



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



**UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN**

# MEMOIRE

Présenté à la:

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

**MASTER EN CHIMIE**

Spécialité : Chimie Physique

Par :

**Melle BOUAZZA Zakia**

Sur le thème

---

## **Optimisation de l'extraction des biomolécules d'*Azolla pinnata* en vue de leur exploitation**

---

Soutenu publiquement le 13 juin 2024 À Tlemcen devant le jury composé de :

Pr. ALLALI Hocine	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Dr. DJAMAI Wissam	MCB	Université de Tlemcen	Encadrante
Dr. ALI-NEHARI Abdelkader	MCA	Université de Tiaret	Co-encadrant
Dr. MAKHLOUF Hamdi	MAB	Ecole normale supérieure de Boussaâda	Examineur

Année Universitaire : 2023 – 2024

## **DEDICACE**

*Louange à Dieu qui, par Sa grâce, a couronné ce parcours de plusieurs années et multiplié Ses bienfaits, nous permettant d'achever ce travail. Je dédie ce travail*

*À mon père, qui m'a toujours fait passer en priorité et m'a entouré de son amour inconditionnel.*

*À ma mère, qui ne m'a jamais abandonné, même lorsque je me suis abandonné moi-même.*

*À mes frères, Charaf Eddine et Houssam, pour leur soutien dans mes études et ma réussite, c'est à vous que je dédie ce travail. Je vous aime.*

*À l'homme qui a quitté ce monde avant que je puisse lui rendre ses bienfaits, mon oncle Ahmed Chadouli, que Dieu ait son âme. À la personne la plus chère que la vie m'a donnée, ma tante Amina Zouichene.*

*À ma tante Karima, mon oncle Ahmad Zouichene, et ma tante Leila CHIKH merci pour votre amour et votre soutien, que Dieu vous protège et vous garde.*

*À mes professeurs Mme Kara Zaitri, Mme Merad, Mr Mekelleche, Mme Benaissa et Mr Zahdour Mounir.*

*À mes amies Abir BADAoui, Imene BOUBERKA, Chahrazed LAYATI, Nouria BELAID, Nadia BOUHADJA et à tous ceux qui ont contribué à ma réussite je vous aime.*

**ZAKIA**

## REMERCIEMENT

Tout d'abord et avant tout, je loue et remercie Dieu Tout-Puissant pour Ses innombrables bénédictions et pour m'avoir accordé le succès dans l'achèvement de cette recherche.

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de spectrochimie et pharmacologie structurale (LSPS), facultés des sciences, université de Tlemcen.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements à Madame DJAMAI Wissam maître de conférences B à l'université de Tlemcen, qui n'a ménagé aucun effort pour me guider et m'orienter tout au long de la préparation de ce travail. Son soutien constant, sa patience et ses précieux conseils.

Je souhaite également remercier mon co-encadrant, Monsieur ALI-NEHARI Abdelkader, maître de conférences A à l'université de Tiaret pour ses conseils avisés et son soutien continu.

Je remercie sincèrement le président du jury, Monsieur ALLALI Hocine, Professeur à l'université de Tlemcen, qui nous a honorés en acceptant de présider le comité de soutenance

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur MAKHLOUF Hamdi maître-assistant B à l'école normale supérieure de Bousaada, qui a aimablement accepté d'examiner ce travail.

Je remercie toute l'équipe de formation de la promotion « Chimie physique », en particulier Mme Wafaa BENCHOUK, ainsi que tous mes professeurs et collègues de la promotion.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont soutenu et encouragé durant cette période, mes professeurs, membres du laboratoire (LSPS), collègues et amis. Sans leurs encouragements et leur soutien, je n'aurais pas pu atteindre ce stade.

Merci infiniment à tous.

