet and supercritical fluid (SFE) methods. researchgate. disponible sur : https://www.researchgate.net/publication/348267613_antibacterial_activity_of_compounds_from_Azolla_pinnata_extracted_using_soxhlet_and_supercritical_fluid_sfe_methods (consulté le 28 mai 2025).
- [105] Mahyuddin HS, Roshidi MAH, Ferdosh S, Noh AL. Antibacterial activity of compounds from *Azolla pinnata* extracted using Soxhlet and supercritical fluid (SFE) methods. *Sci Herit J*. 2020;4:09–12. <https://doi.org/10.26480/gws.01.2020.09.12>.
- [106] AccessAgriculture. (2016). *Culture de l'Azolla pour l'alimentation des animaux*. AccessAgriculture. <https://www.accessagriculture.org/fr/culture-de-lAzolla-pour-lalimentation-des-animaux>