

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد بوضياف - المسيلة
Université Mohamed Boudiaf - M'Sila

FACULTE SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES
AGRONOMIQUES
N° : 54/DSA/2022



DOMAINE : SCIENCES DE LA NATURE
ET DE LA VIE
FILIERE : SCIENCES AGRONOMIQUES
OPTION : PRODUCTION VEGETALE

**Mémoire présenté pour l'obtention
du diplôme de Master Académique**

par: BERBACHE Amina Chaima

RADAOUI Nora Safa

TRICHE Faris

Intitulé

**Effet de stress salin sur la culture
et les principes actifs d'*Azolla pinnata*.**

Le jury est composé de :

Mr. TORCHIT Nadir	MAA	Université Med BOUDIAF- M'SILA	Président
Mme. MAHMOUDI Souhila	MCA	Université Med BOUDIAF - M'SILA	Rapporteur
Mme. BENAMIROUCHE Karima	MCB	CRAPC	Co-rapporteur
Mme. TIR Chafia	MAA	Université Med BOUDIAF- M'SILA	Examineur

Année Universitaire : 2021 /2022

Remerciements

Nous tenons à remercier le Dieu le tout puissant pour le courage, la force, la volonté et la santé qu'il nous a donné afin de réaliser ce mémoire.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre promotrice madame **Mahmoudi S.**, enseignante au département de sciences agronomiques, Université Mohamed Boudiaf de M'sila, qui était toujours présente avec nous dans tous les petits et grands détails, et pour tout le soutien et les conseils qu'elle nous a fournis, et pour sa gentillesse.

Nous remercions également le président du jury monsieur **Torchit N.**, enseignant au département de sciences agronomiques, Université Mohamed Boudiaf de M'sila pour avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

Nos sincères remerciements vont à madame **Tir C.**, enseignante au département de sciences agronomiques, Université Mohamed Boudiaf de M'sila pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous remercions également madame **Maghni F.** et tous les ingénieurs des laboratoires de la Faculté des sciences, en particulier les laboratoires des sciences agronomiques : mesdames et messieurs :

Chahra, Wassila, Asmaa, Samia, Amina et Merzaka, Yassine, Hicham et Radwan ; pour votre disponibilité, coopération et pour vos conseils, ainsi que pour votre gentillesse envers nous.

Nous ne manquerons pas de remercier particulièrement tous les enseignants de notre université pour nous avoir formés.

A travers ce mémoire nous remercions tous ceux et celle qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à la source de mon bonheur, la joie de mes yeux, et mon lien à mon frère, mon ami, mon modèle dans la vie, à l'homme qui se tient toujours derrière mon succès derrière mes encouragements, à mon cher père, **Ali Radaoui**.

Je dédie également mon travail à la bien-aimée de mon cœur, à ma moitié, à ma vie, à la meilleure et la plus merveilleuse femme de l'univers, à qui elle était avec moi dans tous petits et grands, à ma mère bien-aimée **Maatougui Ardjouna**.

Et bien sûr à celui avec qui j'ai grandi et ri et vécu avec lui les détails de ma vie au mur qui ne mène pas à mon pilier à mon cher frère **Hakim** et sa femme **Noura**.

Aux fruits de la maison et sa saveur particulière **Riham** et **Layane**. A ma chérie **Zouina** et ma cousine **Lamia**. A ma sœur **Hamida**, ma petite amie et l'autre moitié de mon cœur **Samah**, cher oncle **El- Bachir** et sa femme **Nesrine** (ma sœur et ma copine).

Je dédie ce travail à l'âme pure qui nous a quitté ma chère tante **Marzaka** et ma grand-mère **Maatougui Sarhouda**, ma grand-mère **Al-Zina Aouiche** et **Hadda Maatougui**

Au plus beau de mes coquillages à mes sœurs qui la vie m'a donné à **Khawla**, **Omaïma**, **Khawla**, **Jaouida**, **Doaâ**, **Alaâ**, **Zahra**. A mes amis à l'université : **Saadouna**, **Sabrina**, **Amina Chaïma**, **Souad**, **Asma**, **Amira**, **Chahra**, **lamiss**, **Hadil**, **Belkis**, **yousra**, **Assia**, **Aziza**, **Iman**, **Sarah**, **Lydia**.

A mes cousines au sommet : **ma chérie Souria**, **Samiha**, **chahraa**, **samra**, **sadjida**, **dalal**, **meriem**, **kamilia**, **Bouchra** et **ma chère tante Hayet**.

A tous ceux qui portent le Nom de **Radaoui** et **Maatougui**

À tous mes collègues de la promotion master 2 PDV, département de sciences agronomiques 2022.

À tous ceux qui sont tombés de ma mémoire par inadvertance À tous ceux qui étaient capables de mon cœur et ne correspondaient pas à cette page

Safa

Dédicace

Je remercie Allah de m'avoir donné la force et le courage pour pouvoir réaliser ce modeste travail.

Je dédie ce mémoire en premier lieu à mes très chers parents “**Noureddine** “ et “**Aicha** “.

A ma mère, mon exemple, qui a toujours été présente pour moi quelques soit les situations, qui m'a toujours soutenue, aidée, encouragée, et qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Sans elle je n'aurais jamais réussi, je sais que je ne pourrais jamais assez la remercier, alors j'espère qu'elle trouvera dans ce modeste travail un début de ma gratitude.

Je dédie mon modeste travail à l'âme pure de mon grand-père “ **Mohamed** “.

A mon seul frère “ **Mohamed** “.

Je dédie le fruit de ma réussite à mon compagnon de vie, mon soutien et mon épaule mon fiancé “**Oussama**”.

A ma famille “**Berbache**” et “ **Guia**”.

A mes amis “ **Nahla** “ , “ **Messouda** “ et “ **safa** “ .

Amina

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents, pour leurs sacrifices, et qui n'ont jamais cessé de m'encourager qu'Allah me les garde.

Mes très chères sœurs

Mon cher frère

Toute ma famille

Tous mes amis et collègues sans exception.

Fares

Résumé

Afin de connaître l'effet de la salinité sur le taux de croissance et les principes actifs d'*Azolla pinnata* nous avons cultivé cette fougère dans la solution de Hoagland sans NaCl (témoin) et dans la solution de Hoagland à 10, 20 et 30 mmol de NaCl (expérimentales). Les cultures ont été suivies durant 10 jours dans une chambre de culture puis les taux de croissances, la matière sèche et les cendre totales ont été déterminées. Les principes actifs ont été extraits par macération et le rendement d'extraction, les polyphénols totaux, les flavonoïdes, les tanins et l'activité antioxydante ont été estimés. Les résultats obtenus montrent que l'augmentation de la salinité dans le milieu de culture diminue le taux de croissance d'*Azolla pinnata*. En revanche, elle augmente le taux de matière sèche et de cendres totales dans cette fougère. La salinité augmente les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes et l'activité antioxydante de la fougère jusqu'à 20 mmol puis une diminution dans ces paramètres a été observée.

Mots clés : *Azolla pinnata*, salinité, taux de croissance, principes actifs.

Abstract

In order to know the effect of salinity on the growth rate and the active compounds of *Azolla Pinnata* we have grown this fern in the solution of Hoagland without NaCl (witness) and in the Hoagland solution at 10, 20 and 30Mm of NaCl (experimental). Cultures were followed for 10 days in a culture chamber and the rates of growth, the dry matter and the total ashes were determined. The active principles were extracted by the maceration; the extraction yields, flavonoids, tannins, and antioxidant activity were estimated. Data showed that the increase in salinity in the culture medium reduces the growth rate of this fern. However, salinity increases phenolic and flavonoid contents and the antioxidant activity up to 20 mmol and a decrease in these parameters has been observed.

Keywords: *Azolla Pinnata*, Salinity, growth rate, active compounds.

الملخص

من أجل معرفة تأثير الملوحة على معدل النمو والمكونات النشطة من أزولا بيناتا قد قمنا بزراعة هذا السرخس في محلول هوغلاند بدون كلوريد الصوديوم (شاهد) و في محلول هوغلاند بكلوريد الصوديوم 10 و 20 و 30 ممول من NaCl (التجريبية). تابعتنا الزراعات لمدة 10 أيام في غرفة الزراعة ثم تم تحديد معدلات النمو والمادة الجافة والرماد. وقد تم استخراج المكونات النشطة بالنقع وحساب محصول المستخلص. تم تقدير النشاط الكلي لمركبات البوليفينول والفلافونويد والعفص ومضادات الأكسدة. ، بينت النتائج المتحصل عليها أن زيادة الملوحة في الوسط الزراعي تقلل من معدل نمو نبات أزولا بيناتا من ناحية أخرى ، فإنه يزيد من معدل المادة الجافة والرماد الكلي في هذا السرخس. تزيد الملوحة من محتوى البوليفينول والفلافونويد الكلي ونشاط مضادات الأكسدة في السرخس حتى 20 ملي مول ثم لوحظ انخفاض بعد هذه المعايير.

الكلمات المفتاحية: أزولا بيناتا ، الملوحة ، معدل النمو ، المواد الفعالة.

Liste de figures

Figure 1 : Taxonomie du genre <i>Azolla</i>	3
Figure 2 : Plan d' <i>Azolla Pinnata</i>	4
Figure 3 : Cycle de vie d' <i>Azolla</i> montrant divers stades de développement	6
Figure 4 : Mécanismes naturels de salinisation des eaux de surface et souterraines ...	14
Figure 5 : Pré- culture d' <i>Azolla pinnata</i> dans un milieu naturel	17
Figure 6 : Mise en culture d' <i>Azolla pinnata</i> de la solution de Hoagland ¼ sans azote	18
Figure 7 : Mise en culture d' <i>Azolla pinnata</i> dans la solution de Hoagland ¼ sans azote et dans les solutions salées.....	19
Figure 8 : Taux de croissance d' <i>Azolla pinnata</i>	24
Figure 9 : Rendement d'extraction des polyphénols d' <i>Azolla pinnata</i>	26
Figure 10 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	27
Figure 11 : Teneurs en polyphénols totaux	27
Figure 12 : Courbe d'étalonnage de quercétine	28
Figure 13 : Teneurs en flavonoïdes	29
Figure 14 : Courbe d'étalonnage de catéchol.....	30
Figure 15 : Teneurs en tanins	30
Figure 16 : Activité antioxydante des extraits d' <i>Azolla pinnata</i>	31

Liste de Tableaux

Tableau 1 : Taux de matière sèche d' <i>Azolla pinnata</i>	25
Tableau 2 : Taux de cendres totales d' <i>Azolla pinnata</i>	25

Liste des abréviations

P : phosphor

K : potassium

Ca : calcium

Mg : magnésium

Fe : fer

Mo : matière organique

CT : cendre totale

MS : matière sèche

Mmol : milimole

NaCl : chlore sodium

R : le rendement en %

MR_{ext} : la masse de l'extrait après évaporation du solvant

MR_{éch} : la masse de l'échantillon avant extraction

MI : Masse en grammes, du creuset et du résidu après séchage et refroidissement.

MO : Masse en grammes, du creuset vide

M : Masse de la prise d'essai en gramme.

A_{antiox} : activité antioxydante (%).

A₀ : densité optique du contrôle (nm).