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحسين طرق استخراج الجزيئات الحيوية من السرخس المائي ازولا بيناتا بهدف استخدامها في تطبيقات متنوعة. تم تنفيذ طريقتين للتجفيف: التجفيف في الفرن والتجفيف بالتجميد. بعد ذلك، تم استخراج الجزيئات الحيوية باستخدام الموجات فوق الصوتية، والتسخين الانعكاسي، وطريقة تجمع بين التقنيتين. تم استخدام ثلاثة مذيبات مختلفة القطبية: الماء، الميثانول بنسبة 80%، والأسيتون بنسبة 90%. تم تحديد محتوى الجزيئات الحيوية في كل مستخلص، مثل الكربوهيدرات، وكذلك الأصباغ، والبوليفينولات، والفلافونويدات نظراً لخصائصها المضادة للأكسدة. تم تقييم القدرة المضادة للجذور الحرة لهذه المستخلصات باستخدام اختبار DPPH (2,2-ثنائي فينيل-1-بيكريل هيدرازيل) وتم تقييم القدرة الاختزالية باستخدام اختبار FRAP القدرة المضادة للأكسدة الاختزالية الحديدية. تم تصنيع الجسيمات النانوية الفضية من المستخلص المائي الذي يحتوي على أعلى نسبة من الجزيئات النشطة بيولوجياً وتميزت باستخدام التحليل الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية-المرئية، التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء (IR)، حيود الأشعة السينية (XRD)، والمجهر الإلكتروني الماسح (SEM). أظهرت النتائج وجود كميات كبيرة من الأصباغ باستخدام الأسيتون بنسبة 80% و 90% من الأسيتون للبوليفينولات والفلافونويدات مع التسخين الانعكاسي والتجفيف في الفرن. سمحت تمييز الجسيمات النانوية باستخدام تقنيات مختلفة بتحديد منطقة الامتصاص للجسيمات النانوية الفضية (450 نانومتر)، والمجموعات الوظيفية التي تساهم في اختزال أيونات الفضة (Ag+)، والفئة البلورية التي تنتمي إليها) مكعب مركزي الوجه. (CFC)

### الكلمات المفتاحية:

ازولا بيناتا، الجزيئات الحيوية، النشاط المضاد للأكسدة، الجسيمات النانوية الفضية.

## ***Résumé***

Cette étude a pour objectif d'optimiser les méthodes d'extraction des biomolécules de la fougère aquatique *Azolla pinnata* en vue de leur exploitation dans diverses applications. Deux méthodes de séchage ont été mises en œuvre : le séchage à l'étuve et la lyophilisation. Les biomolécules ont ensuite été extraites en utilisant des ultrasons, le reflux et une méthode combinant les deux techniques. Trois solvants de polarités différentes ont été employés : l'eau, le méthanol à 80 % et l'acétone à 90 %. Les teneurs en biomolécules présentes dans chaque extrait, telles que les glucides, ont été déterminées, de même que les pigments, polyphénol et flavonoïdes en raison de leurs propriétés antioxydantes. Le pouvoir antiradicalaire de ces extraits a été évaluée par le test DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) et le pouvoir réducteur a été évaluée par tests FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Les nanoparticules d'argent ont été synthétisées à partir de l'extrait aqueux contenant les teneurs les plus élevés en molécules bioactives et caractérisées en utilisant la spectroscopie UV-Visibles, la spectroscopie infrarouge (IR), diffraction des rayons X (DRX), et la Microscopie Électronique à Balayage (MEB). Les résultats ont prouvé la présence des quantités importantes des pigments en utilisant l'acétone 80% et acétone 90% pour les polyphénol et les flavonoïdes avec les reflux et le séchage par l'étuve . La caractérisation des nanoparticules par différentes techniques a permis de déterminer la zone d'absorption des nanoparticules d'argent (450 nm), les groupes fonctionnels contribuant à la réduction d'Ag<sup>+</sup> et la classe cristalline à laquelle elles appartiennent (cubique face centrée 'CFC').

**Mots clés :** *Azolla pinnata*, Biomolécules, activité antioxydante ,Nanoparticules d'argent.

## ***Abstract***

This study aims to optimize the extraction methods of biomolecules from the aquatic fern *Azolla pinnata* for their exploitation in various applications. Two drying methods were implemented: oven drying and lyophilization. The biomolecules were then extracted using ultrasound, reflux, and a combined method of both techniques. Three solvents with different polarities were employed: water, 80% methanol, and 90% acetone. The content of biomolecules present in each extract, such as carbohydrates, as well as pigments, polyphenols, and flavonoids, were determined due to their antioxidant properties. The radical scavenging ability of these extracts was evaluated using the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) test, and the reducing power was assessed using the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) test. Silver nanoparticles were synthesized from the aqueous extract containing the highest levels of bioactive molecules and characterized using UV-Visible spectroscopy, infrared spectroscopy (IR), X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM). The results demonstrated the presence of significant amounts of pigments using 80% acetone and 90% acetone for polyphenols and flavonoids with reflux and oven drying. Characterization of the nanoparticles using various techniques allowed for the determination of the absorption zone of silver nanoparticles (450 nm), the functional groups contributing to the reduction of Ag<sup>+</sup>, and the crystalline class they belong to (face-centered cubic 'FCC').