A_s : densité optique de l'échantillon (nm)

Table des matières

Remerciements	
Résumés	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	01
Chapitre 1 : <i>Azolla pinnata</i> et stress salin	
1.1. <i>Azolla pinnata</i>	02
1.1.1. Taxonomie, origine et diversité	02
1.1.2. Description	03
1.1.3. Reproduction	05
1.1.4. Conditions de culture.....	06
1.1.4.1. Eau.....	07
1.1.4.2. Température	07
1.1.4.3. pH.....	07
1.1.4.4. Lumière.....	07
1.1.4.5. Nutriments	08
1.1.5. Composition chimique.....	08
1.1.6. Utilisation.....	09
1.1.6.1. Fertilisation du sol	09
1.1.6.2. Alimentation humaine	09
1.1.6.3. Alimentation animale	09
1.1.6.4. Utilisation thérapeutique	10
1.1.6.5. Dépollution des milieux.....	10
1.1.6.6. Production de la bioénergie.....	11
1.2. Salinité et stress salin.....	11
1.2.1. Définition	11
1.2.2. Types de salinisation	11
1.2.2.1. Salinisation naturelle	11
1.2.2.2. Salinisation anthropique	12
1.2.2.3. Effet de la salinité sur les plantes	12

1.2.3 salinisation des eaux.....	14
1.2.4. Effet de la salinité sur <i>Azolla pinnata</i>	15

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1. Matériel et réactifs	16
2.2. Méthodes.....	16
2.2.1. Pré- culture d' <i>Azolla pinnata</i>	16
2.2.2 Culture d' <i>Azolla pinnata</i>	18
2.2.3 Mesure de taux de croissance	19
2.2.4 Taux de matière sèche	20
2.2.5 Cendre Totales	20
2.2.6 Extraction des polyphénols	20
2.2.7 Rendement d'extraction.....	21
2.2.8 Dosage des polyphénols.....	21
2.2.9 Dosage des flavonoïdes.....	22
2.2.10 Dosage des tanins	22
2.2.11 Activité antioxydante	23

Chapitre 3 : Résultats et discussion

3.1 Taux de croissance.....	24
3.2 Taux de matière sèche	25
3.3 Taux de cendres totales.....	24
3.4 Rendement d'extraction des polyphénols.....	26
3.5 Teneurs en polyphénols totaux.....	26
3.6 Teneur en flavonoïdes	28
3.7 Teneur en tanins.....	29
3.8 Activité antioxydante.....	31
Conclusion.....	32

Références bibliographiques

Introduction

Azolla pinnata est une fougère aquatique, flottant à la surface des eaux calmes, tempérées ou tropicales, dans les cressonnières, les rizières, les étangs et dans les canaux d'irrigation. Elle abrite une cyanobactérie du genre *Anabaena* qui a la propriété de fixer l'azote, c'est-à-dire de transformer l'azote moléculaire de l'atmosphère en azote fixé assimilable par la plante (**Reynaud et Franche, 1985 ; Raelina, 1995**).

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

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

La salinité est l'un des stress abiotiques majeurs qui affecte la production végétale. Le stress oxydant qui lui est souvent associé est causé par la formation excessive d'espèces oxygénées réactives. L'un des mécanismes de défense non enzymatiques contre ce stress que les plantes adoptent est la production de composés phénoliques considérés comme antioxydants (**Zitouni, 2015**).

L'objectif de notre travail est d'évaluer l'effet de stress salin sur le taux de croissance et les polyphénols d'*Azolla pinnata*.

Ce mémoire est subdivisé en deux parties : une bibliographie qui porte sur des généralités sur *Azolla pinnata* et le stress salin et une partie expérimentale qui résume les principaux méthodes utilisées et résultats obtenus.

Chapitre 1

Azolla pinnata et stress salin

1.1 *Azolla pinnata*

1.1.1 Taxonomie, origine et diversité

Selon **Reynaud et Franche (1985)**, le genre *Azolla* appartient à la division des Ptéridophytes, ordre des Salviniales, famille des Azollaceae (Figure 1). Il existe 6 espèces, qui, en fonction de critères morphologiques (morphologie des formes végétatives - frondes- et des organes reproducteurs), sont divisées en deux sections : les *Euazolla* et les *Rhizosperma*.

- *Euazolla* comprend quatre espèces originaires d'Amérique : *A. caroliniana*, *A. filiculoïdes*, *A. mexicana*, *A. microphylla* ;
- *Rhizosperma* comprend deux espèces originaires d'Afrique et d'Asie : *A. nilotica* et *A. pinnata*.

La variété d'*A. pinnata* est localisée en Afrique subsaharienne. Elle a été dénommée en Asie var. *pinnata* par Brown (1810) et var. *africana* par Desvaux (1827) en Afrique (**Reynaud et Franche, 1985**).

L'*Azolla pinnata* comprend deux variétés (**Raolina, 1995**) :

- *A. pinnata* var. *pinnata*
- *A. pinnata* var. *imbricata*

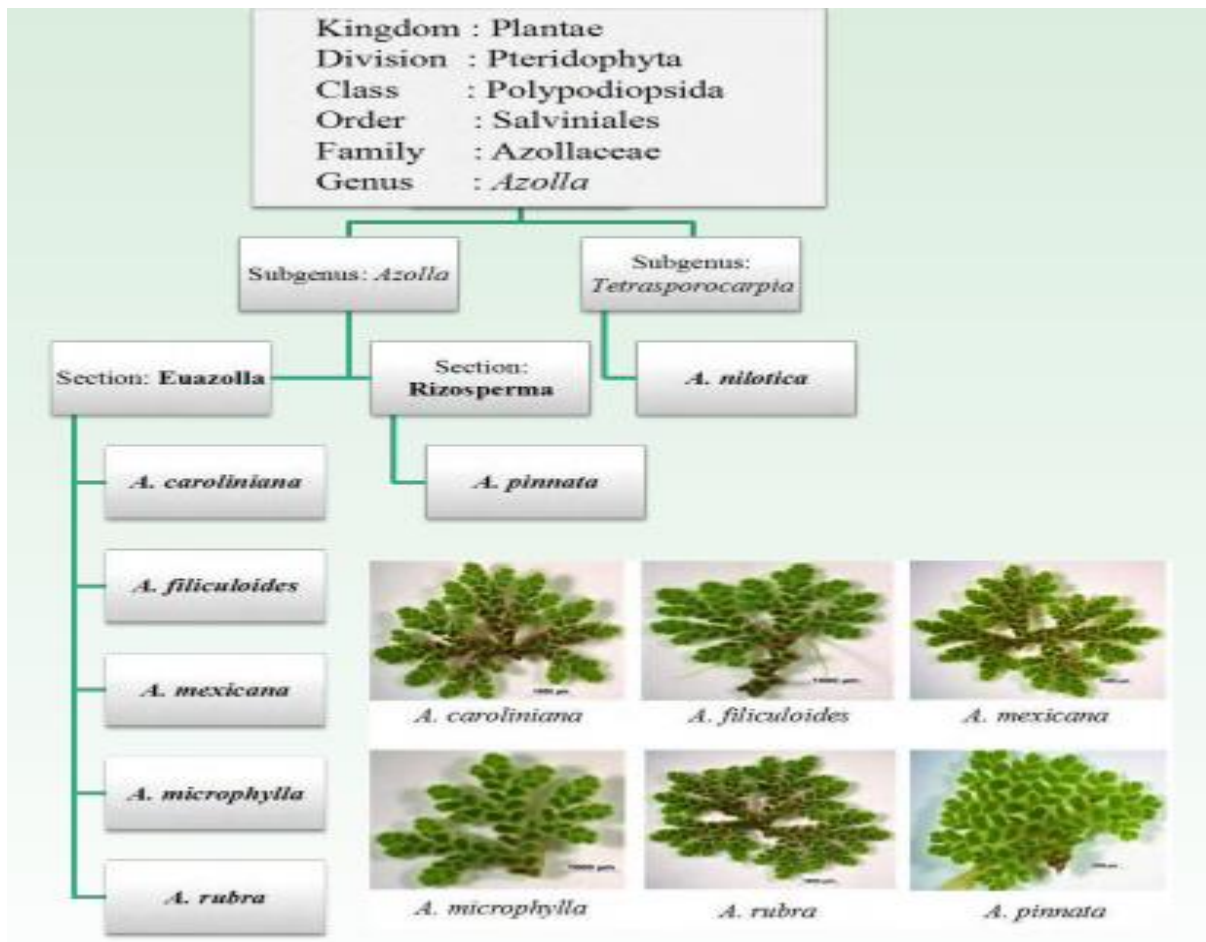


Figure 1 : Taxonomie du genre *Azolla* (NRRI, 2019).

1.1.2 Description

Azolla est une fougère aquatique, flottant à la surface des eaux calmes, tempérées ou tropicales, dans les cressonnières, les rizières, les étangs et dans les canaux d'irrigation. Elle abrite une cyanobactérie du genre *Anabaena* qui a la propriété de fixer l'azote, c'est-à-dire de transformer l'azote moléculaire de l'atmosphère en azote fixé assimilable par la plante (Reynaud et Franche, 1985 ; Raelina, 1995).

Cette fougère est formée d'une tige ou Rhizome, de feuilles et de racines (Figure 2). La plante de l'*Azolla* est appelée fronde. Elle est constituée d'un rhizome principal, d'une longueur excédant rarement 3 ou 4 cm, qui porte des ramifications secondaire qui peuvent à leur tour produire des rhizomes de troisième ordre et ceux-ci de quatrième ordre. Cette architecture confère à la plante une forme plus ou moins triangulaire ou circulaire selon les espèces (Van Hove, 1989 ; Raelina, 1995).

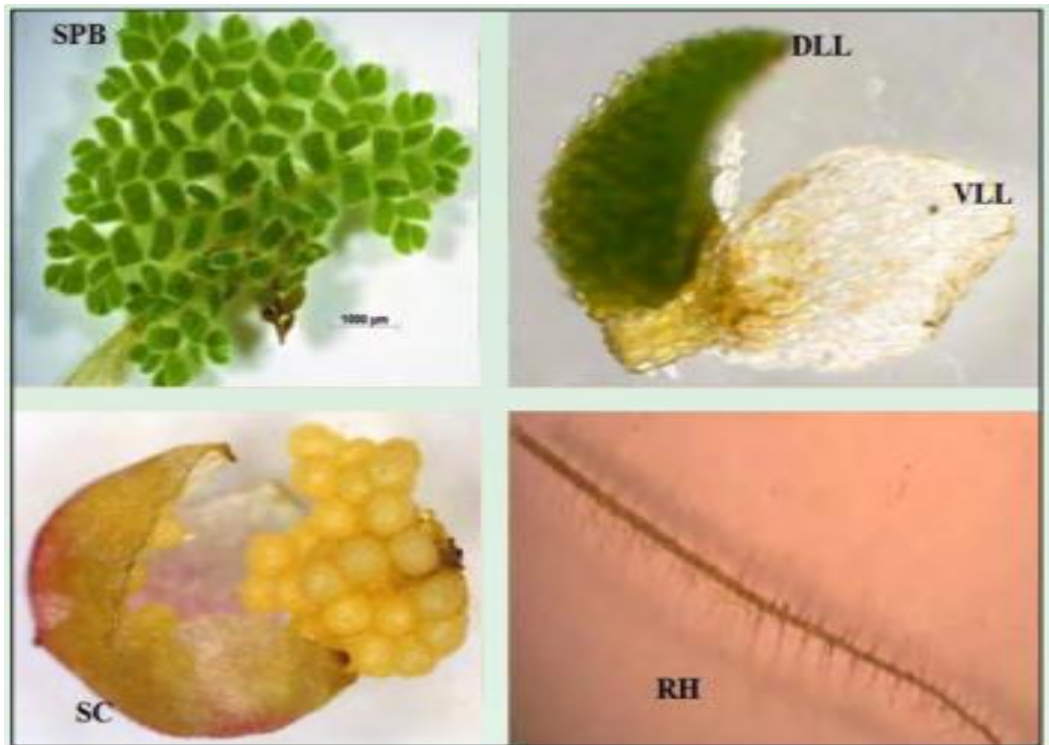


Figure 2 : Plan d'*Azolla Pinnata*. DLL : Les lobes dorsaux et ventraux des feuilles poussent vers le haut côté du rhizome. Tige flottante ramifiée de forme triangulaire aux feuilles légèrement imbriquées. VLL : Lobe dorsal très acuminé et à angle aigu avec feuille ventrale translucide. SC : Sporocarpe produit dans des conditions climatiques naturelles durant le mois de novembre à mars. Paroi de microsporocarpe composée de couche parenchymateuse teintée en rouge contenant des microspores. RH : Les poils absorbants épais poussent latéralement à côté de toute la longueur de la racine (NRRI, 2019).

La tige flottante ramifiée porte des feuilles superposées disposées en alternance. Chaque feuille a deux lobes : le lobe ventral ou inférieur et le lobe dorsal ou supérieur. Les lobes dorsaux sont chlorophylliens et aériens, les lobes ventraux sont en partie submergés, fins et sans chlorophylle. La fronde mesure environ 1 à 3 cm de long. Les racines se trouvent aux nœuds des branches sur la surface ventrale de la tige. Ils mesurent environ 2 à 10 cm de long selon les espèces, ont des poils et une coiffe racinaire qui tombe avec l'âge. En eau peu profonde, les racines adhèrent à la surface du sol et absorbent les nutriments du sol (Dommergues et Diem, 1982).

1.1.3 Reproduction

Chez l'*Azolla*, il existe deux modes de reproduction : la reproduction sexuée ou générative et la reproduction asexuée ou multiplication végétative. La reproduction se fait par voie végétative dans les conditions climatiques favorables et par voie générative en saison défavorable caractérisée par la chaleur ou le froid intense (**Becking, 1979**).

Dans la reproduction sexuée, une nouvelle génération se forme à partir de l'embryon fécondé. Bien qu'un cycle de vie sporophytique soit décrit, les conditions de formation des spores et leur importance écologique sont peu connues. Des températures élevées (début de l'été) dans les régions tempérées et des températures basses dans les régions tropicales et subtropicales (*A. pinnata*) ont été signalées comme induisant des sporocarpes. Dans le sud de la Chine, certaines souches locales d'*A. pinnata* forment des spores abondamment en juin et juillet, et dans une moindre mesure en septembre et octobre. Dans le nord du Vietnam, les spores se forment en mars-avril. La formation d'organes sexuels semble être associée à une forte densité de population d'*azolla* (**Dommergues et Diem, 1982**).

La symbiose est maintenue durant le cycle sexuel. Les cellules d'*Anabaena*, notamment les akinètes (akinétospores) sont enfermées à l'intérieur des macrosporocarpes. Elles sont enfoncées dans une cavité sous le chapeau de l'indusie du macrosporange. Après fécondation de l'oosphère, un zygote se forme et se développe en sporophyte avec son algue associée (**Figure 3**) (**Ntendele Bikela, 2007**).

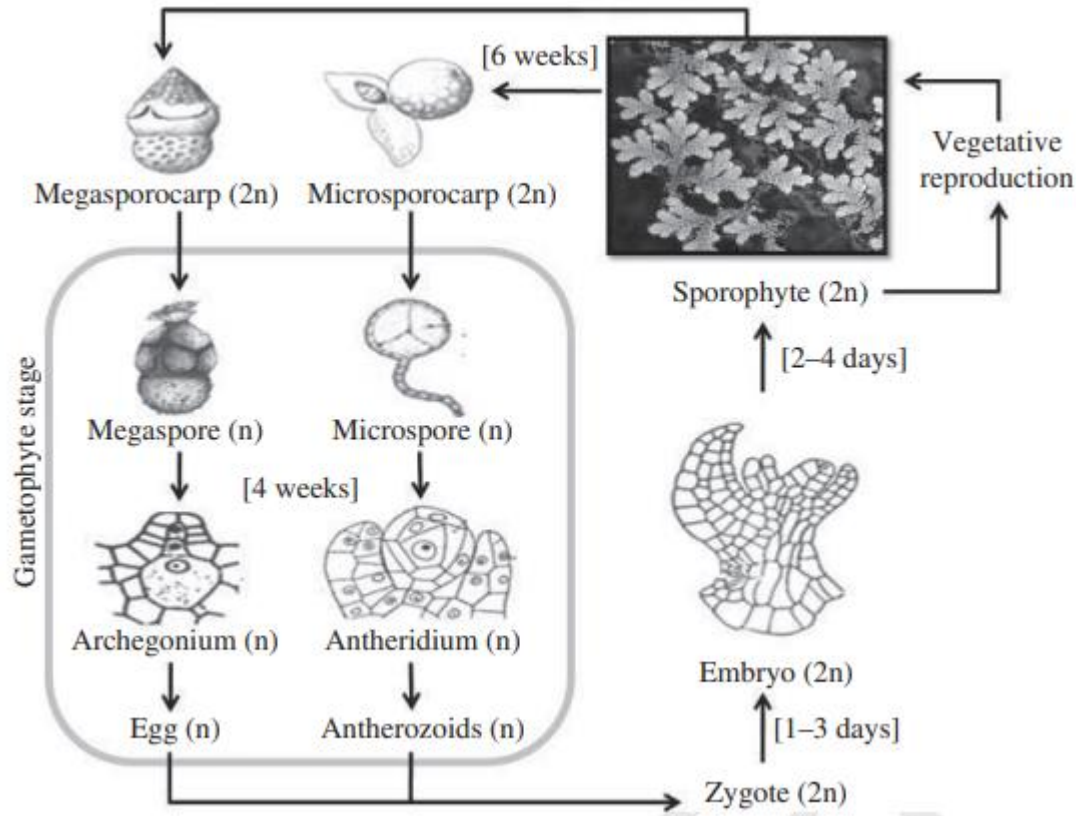


Figure 3 : Cycle de vie d'*Azolla* montrant divers stades de développement. Le sporophyte avait un rhizome, feuilles et racines. Le rhizome développe des feuilles denses contenant des algues cyanophycées, à savoir *Anabaena azollae* sur la surface supérieure. La durée relativement courte des stades de développement permet une multiplication rapide des plantes (Sebastian et al., 2021).

1.1.4 Conditions de culture

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

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

- une bonne maîtrise de l'eau
- une protection contre les hautes intensités lumineuses
- des températures minimales de 15 °C la nuit, 25 °C le jour et maximales de 35 °C

- un apport de phosphore
- et, à un degré moindre, de calcium, de magnésium et d'oligo-éléments
- une protection antiparasitaire.

1.1.4.1 Eau

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

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

1.1.4.2 Température

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

1.1.4.3 pH

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

1.1.4.4 Lumière

Le taux de croissance d'*Azolla* augmente avec l'intensité lumineuse jusqu'à environ 50 klx ou 50 % de l'intensité lumineuse naturelle maximale. Au-delà de ce niveau, le taux de croissance reste constant ou diminue lentement selon des interactions mal définies avec d'autres paramètres écologiques (**Van Hove, 1989**).

La couleur de l'*Azolla* passe au rouge brunâtre en raison de l'exposition à une forte luminosité en saison estivale, et il devient vert lors du retour de l'ombre. La photopériode optimale pour la croissance d'*Azolla* est d'environ 20 heures (**Sebastian et al., 2021**).

1.1.4.5 Nutriments

Le besoin en minéraux d'*Azolla* comprend les macroéléments (P, K, Ca, Mg et Mn) et les microéléments (Fe, Mo, Co). Les carences en ces éléments entraînent les diminutions des croissances (**Becking, 1979**). Mais la caractéristique la plus remarquable dans ce domaine nutritionnel est l'indépendance totale à l'égard de la source d'Azote. *Azolla* croit parfaitement en absence d'azote combiné (**Amroune, 2020**). Mo et Co favorise la capacité de fixation d'azote d'*Azolla* (**Sebastian et al., 2021**).

De tous les éléments essentiels, c'est le phosphore qui limite le plus souvent la croissance d'*Azolla*. Une déficience en phosphore (< 0,2 % de la matière sèche) s'accompagne d'une diminution d'activité de la nitrogénase et de la teneur en azote de l'*Azolla* (**Raolina, 1995**).

1.1.5 Composition chimique

La composition chimique d'*Azolla* varie selon les espèces et les écotypes, mais aussi en fonction des conditions écologiques et de la phase de croissance (densité de population) (**Raolina, 1995**). La teneur en protéines de l'*Azolla* est proche de celle du soja (**Hédji et al., 2014**).

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

- **Farine d'*Azolla pinnata***

La farine d'*Azolla pinnata* contient 21,4 % de protéines brutes, 12,7 % de fibres brutes, 2,7 % d'extrait à l'éther, 16,2 % de cendres et 47,0 % de glucides (**Hédji et al., 2014**).

- ***Azolla pinnata* sèche**

L'analyse chimique de *A. pinnata* séché au soleil pendant 3 jours a montré qu'il contient 88,80 % de matière sèche, 25,46 % de protéines brutes, 2,66 % d'extrait à l'éther, 14,80 % de fibres brutes, 41,58 % d'azote libre, et 15,5 % de cendres totales. L'*Azolla* séché contient également 2,25 % de calcium et 0,40 % de phosphore. La valeur de l'énergie métabolique calculée de *Azolla* séché est de 1807 kcal / kg (**Hédji et al., 2014 ; Shanna, 2013**).

1.1.6 Utilisation

1.1.6.1 Fertilisation du sol

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

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

1.1.6.2 Alimentation humaine

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

1.1.6.3 L'utilisation d'*Azolla* en alimentation animale

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

○ Aliment pour poulet

Plusieurs chercheurs ont étudié l'effet de l'incorporation de la farine *d'Azolla* dans l'alimentation de poulet sur les performances de croissances (**Ouedraogo et al., 2021 ; Alalade et Iyayi, 2006 ; Basak et al., 2002**).

Ouedraogo et al. (2021) ont montré que la substitution partielle du soja torréfiée par la farine *d'Azolla pinnata* n'a pas d'effet significatif sur l'évolution pondérale et les gains moyens quotidiens des poulets. Leurs résultats corroborent celui **d'Alalade et Iyayi (2006)** au Nigéria qui avaient montré que la farine *d'A. pinnata* peut être incorporée jusqu'à 10 % dans la ration alimentaire des poussins sans affecter négativement la croissance de ces derniers. A partir de la sixième semaine d'âge **Basak et al. (2002)** ont trouvé que les poulets de chair nourris avec une

ration incorporant 5 % d'*A. pinnata* en substitution au sésame avaient des poids corporels significativement améliorés par rapport au témoin (0% d'*A. pinnata*).

- **Aliment pour lapin**

Dans leur étude sur l'effet de l'incorporation d'*Azolla* dans l'alimentation de lapins sur leurs performances de croissance et les caractéristiques de leur viande, **Abdelatty et al., (2021)** ont montré qu'*Azolla* sèche pourrait être inclus dans un régime alimentaire de lapin en croissance, jusqu'à 10 %, tandis que des doses plus élevées altèrent négativement les performances de production, la qualité de la viande et l'efficacité alimentaire des lapins en croissance.

- **Aliment pour bétail**

Des investigations ont été entreprises pour explorer le potentiel nutritif d'*Azolla pinnata* comme aliment équilibré pour le bétail. Un essai de deux mois à la ferme a été mené sur des bovins, des chèvres et des poules. Les résultats montrent qu'il y a eu une augmentation appréciable de la production laitière (10-15 %), de la viande en poids (8-10 %) et de la capacité de ponte (10-15 %) chez les animaux laitiers, les chèvres et les poules respectivement. Sur la base des recherches et observations actuelles, *Azolla pinnata* est recommandée comme supplément protéique non conventionnel potentiel pour le bétail pendant la période de disette (**Kumar et Chander, 2017**).