**Keywords:** *Azolla pinnata*, Biomolecules, Antioxidant activity, Silver nanoparticles.

## TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
Chapitre I :Généralités	
<i>I.1 Azolla Pinnata</i> .....	3
I.2 Classification de l' <i>Azolla</i> .....	3
I.3 La morphologie de l' <i>Azolla pinnata</i> .....	4
I.4 Conditions de culture.....	5
I.5. Reproduction .....	5
I.6 La composition biochimique de l' <i>Azolla Pinnata</i> .....	5
I.7 Exploitation de l' <i>Azolla pinnata</i> .....	6
I.7.1 <i>A.pinnata</i> : source d'alimentation et engrais.....	6
I.7.2 <i>A. pinnata</i> : antioxydant, antibactérien et complément alimentaire.....	6
I.7.3 <i>A. pinnata</i> comme agent de filtration d'eau .....	7
I.7.4 <i>A.pinnata</i> en nanotechnologie.....	7
II.1 INTRODUCTION.....	9
II.2 Réactifs et solvants.....	11
II.3 Préparation des échantillons.....	12
II.4 Extraction des composés bioactifs de l' <i>azolla pinnata</i> .....	13
II.4.1 l'extraction assistée par ultrasons (UAE).....	14
II.4.2 L'extraction par reflux .....	14
II.4.3 Extraction en combinant les ultrasons et le reflux.....	14
II.5 Rendement.....	14
II.6 Teneur en pigment.....	15
II.7 Détermination de la teneur en polyphénol .....	15
II.8 Détermination de la teneur en flavonoïdes.....	16
II.9 Détermination de la teneur en glucides totaux .....	17
II.10 Evaluation de l'activité antioxydante.....	17
II.10.1 Piégeage du radical libre DPPH•.....	17
II.10.2 Réduction de fer FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power).....	18
II.11.1 Caractérisation des nanoparticules obtenus .....	19
a-spectroscopie UV-visible.....	19

b-Principe de la spectroscopie Infrarouge (IR).....	20
c-Principe de la diffractométrie des rayons X (DRX) .....	20
d-Principe du microscope électronique à balayage (MEB) .....	20
III.1 Rendement .....	22
III.2 Teneur en pigments.....	23
III.3 Teneur en flavonoïdes et en polyphénol totaux .....	26
III.4 Teneur en glucide.....	29
III.5 Evaluation de l'activité antioxydante .....	30
III.5.1 Evaluation du pouvoir antiradicalaire par le test de DPPH• : .....	30
III.5.2 Evaluation du pouvoir réducteur par le test FRAP.....	33
III.6 Synthèse des nanoparticules d'argent .....	37
III.6.1 Caractérisation des NpsAg .....	37
A- analyse UV .....	37
B-Infrarouge (IR) .....	39
C-DRX : .....	40
D-MEB : .....	41
Conclusion .....	40