1.1.6.4 L'utilisation thérapeutique

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

1.1.6.5 Dépollution des milieux

La biosorption aide à éliminer les matières toxiques des milieux aqueux. La biomasse d'*Azolla* s'est avérée efficace pour biosorber les métaux lourds tels que Pb, Cd, Cu et Zn. Cette biomasse a été très efficace pour éliminer la demande chimique en oxygène et les polyphénols des eaux usées des huileries. Le biofiltre a pu éliminer jusqu'à 4 000 ppm de polyphénols dans les eaux usées (**Sebastian et al., 2021**).

1.1.6.6 Production de la bioénergie

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

1.2 Salinisation et stress salin

1.2.1 Définition

La salinisation peut être définie comme un processus d'accumulation des sels solubles à la surface du sol et dans les zones racinaires en quantité suffisante pour affecter ses aptitudes agronomiques (**Marmoud, 2006**).

Le stress salin est défini comme une concentration excessive en sel. Le terme salin s'applique surtout à un excès des ions en particulier Na^+ et Cl^- . La quantité de sels dans le sol que les plantes peuvent supporter sans grand dommage pour leur culture, varie avec les familles, les genres et les espèces, mais aussi les variétés considérées (**Hopkins, 2003 ; Levigneron, 1995**).

1.2.2 Types de salinisation

1.2.2.1 Salinisation naturelle

Tout d'abord, la salinisation implique une accumulation de sel par des processus naturels du fait d'une forte teneur en sel du matériau parent ou des nappes souterraines (**Anonyme, 2009**).

La salinité primaire elle est d'origine naturelle, due principalement aux sels qui ont pour origine le processus d'altération des roches. La migration puis le dépôt de ces sels solubles dépendent de l'intensité et de la répartition des précipitations et d'autres caractéristiques de milieu naturel. Dans les régions arides et semi-arides, le lessivage et le transport en profondeur des sels dissous n'existent plus et l'évapotranspiration importante favorise la concentration des sels dans le sol (**Lallemand, 1980**).

1.2.2.2 Salinisation anthropique

Les activités humaines qui induisent une salinisation dite «secondaire» sont nombreuses (Montoroi, 2017) :

- irrigation mal conduite,
- pratiques d'anciennes techniques d'irrigation,
- irrigation avec des eaux riches en sels,
- déforestation intensive,
- engrais contenant des sels de potassium et d'azote,
- dépôts atmosphériques près des sites industriels.

La salinisation anthropique accentue la salinisation naturelle, change la composition des eaux naturelles (lacs, rivières, nappes souterraines), dégrade la qualité de l'eau demandée pour satisfaire les besoins domestiques, agricoles et industriels, contribue à la perte de biodiversité et de fertilité des sols, modifie les conditions climatiques locales, crée des problèmes sanitaires et réduit drastiquement les activités agricoles et piscicoles (Montoroi, 2017).

1.2.2.3 Effet de salinité sur les plantes

La présence de sels solubles en forte concentration dans le sol, affecte les mécanismes physiologiques de la plante, et constitue un facteur limitant majeur de la production végétale. Ainsi, la tolérance des plantes cultivées demeure limitée, compte tenu de la complexité des mécanismes impliqués dans la tolérance des plantes au sel (Tahraoui, 2016 ; Bissati, 2011).

Les effets de la salinité sur les plantes sont complexes et ses conséquences incluent la toxicité par les ions, le déficit hydrique, la déficience et le déséquilibre nutritifs (Agronomie, 2022).

- **Effet osmotique**

La présence d'une forte concentration de sels soluble dans le sol crée une pression osmotique élevée dans l'environnement racinaire qui réduit la disponibilité de l'eau du sol pour la plante; c'est ce que n'appelle une sécheresse physiologique. Lorsque l'ajustement osmotique n'est pas suffisant, l'eau a tendance à quitter les cellules, ce qui provoque la perte de la turgescence. Le sel entre en compétition avec le système de transport des nutriments indispensables, et soumet les plantes à un déséquilibre osmotique qui peut aboutir à un déficit hydrique (**Hamdoud, 2012**).

- **Effet physiologique**

Un sol chargé en ion possède une pression osmotique plus élevée, ce qui nécessite une augmentation de la succion des plantes concernées et ainsi de la transpiration, l'extraction y étant plus difficile. Au bout d'un certain seuil, lorsque la plante est soumise à un stress hydrique trop important les stomates se ferment diminuant la transpiration afin de se préserver (**Tahraoui, 2016**).

La photosynthèse est réduite chez les plantes cultivés en milieu salin, en conditions de stress salin (**Hamdoud, 2012**).

- **Effet sur la croissance**

De nombreux travaux ont montré que la réponse générale des plantes à la salinité est la réduction de la croissance. La réduction de la croissance est une capacité adaptative nécessaire à la survie d'une plante exposée à un stress abiotique. La réponse immédiate au stress salin est la réduction du taux d'expansion de la surface foliaire jusqu'à sa cessation avec l'augmentation des concentrations de sels. La réduction de la croissance se produit chez toutes les plantes, cependant leur niveau de tolérance et le taux de réduction à des concentrations de sels létales varient largement avec ou entre les différentes espèces végétales (**Nabi, 2009**).

1.2.3 Salinisation des eaux

Le cycle de la salinité dans les eaux continentales (**Figure 4**) peut être subdivisé en deux grands domaines, le domaine marin lié directement ou indirectement à l'eau de mer, et le domaine 'continental/interactions eaux-roches' pour lequel les sels dissous sont issus essentiellement de l'interaction avec les roches sédimentaires (hors évaporites marines) et cristallines et concentrés par l'évaporation (**Kloppmann et al., 2011**).

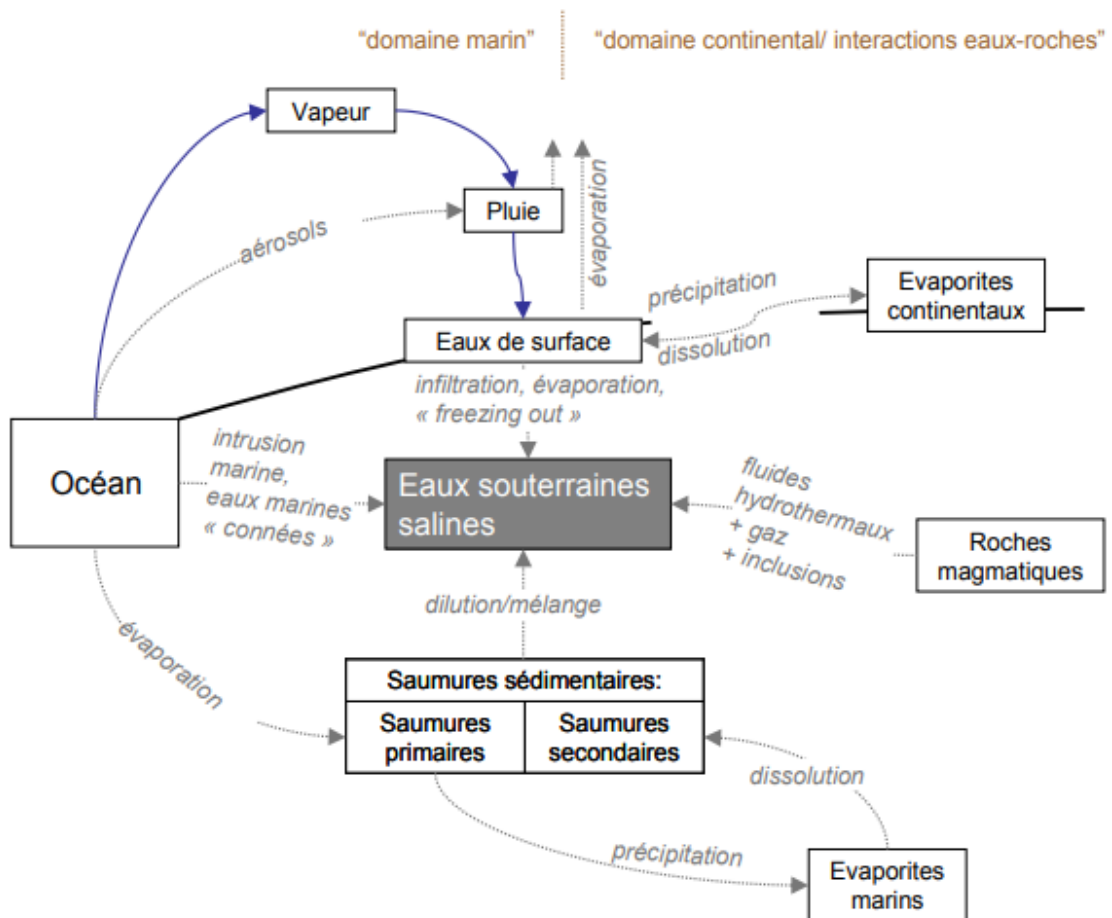


Figure 4 : Mécanismes naturels de salinisation des eaux de surface et souterraines (**Kloppmann et al., 2011**).

1.2.4 Effet de la salinité sur *Azolla pinnata*

La salinité a progressivement inhibé la croissance d'*A. pinnata*. Mais, l'ajout de P dans l'eau salée peut améliorer la croissance d'*Azolla. A. pinnata* peut tolérer le NaCl à une concentration de 60 mM (**Sebastian et al., 2021**).

Azolla pinnata est une plante extrêmement sensible au NaCl et ne peut tolérer une concentration externe de NaCl au-delà de 30 mM. La préincubation des plantes dans du NaCl 20 mM pendant 18 jours, suivie d'un transfert par étapes (NaCl 10 mM par jour) les a rendues capables de se développer à une concentration autrement létale de NaCl de 60 mM à des taux comparables à la croissance de plantes inadaptées dans du NaCl 20 mM. Les plantes non préincubées dans du NaCl 20 mM ou préincubées pendant une durée inférieure à 18 jours ont été incapables de survivre et n'ont pas poussé dans du NaCl externe 60 mM. Les concentrations de Na⁺, K⁺ et Ca²⁺ dans les plantes témoins, stressées par le NaCl et adaptées différaient significativement, indiquant que l'adaptation impliquait le développement d'une capacité chez les plantes à réguler la concentration en ions (**Rai et Rai, 1998**).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

Ce chapitre décrit les détails du matériel et des méthodes utilisés pour la culture d'*Azolla pinnata* dans un milieu de culture naturel, dans la solution Hoagland et la solution de Hoagland à différentes concentrations du sel pour évaluer l'impact de la salinisation sur sa croissance et ses principes actifs.

2.1 Matériel et réactifs

Le matériel utilisé pour la réalisation de ce travail est le suivant : Spectrophotomètre UV-Vis, Thermomètre, Etuve, Agitateur pH-mètre, Balance, Bain marie, une chambre de culture à température et à luminosité contrôlées.

Les réactifs et solvants utilisés pour la réalisation de ce travail sont : K₂SO₄, MgSO₄, KH₂PO₄, FeSO₄, Acide gallique, EDTA, NaOH, FeNa, NaCl, H₃BO₃, MnSO₄, ZnSO₄, CuSO₄, AlCl₃, Bicarbonate de sodium, quercétine, Méthanol, Ethanol, Folin Ciocalteu, HCl, DPPH, Catéchol, Vanilline, acide sulfurique.

2.2 Méthodes

2.2.1 Pré-culture d'*Azolla pinnata*

Etape 1 :

La première étape consiste à la préparation d'une culture de stocke d'*Azolla pinnata* dans un milieu de culture naturel contenant de la terre agricole (3 cm), d'engrais organique (fientes de poulet 1 cm) et de l'eau potable (7 cm). Le milieu de culture est agité et laissé pendant une courte période de temps puis débarrassé des impuretés. Après avoir préparé le milieu agricole approprié, une petite quantité d'*Azolla* a été doucement déposée sur la surface de milieu. La culture a été faite dans une chambre de culture en réglant la température à 25 °C et la luminosité à 8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité. La température et le pH de milieu ont été contrôlés durant toute la période de l'expérimentation (**Figure 5**).



Figure 5 : Pré-culture d'*Azolla pinnata* dans un milieu naturel (**Originale, 2022**)

Etape 2 :

La deuxième étape consiste à la préparation d'une culture de stocke d'*Azolla pinnata* dans un milieu synthétique qui est la solution de Hoagland $\frac{1}{4}$ sans azote. Après avoir préparé la solution de Hoagland $\frac{1}{4}$, une petite quantité d'*Azolla* a été doucement déposée sur la surface de la solution. La culture a été faite dans une chambre de culture en réglant la température à 25 °C et la luminosité à 8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité. La température et le pH de milieu ont été contrôlés durant toute la période de l'expérimentation (7 jours) (**Figure 6**).



Figure 6 : Mise en culture d'*Azolla pinnata* dans la solution de Hoagland $\frac{1}{4}$ sans azote
(Originale, 2022)

2.2.2 Culture d'*Azolla pinnata*

Pour évaluer l'effet de stress salin sur la culture et les principes actifs d'*Azolla* ; la culture de cette fougère a été faite dans un même volume de la solution de Hoagland $\frac{1}{4}$ sans azote à pH 6,8 (témoin) et dans la solution de Hoagland $\frac{1}{4}$ sans azote à pH 6,8 et à trois concentrations de NaCl (10, 20 et 30 mmol).

Après avoir préparé les solutions, la même quantité d'*Azolla* a été doucement déposée sur la surface de chaque solution. La culture a été faite dans une chambre de culture en réglant la température à 25 °C et la luminosité à 8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité. La température et le pH de milieu ont été contrôlés durant toute la période de l'expérimentation (10 jours) (**Figure 7**).



Figure 7 : Mise en culture d'*Azolla pinnata* dans la solution de Hoagland ¼ sans azote et dans les solutions salées (**Originale, 2022**).

2.2.3 Mesure de taux de croissance

Après dix jours de culture d'*Azolla* dans les différentes solutions expérimentales, les quantités des cultures obtenues ont été pesées et leurs taux de matière sèche ont été déterminés.

Le taux de croissance relatif a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Taux de croissance relatif} = (\ln DW2 - \ln DW1) / (t2 - t1)$$

Dont :

DW2 et DW1 sont les poids au temps t1 et t2 (après séchage)

Le nombre de génération a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$m = m_0 \times 2^G$$

Dont :

m : masse finale d'*Azolla* (g)

m₀ : masse initiale d'*Azolla* (g)

G : nombre de générations

2.2.4 Taux de matière sèche

Régler l'étuve à 90 ± 2 °C et peser 2 g d'échantillon dans un creuset préalablement séché et refroidi dans le dessiccateur. Placer le creuset dans l'étuve et sécher l'échantillon pendant 24 heures. Transférer le creuset au dessiccateur pour se refroidir. Peser et calculer le taux de matière sèche comme suit :

$$MS (\%) = (M1 - M0 / M \times 100)$$

Où :

M1 : Masse en grammes, du creuset et du résidu après séchage et refroidissement.

M0 : Masse en grammes, du creuset vide.

M : Masse de la prise d'essai en gramme.

2.2.5 Cendres totales

Incinérer une prise d'essai de 2 g dans un four de calcination à 600 °C pendant 2 heures jusqu'à combustion totale de la matière organique et obtention d'une coloration blanchâtre. Refroidir le creuset dans le dessiccateur pendant une heure et le peser. La teneur en cendres exprimée en pourcentage massique de l'échantillon rapportée à la matière telle qu'elle est donnée par la relation suivante :

$$TC \% = (m2 - m0 / m1 - m0) \times 100$$

Où :

TC : taux de cendres (%).

m 0 : masse du creuset vide (g).

m 1 : masse du creuset et de la prise d'essai (g).

m 2 : masse du creuset et du résidu (g).

2.2.6 Extraction des polyphénols

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

- o Dans une fiole, introduire 5 g d'échantillon ;
- o Ajouter 100 ml du solvant (méthanol à 70 % v/v) ;
- o Laisser le mélange en contacte durant 24 h à température ambiante (avec agitation occasionnelle) ;
- o Filtrer le mélange par un tissu puis un filtrer sur papier whatman N° 1 ;
- o Evaporer le solvant sous vide à 40 °C en utilisant le rotavapeur (Buchi) jusqu'à l'obtention d'un résidu sec ;
- o Conserver le résidu à 4 °C jusqu'à utilisation.

2.2.7 Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = (MR_{ext} / MR_{éch}) \times 100$$

Où :

R : le rendement en % ;

MR_{ext} : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg ;

MR_{éch} : la masse de l'échantillon avant extraction en mg.

2.2.8 Dosage des polyphénols

Le dosage des polyphénols totaux a été effectué par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu décrite par **Fu et al. (2011)** citée par **Mahmoudi et al. (2018)**. Cette méthode a été décrite dès 1965 par Singleton et Rossi. Le réactif Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMo₁₂O₄₀). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W₈O₂₃) et de molybdène (Mo₈O₂₃) (**Boizot et Charpentier, 2006**).

Une prise d'essai de 200 µl de chaque extrait à analyser a été mélangée successivement avec 1000 µl du réactif Folin-Ciocalteu (10 % v/v) et 800 µl d'une solution de bicarbonate de sodium (Na₂CO₃) à 7,5 % (p/v) (pour favoriser un milieu alcalin et déclencher la réaction d'oxydoréduction).

Le mélange a été agité puis incubé à l'obscurité au bain Marie à 40 °C pendant dix minutes. Les absorbances ont été lues à 760 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible (Schimadzu-UV-2401PC, UV-Vis Japon) contre un blanc préparé par la même manière précédente en remplaçant l'extrait par 200 µl d'eau distillée.

Une gamme d'étalonnage de six concentrations d'acide gallique allant de 10 à 100 µg/ml (p/v) a été préparée pour calculer la concentration des polyphénols dans chaque extrait. La concentration en composés phénoliques totaux est exprimée en milligramme équivalent acide gallique par gramme de matière fraîche.

2.2.9 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué par la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium selon le protocole décrit par **Mahmoudi (2018)**.

Un volume de 1 ml de chaque extrait a été mélangé avec 1 ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium à 2 % (p/v). Le mélange a été agité, incubé 10 min à l'obscurité et l'absorbance a été lue à 430 nm avec spectrophotomètre UV-Visible (Schimadzu-UV-2401PC, UV-Vis) contre un blanc préparé de la même manière précédente en remplaçant l'extrait par 1 ml du méthanol absolu.

La concentration en flavonoïdes est exprimée en microgramme équivalent quercétine par gramme de matière fraîche en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine (neuf concentration de 0,5 à 8 µg / ml p/v).

2.2.10 Dosage des Tanins

Les tanins condensés ont été déterminés par la méthode spectrophotométrique de vanilline en milieu acide décrite par **Ba et al. (2010)** citée par **Mahmoudi (2018)**.

Le réactif de vanilline a été préparé en mélangeant à volume égal : l'HCl à 8 % (v/v) dans le méthanol et la vanilline dans le méthanol à 4 % (p/v). Le mélange est maintenu à 30 °C avant le dosage. Une prise d'essai de 200 µl de chaque extrait à analyser a été mélangée avec 1000 µl du réactif de vanilline. Le mélange a été agité puis incubé à l'obscurité pendant vingt minutes à température ambiante. L'absorbance a été lue à 500 nm avec un spectrophotomètre UV-Visible (Schimadzu-UV-2401PC, UV-Vis japon) contre un blanc préparé par la même manière précédente en remplaçant l'extrait par le méthanol.

La concentration en tanins condensés est exprimée en microgramme équivalent catéchol par gramme de matière fraîche en se référant à la courbe d'étalonnage de catéchol (huit concentrations allant de 0 à 0,9 g / ml p/v).

2.2.11 Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée in vitro par la méthode de DPPH. (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl) rapportée par **Koh et al. (2012)** citée par **Mahmoudi et al. (2018)**.

La méthode du DPPH. est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH. en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPH-H ce qui entraîne un virage de la couleur violacée du DPPH au jaune.

Brièvement, une prise d'essai de 2,7 ml d'une solution fraîche de DPPH. (6×10^{-5} mol/l dans le méthanol) a été ajoutée à 0,3 ml de chaque extrait à différentes concentrations (1 à 80 mg/ml).

Le mélange a été agité fortement, incubé 30 min à l'obscurité et l'absorbance a été lue à 517 nm avec spectrophotomètre UV-Visible (Schimadzu-UV-2401PC, UV-Vis) contre un blanc composé du méthanol et un contrôle constitué de 2,7 ml du DPPH. et 0,3 ml du méthanol. L'activité antioxydante a été calculée en utilisant la formule suivante :

$$A \text{ antiox (\%)} = 100 \times (A_0 - A_s) / A_0$$

Où :

A antiox : activité antioxydante (%).

A₀ : densité optique du contrôle (nm).

A_s : densité optique de l'échantillon (nm).

Les IC₅₀ des extraits de la pulpe et de la pelure de différentes variétés des figues et de standard ont été estimés à partir de l'équation de la courbe de tendance de chacun (IC₅₀ de l'échantillon correspond à la concentration permettant 50 % d'inhibition du DPPH.).

Chapitre 3

Résultats et discussion

3.1 Taux de croissance

Dans notre travail, nous avons testé l'effet de l'ajout de NaCl dans une solution de Hoagland $\frac{1}{4}$ sans azote sur le taux de croissance d'*Azolla pinnata*. L'*Azolla* peut croître sans azote dû à sa capacité de fixer l'azote atmosphérique (Tran et al., 2020).

Les taux de croissance d'*Azolla pinnata* représentés dans la figure 8 montrent que l'augmentation de la salinité dans le milieu de culture diminue le taux de croissance de cette fougère.

Une concentration de 10 mmol de NaCl dans le milieu affecte légèrement la croissance d'*Azolla* alors que des concentrations de 20 et 30 mmol diminuent fortement et avec des taux très proches sa croissance.

Avec des concentrations de 20 et 30 mmol de NaCl, nous observons un jaunissement des frondes d'*Azolla pinnata*.

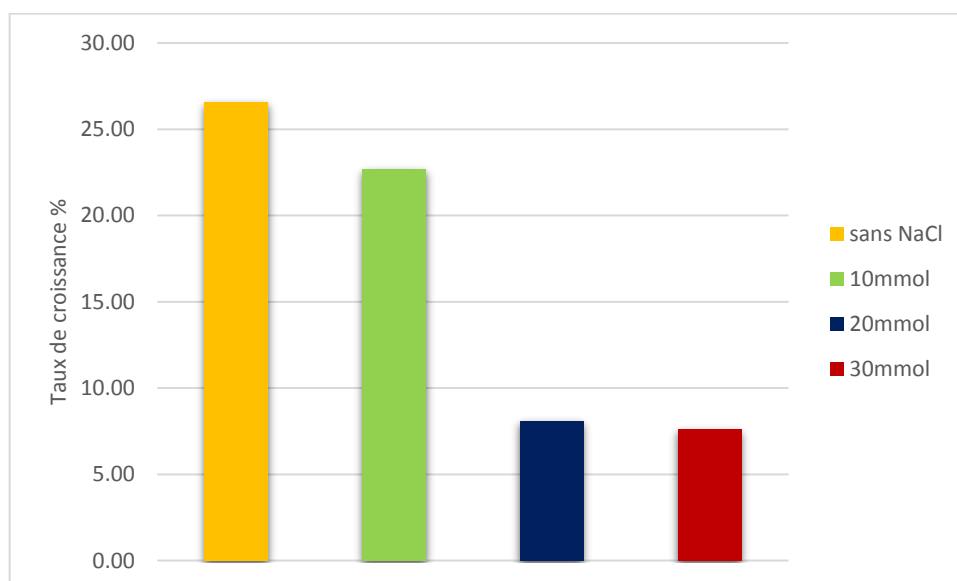


Figure 8 : Taux de croissance d'*Azolla pinnata* %

Nos résultats sont comparables aux observations de Rai et Rai (1998) qui ont trouvé que le NaCl est toxique pour la croissance d'*Azolla pinnata*.

La différence entre la croissance des fougères stressées par le NaCl et non stressées était évidente même après 3 jours de culture.

Malgré une croissance réduite à des salinités de 20 et 30 mmol, quelques frondes avaient l'air en bonne santé et continuaient à pousser et à ajouter du poids sec alors que d'autres semblaient jaunes et dégénérées.

3.2 Taux de matière sèche

Des taux de matière sèche d'*Azolla pinnata* stressée et non stressée représentés dans le tableau 1 il apparaît que le taux de matière sèche augmente avec l'augmentation de la concentration du NaCl dans le milieu de culture (11,33 à 17,13 %).

Tableau 1 : Taux de matière sèche d'*Azolla pinnata* (%)

Echantillons	Témoin	10 mmol NaCl	20 mmol NaCl	30 mmol NaCl
MS %	11.33	13.08	14.42	17.13
	±0.32	±0.86	±0.35	±0.89

Nos résultats ne sont pas en concordance avec ceux de **Rai et Rai (2003)** qui ont observé une diminution de la matière sèche et de chlorophylle et une augmentation de taux protéique avec l'addition de 20 mmol de NaCl au milieu de culture.

3.3 Taux de cendres totales

Le tableau 2 représente le taux de cendre totale d'*Azolla pinnata*. Nous observons de ces résultats que l'augmentation de la concentration du NaCl dans le milieu de culture augmente le taux de cendre dans la fougère (de 0,77 à 1,24 %).

Tableau 2 : Taux de cendres totales d'*Azolla pinnata* (%)

Echantillons	Témoin	10 mmol NaCl	20 mmol NaCl	30 mmol NaCl
CT %	0.77	0.88	1.18	1.24
	±0.11	±0.02	±0.03	±0.027

3.4 Rendement d'extraction des polyphénols

L'extraction des composés phénoliques est une étape cruciale pour la valorisation de ces principes actifs. Elle dépend de la méthode et du solvant approprié qui préservent leurs propriétés biologique, la macération est la meilleure technique d'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes (Mahmoudi et al., 2013).

Les résultats de rendement d'extraction obtenus (Figure 9) montrent que celui-ci augmente au fur et à mesure avec l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu de culture.

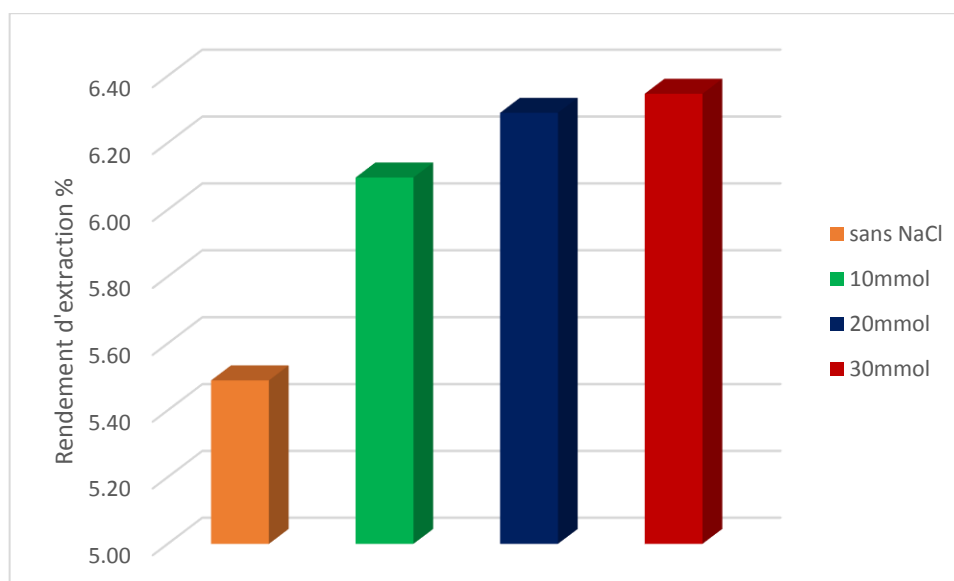


Figure 9 : Rendement d'extraction des polyphénols d'*Azolla pinnata*

Nous observons une corrélation entre le taux de matière sèche et le rendement d'extraction des polyphénols.

3.5 Teneur en polyphénols totaux

Les polyphénols sont des métabolites secondaires, produits par des voies du shikimate et des phénylpropanoïdes, comprennent plus de 8000 composés, dont des flavonoïdes, des flavonols, des flavones, des anthocyanes, des tanins et des tanins condensés (proanthocyanes) et d'autres molécules contenant des noyaux benzéniques (C6) (Vaishali et al., 2018).

Nous avons utilisés l'équation de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour calculer les teneurs en polyphénols totaux (Figure 10).

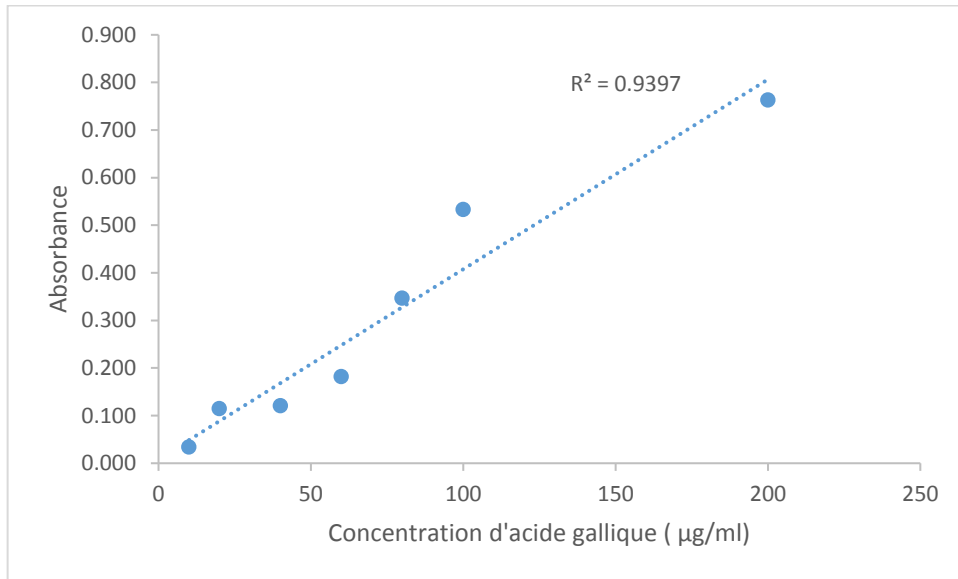


Figure 10 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Les résultats de la figure 11 révèlent que la teneur en polyphénols totaux dans *Azolla pinnata* augmente avec l'augmentation de la concentration du NaCl dans le milieu de culture en enregistrant une teneur maximale à 20 mmol. Cette concentration diminue à 30 mmol.

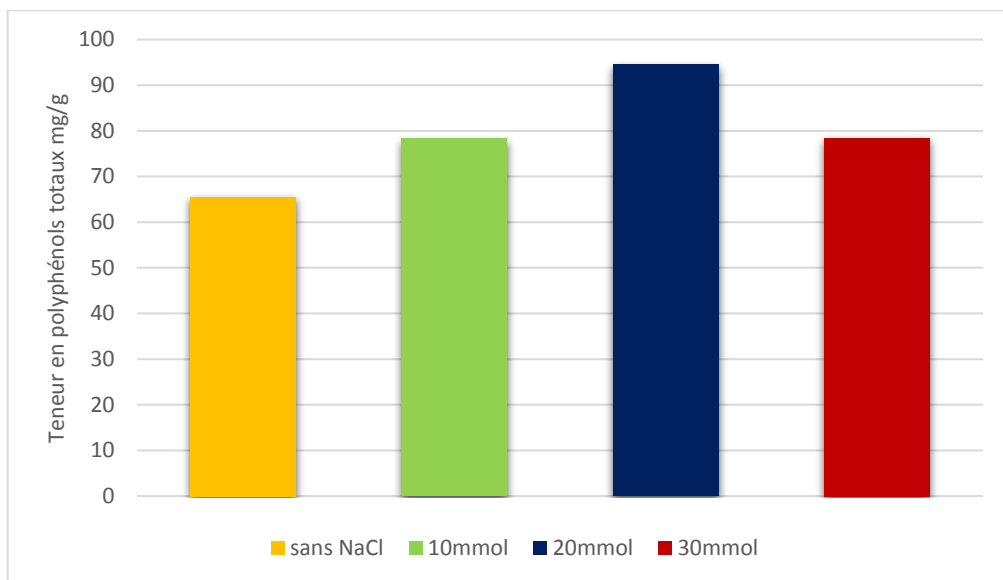


Figure 11 : Teneurs en polyphénols totaux mg éq. Acide gallique/g

Nos résultats sont comparables à ceux trouvés par **Tran et al. (2020)**. Ces auteurs ont enregistré une concentration de phénols totaux de 53,5 mg/g DW dans *A. pinnata* non stressée. Le stress a augmenté l'accumulation de phénols jusqu'à 2,6 fois chez *A. pinnata* produisant 139,5 mg/g DW.

3.6 Teneur en flavonoïdes

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

L'équation de la courbe d'étalonnage de quercétine a été utilisée pour calculer la teneur en flavonoïde dans les différents échantillons d'*Azolla* (**Figure 12**).

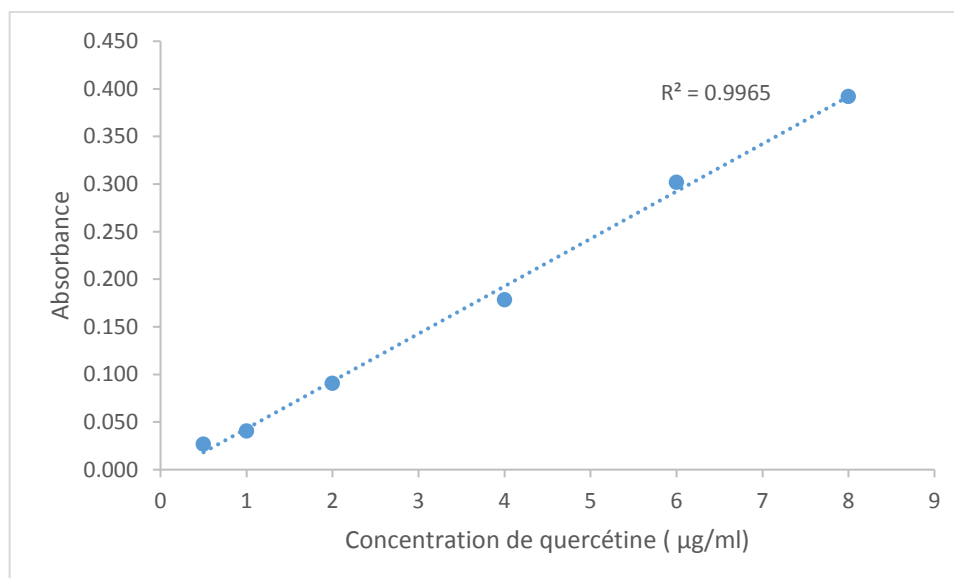


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de quercétine

Les teneurs en flavonoïdes dans les échantillons d'*Azolla pinnata* illustrées dans la figure 13 révèlent que l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu de culture jusqu'à 20 mmol augmente la teneur en flavonoïdes. A 30 mmol, cette teneur a fortement diminué.

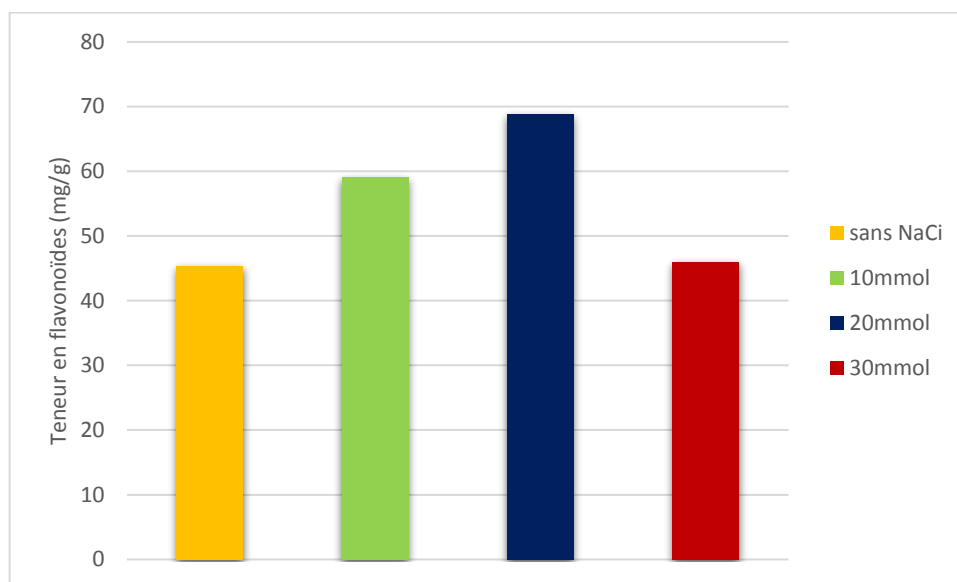


Figure 13 : Teneurs en flavonoïdes

Nos résultats sont en accord avec les observations de **Tran et al. (2020)** qui ont trouvé que le stress a multiplié la teneur en flavonoïdes dans *Azolla pinnata* par 4,7, atteignant une concentration de 218 mg/g DW.

3.7 Teneur en tanins

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

L'équation de la courbe d'étalonnage du catéchol a été utilisée pour estimer la teneur en tanins dans les échantillons d'*Azolla pinnata* (**Figure 14**).

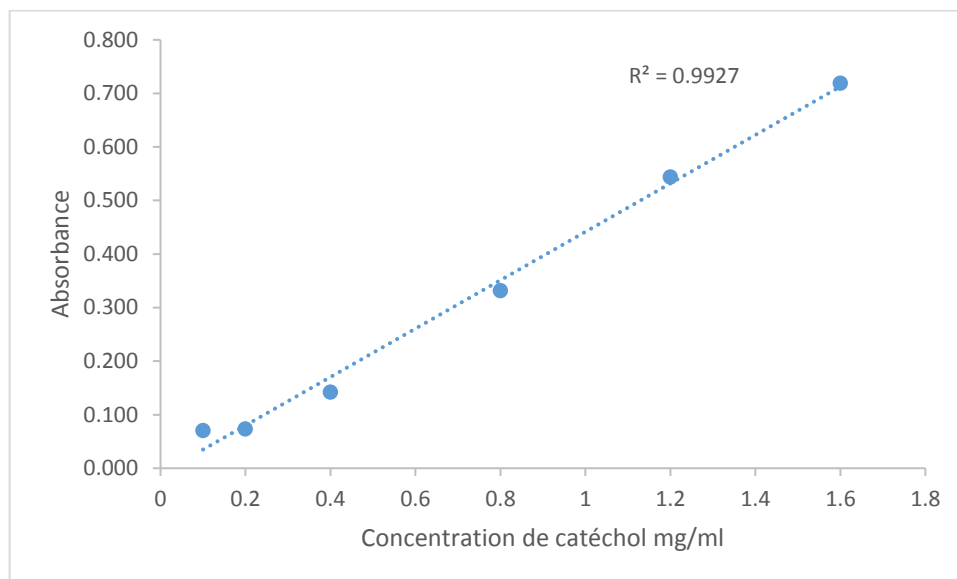


Figure 14 : Courbe d'étalonnage de catéchol

Nous observons que l'échantillon témoin d'*Azolla* cultivé dans la solution de Hoagland sans NaCl enregistre la teneur en tanins la plus élevée. Cette teneur diminue au fur et à mesure avec l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu de culture (10 et 20 mmol) puis elle augmente de nouveau à 30 mmol (**Figure 15**).

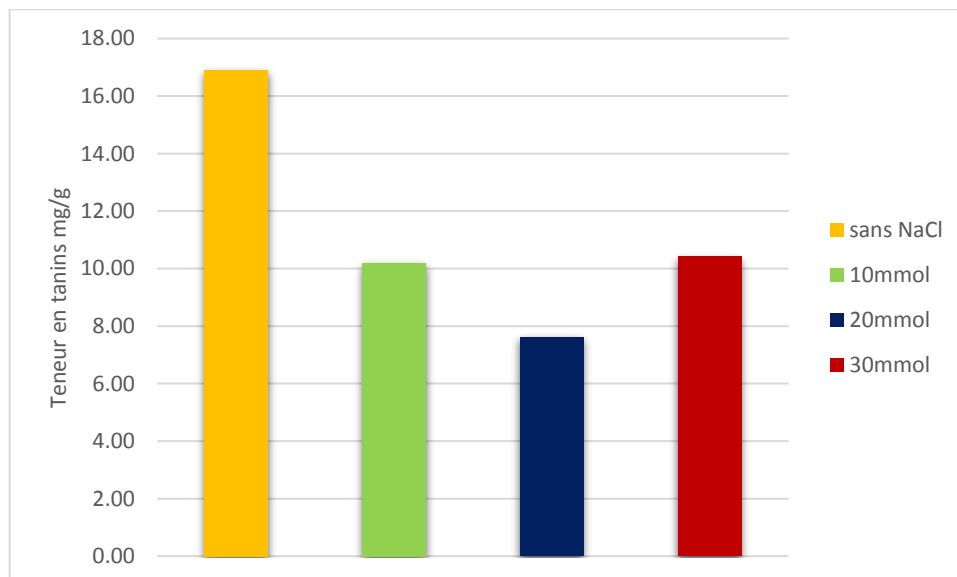


Figure 15 : Teneurs en tanins

Nos résultats sont en contradiction avec ceux de **Tran et al. (2020)** qui ont observé que le stress augmente la teneur en tanins condensés dans *Azolla pinnata*.

3.8 Activité antioxydante

L'activité antioxydante d'*Azolla pinnata* augmente avec l'augmentation de la concentration de NaCl dans le milieu de culture jusqu'à 20 mmol puis elle diminue à 30 mmol (**Figure 16**).

Nous observons une corrélation entre la teneur en polyphénol et l'activité antioxydante des extraits d'*Azolla pinnata*.

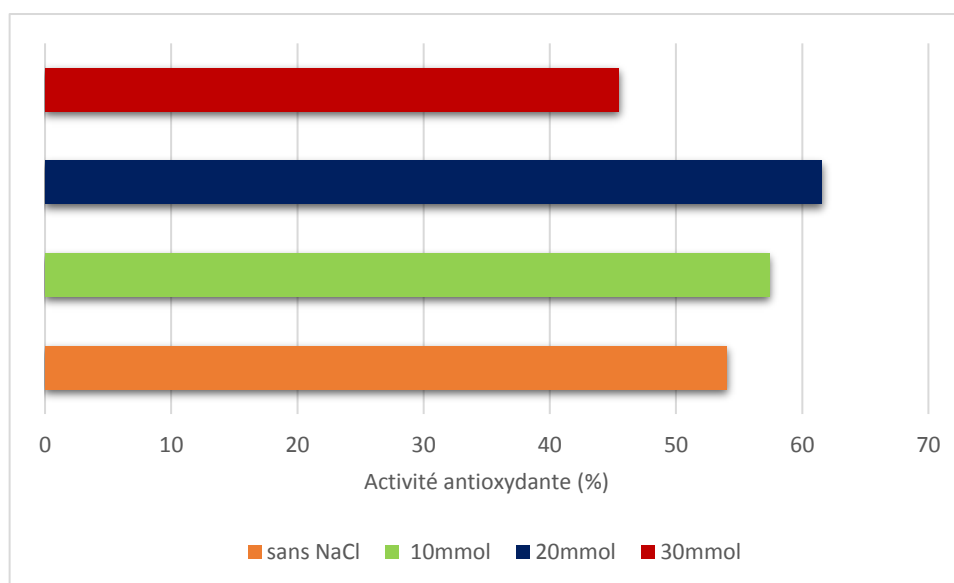


Figure 16 : Activité antioxydante des extraits d'*Azolla pinnata* (%)

Il a été démontré que le mécanisme antioxydant déclenché par les composés phénoliques végétaux est bénéfique pour la santé humaine, notamment en réduisant le risque de développer des maladies cardiovasculaires, cancer, diabète de type 2 et les maladies neurologiques (**Tran et al., 2020**).

Conclusion

Dans ce travail, nous avons testé l'effet du stress salin sur le taux de croissance et les principes actifs d'*Azolla pinnata*. Quatre cultures de cette fougère ont été suivies dans la solution de Hoagland sans NaCl et dans cette solution contenant 10, 20 et 30 mmol de NaCl.

A la fin de l'expérimentation, le rendement de croissance, la matière sèche, les cendres totales, le rendement d'extraction des polyphénols ainsi que les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins et l'activité antioxydante ont été déterminés.

Les résultats obtenus montrent que les frondes d'*Azolla pinnata* contenues de se multiplier et tolèrent une concentration de 30 mmol de NaCl dans le milieu de culture mais cette croissance est très faible par rapport au témoin. Nous avons observé aussi un jaunissement des feuilles dès le troisième jour pour cette concentration de sel.

De nos résultats, il apparaît qu'*Azolla pinnata* a réagi au stress salin par augmentation de l'accumulation des polyphénols totaux et des flavonoïdes jusqu'à une concentration de 20 mmol de NaCl dans le milieu de culture. A 30 mmol ces teneurs ont fortement diminué.

La réaction de cette fougère vis à vis du stress salin a été différente pour les tanins. La teneur en ces principes actifs a diminué avec l'augmentation de la salinité.

Une corrélation positive entre les teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes et l'activité antioxydante des extraits d'*Azolla pinnata* a été observée.

Références bibliographiques

- **Abdelatty A.M., Mandouha M.I., Mousa M.R., Mansour H.A., ordd H.F et al.** Sun-dried Azolla leaf meal at 10% dietary inclusion improved growth, meat quality, and increased skeletal muscle Ribosomal protein S6 kinase β 1 abundance in growing rabbit. *Animal*. (2021). 15(10). 100348
- **Amroune N. 2020.** Alimentation du lapin : valorisation de l'Azolla dans l'alimentation des lapins etude bibliographique. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de master. 40 p
- **Alalade O.A., Iyayi E.E.** Chemical composition and the feeding value of Azolla (*Azolla pinnata*) meal for egg-type chicks. *International Journal of Poultry Science*. (2006). 5(2). 137-141.
- **Anonyme. 2009.** Salinisation et sodification. L'agriculture durable et la conservation des sols. Processus de dégradation des sols. Fiche technique N°4. 4p.
- **Anthony N.B. 2007.** Essai comparatif de la qualité fertilisante d'*Azolla cristata* et d'autres fumures (Fiente, lissier et urée). Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licencié en Pédagogie appliquée. 90p.
- **Basak B., Ahsan H.P., Muhammad S.R., Sharif U.T., Bimol C.R.** Azolla (*Azolla pinnata*) as a feed ingredient in broiler ration. *International Journal of Poultry Science*. (2002). 1(1). 29-34
- **Becking J.H.** Environmental requirements of Azolla for use in tropical rice production, Nitrogen and rice symposium proceedings. (1979). 345-373.
- **Belkhodja M.B.** Réponse des grains d'*Atriplex halimus* L à la salinité au stade de la germination. *Sécheresse*. (2004). 15(4). 331-335.
- **Ben Khaled L., Ouaraquie M., Ezzedine Z.** Impact du NaCl sur la croissance et la nutrition de la variété de blé dur Massa cultivée en milieu hydroponique, *Acta Botanica Gallica*. (2007). 101-116.
- **Bissati S., Djerroudi O., Mehani M., Belkhodja M.** Effet du stress salin sur deux paramètres hydriques (turgescence et transpiration) de jeunes plants d'*Atriplex halimus* et *Atriplex canescens*. *Revue des Bio Ressources*. (2011). 1(1). 31-38.
- **Bouaouina S., Zid E., Hajji M.** Tolérance a la salinité, transports ionique et fluorescence chlorophyllienne chez le blé dur (*Triticum turgidum* L). *CIHEAM - Options Méditerranéennes*. (2000). 239-243.
- **Bouda S., Haddioui A.** Effet du stress salin sur la germination de quelques espèces du genre *Atriplex*. *Revue «Nature et Technologie»*. (2011). 5. 72-79.
- **Boulasnem F., Ben Salam M.** Effet de la salinité sur la germination de graines des céréales cultivées en Tunisie. (1998). *Cahier Agriculture*. 7. 153-156.
- **Delbar T.** Les plantes face au stress salin. *Cahier d'agriculture*. (1995). 4. 263-273.
- **Djamila H. 2018.** Découvrez les avantages et les utilisations de la plante Azolla. <https://www.elaard.com>.
- **Dommergues Y.R., Diem H.G.** Microbiology of Tropical Soils and Plant Productivity. *Devloppements in plant and soil science*. (1982). 5. 329p.
- **Hadji et al.** Étude comparative de la qualité de la symbiose (*Anabaena azolla*, *Azolla caroliniana*), du compost et du NPK sur la croissance végétative et le rendement. *Journal of Applied Biosciences*. (2014). 81:72-77.
- **Hajlaoui H., Denden M., Bouslama M.** Etude de la variabilité intra spécifique de tolérance au stress salin du pois chiche (*Cicer arietinum* L.) au stade germination. *Tropicultura*. (2007). 168-173.

- **Hanana M., Amrouni L., Olivie C., Blumwald E.** Mécanismes et stratégies cellulaires de tolérance à la salinité (NaCl) chez les plantes. Science and Technology journals. (2011). 3P.
- **Hamdou N., 2012.** Effet du stress salin sur la croissance et la physiologie de la féverole (*Vicia faba* L.). Ecole Nationale Supérieure Agronomique D'El Harrach (Alger). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en science agronomique. 50p.
- **Hopkins W.G. 2003.** Physiologie végétale. 2ème édition américaine par Serge Rambour, De Boeck. 514 p
- **Kloppmann. K, Bourhane. A, Schomburgk. S, Asfirane F. 2011.** Salinisation des masses d'eaux en France : du constat au diagnostic. Rapport final BRGM/RP-60186-FR, 36p.
- **Kostas. C,** Hybrids to NaCl salinity during different growth stages. Scientia Horticulture, 2000, 86, p 247-260.
- **Kumar G. and Chander H.** A Study on the Potential of *Azolla pinnata* as Livestock Feed Supplement for Climate Change Adaptation and Mitigation. Asian J. Adv. Basic Sci. (2017). 5(2). 65-68.
- **MadaFlora 2008.** <https://www.madaflora.com/vertu-des-plantes.php>.
- **Mahmoudi S., Kali M., Mahmoudi N.** Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). Revue Nature et Technologie. (2013). 5(2). 35-40.
- **Marmoud A. 2006.** Maitrise de la salinité des sols. Coure physique du sol. 14p.
- **Lallemend. 1980.** Aménagement Des Sols Salés Irrigation Avec Des Eaux Salées, Département EAU B.P. 34p. doi : 6009 - 45060 Orléans Cedex.
- **Leterme P., Londono AM., Munoz JE., Suarez J., Bedoya CA., Souffrant WB., Buldgen A.** Nutritional value of aquatic ferns (*Azolla filiculoides* Lam. and *Salvinia molesta* Mitchell) in pigs. Animal Feed Science and Technology. (2009). 149. 135-148.
- **Levigneron A., Lopez F, Varisuyt G., Berthomie P., Casse Mallek M.E.** Les plantes face au stress salin. Cahiers Agricultures. (1995). 4p.
- **Mohammed M., Shibli R., Ajlouni M., Nimr L.** Tomato root and shoot responses to salt stress under different levels of phosphorus nutrition. Journal of plant nutrition. (1998). 1667-1680.
- **MONTROI JEAN P. 2017.** La salinisation des écosystèmes : de la dégradation insidieuse à la remédiation continue par les hommes. In : LOIREAU MAUD (ED.), Ben Khatra N. (ed.). Désertification et système terre : de la (re)connaissance à l'action.
- **Nabi F. 2009.** Effet de la salinité sur la germination, la croissance et les composantes du rendement du *Vigna unguiculata* L. Ecole Nationale Supérieure Agronomique D'El Harrach (Alger). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biotechnologies végétales. 125 p.
- **Ntendele Bikela A. 2007.** Essai comparatif de la qualité fertilisante d'*Azolla cristata* et d'autres fumures (fiente, lisier et urée). Mémoire licence. Institut supérieur pédagogique de la Gombe Kinshasa.
- **Ong Ramilamina.** Utilisation de l'*Azolla* comme Source de Protéines pour l'Alimentation Animale à Madagascar. Antsirabe. (1995). 18p.
- **Ouedraogo B., Nikiema Z.S., Zoundi J.S., et Sawadogo L.** Effets de l'incorporation de la biomasse d'*azolla* (*Azolla pinnata*) séchée dans les rations du poulet en aviculture traditionnelle améliorée. Int. J. Biol. Chem. Sci. (2021). 212-223.
- **Parida A.K., Das A.B.** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety. (2005). 60. 324-349.

- **Raeolina B.A. 1995.** L'utilisation de l'Azolla dans l'alimentation Du poulet de chair. Mémoire de fin d'étude , université d'Antananarivo.
- **Rajesh S.,** Production of azolla as livestock feed supplement in India. Pashudhan praharee. Indian Dairy & Poultry industry. (2020). 43p.
- **Rahagarison. 2005.** Etude bibliographique de l'Azolla ou la « ramilamina » plante fertilisatrice d'Azote (N₂). 301p
- **Rai V. and Rai A.K.** Growth behaviour of *Azolla pinnata* at various salinity levels and induction of high salt tolerance. Plant and Soil. (1999). 206. 79–84.
- **Rasoloarivony R. 2003.** Contribution a l'étude de l'influence des conditions climatiques sur la sporulation d' *azolla*, en pépinière, dans la région d'Antananarivo. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat de troisieme cycle option : physiologie végétale. 173p.
- **Reynouda P.A., Franche C. 1985.** *Azolla Pinnata* Var. Pinnata, Dakar: ORSTOM. 15p
- **Safer. S, 2018.** Teneur en polyphénols, tannins et flavonoïdes et capacité antioxydante d'extrait méthanolique d'une plante, Mémoire De Fin D'études Pour l'Obtention du Diplôme de Master en Chimie, université Abdelhamid ibn badis-Mostaganem, p 41.
- **Schramm M., Rakotonaivo G. 1987.** Contribution à l'étude préliminaire de l'Utilisation de l'Azolla comme Engrais Vert en Riziculture Malgache, Antananarivo : Académie Malgache. Colloque international sur l'amélioration de la riziculture par les méthodes biologiques. 9 p.
- **Sebastian A., Deepa P. and Narasimha Vara P.M. 2021.** Azolla Farming for Sustainable Environmental Remediation. In : Narasimha Vara Prasad M. Handbook of Assisted and Amendment-Enhanced Sustainable Remediation Technology. First Edition. ED John Wiley & Sons Ltd. 517-532pp.
- **Shamna. T .P, Peethambaran P.A., Jalaludeen A., Joseph L., Aslam M.K.M.** Broiler characteristics of Japanese quails (*Coturnix japonica*) at different levels of diet substitution with *Azolla pinnata*. Animal Science Reporter. 2013. 7 (2): 75-80.
- **Tahraoui. S, 2015** , Effet des sels solubles sur la production de la biomasse et l'absorption des éléments minéraux chez l'orge (*Hordium vulgare*) et le blé dur (*Triticum durum*). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en sciences agronomiques. Université Mohamed Khider Biskra. 114p.
- **Terchi S. 2014.** Etude de l'impact de la qualité des eaux d'irrigation sur la fertilité du sol, la plante le rendement des systèmes d'irrigation, Mémoire de master pour l'obtention du diplôme de Master en Hydraulique, Ecole nationale supérieure d'hydraulique -Arbaoui Abdellah, 54 p.
- **Tran T.L.N., Miranda A.F., Abeynayake S.W. and Mouradov A.** Differential Production of Phenolics, Lipids, Carbohydrates and Proteins in Stressed and Unstressed Aquatic Plants, *Azolla filiculoides* and *Azolla pinnata*. Biology. (2020). 9. 342; doi:10.3390/biology9100342.
- **Trombling G.** Comportement auto-écologique de *Haloplepis amplexicaulis* Plante pionnière des Sebkhha de l'ouest Algérien. Sciences et changement planétaires. Sécheresse. (2000). 11(2). 109-116.
- **Vaishali M., Patil N.M.** Anticancer Potential of Flavonoids: Chemistry, Biological Activities, and Future Perspectives, Studies in Natural Products Chemistry. (2018). DOI:10.1016/B978-0-444-64179-3.00012-8.

- **Vandna R. and Ashwani K.R.** Growth behaviour of *Azolla pinnata* at various salinity levels and induction of high salt tolerance. Department of Botany. (1998). Varanasi 221005, 6p .
- **Van Hove C.** *Azolla* et ses emplois multiples (publié à la demande de la FAQ) Saint-Etienne, Biologique, E, Oleffe, 1989, 52 p.
- **Zitouni M.A. 2015.** Etude du contenu polyphénolique de la fève (*Vicia faba* L.) et évaluation de son activité antioxydante en conditions de stress salin. Magister en biologie. Sciences du Sol et Environnement. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.