## Liste des figures

Figure I .1 Différentes espèces d' <i>Azolla</i> .....	1
Figure I.2 La morphologie d'une frode.....	2
Figure I.3 Lobe dorsal d'une feuille d' <i>Azolla pinnata</i> .....	2
Figure II.1 Méthodologie expérimentale.....	8
Figure II.2 Séchage d' <i>A. pinnata</i> par lyophilisation et à l'étuve .....	10
Figure II.3 Extraction des composés bioactifs d' <i>A.pinnata</i> .....	11
Figure II.4 Mécanisme réactionnel du DPPH .....	15
Figure III.1 Teneur en pigment pour l' <i>A.pinnata</i> séchée à l'étuve et par lyophilisateur en extrait aqueux.....	21
Figure III.2 Teneur en pigment pour l' <i>A.pinnata</i> séchée à l'étuve et par lyophilisateur en extrait Méthanol80% .....	22
Figure III.3 Teneur en pigment pour l' <i>A.pinnata</i> séchée à l'étuve et par lyophilisateur en extrait Acétone 90%.....	23
Figure III.5 Courbe d'étalonnage en utilisant l'acide gallique .....	24
Figure III.4 Courbe d'étalonnage en utilisant la catéchine.....	24
Figure III.6 Teneur en polyphénol et en flavonoïdes en extrait aqueux .....	24
Figure III.7 Teneur en polyphénol et en flavonoïdes en extrait Méthanol 80% .....	25
Figure III.8 Teneur en polyphénol et en flavonoïdes en extrait Acétone 90% .....	25
Figure III.9 Courbe d'étalonnage des glucides.....	27
Figure III.10: Résultats de la teneur en glucides en différents extraits aqueux pour les différentes méthodes d'extraction.....	29
Figure III.11 Courbe d'étalonnage du test DPPH.....	28
Figure III.12 Les taux d'inhibition du radical DPPH• exprimés en pourcentage, en fonction des concentrations croissantes de chaque extrait. ....	29
Figure III.13 Concentration de chaque extrait qui permet l'inhibition de 50% des radicaux libres pour l' <i>A.pinnata</i> séchée à l'étuve .....	30
Figure III.14 Concentration de chaque extrait qui permet l'inhibition de 50% des radicaux libres pour l' <i>A.pinnata</i> séchée par lyophilisateur.....	30
Figure III.15 Courbe d'étalonnage du test FRAP établie à partir d'acide ascorbique .....	32
Figure III.16 Pouvoir réducteur des différentes concentrations des extraits pour chaque méthode de séchage et pour les trois méthodes d'extraction.....	33

<b>Figure III.17</b> Concentration des extraits d' <i>A.pinnata</i> séchée à l'étuve à une absorbance de 0.5(EC50). .....	<b>33</b>
<b>Figure III.18</b> Concentration des extraits d' <i>A.pinnata</i> séchée par lyophilisateur à une absorbance de 0.5(EC50). .....	<b>34</b>
<b>Figure III.19</b> : Spectre UV-Visible de l'extrait, la solution d'AgNO <sub>3</sub> et le mélange réactionnel.....	<b>36.</b>
<b>Figure III.20</b> : L'effet de la variation de la concentration d'extrait.....	<b>37</b>
<b>Figure III.21</b> : L'effet de la variation des concentrations de nitrate d'argent (AgNO <sub>3</sub> ).....	<b>38</b>
<b>Figure III.22</b> : Spectre IR d'extrait et des nanoparticules d'argent.....	<b>39</b>
<b>Figure III.23</b> : Spectre DRX des Nps-Ag d' <i>A.pinnata</i> .....	<b>40</b>
<b>Figure III.24</b> : Résultats d'analyses des Nps-Ag par MEB.....	<b>41</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I.1 Les espèces d'<i>Azolla</i>.....</b>	<b>1</b>
<b>Tableau II.1 Produits pour les expérimentations.....</b>	<b>9</b>
<b>Tableau III.1 Résultats des rendements des extraits .....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau III.3 Groupes fonctionnels à partir d'analyse IR.....</b>	<b>38</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>Car :</b>	Caroténoïdes
<b>Chl a :</b>	Chlorophylle A
<b>Chl b :</b>	Chlorophylle B
<b>DPPH :</b>	2,2-Diphényle-1-Picrylhydrazyle
<b>DRX :</b>	Diffraction Des Rayon X
<b>EAG:</b>	Equivalent D'acide Gallique
<b>EC50:</b>	Concentration D'extrait A Une Absorbance De 0,5
<b>ECA:</b>	Equivalent De Catéchine
<b>EG:</b>	Equivalent De Glucose
<b>Etv :</b>	<i>Azolla</i> Séchée A L'étuve
<b>FRAP:</b>	Ferric Reduction Antioxydant Power
<b>IC50:</b>	La Concentration D'extrait A 50 % D'inhibition
<b>IR :</b>	Infrarouge
<b>Lyo :</b>	<i>Azolla</i> Lyophilisée
<b>MEB:</b>	Microcopie Electronique A Balayage
<b>NPs-Ag</b>	Nanoparticules D'argent
<b>Ref :</b>	Extraction Par Reflux
<b>US :</b>	Extraction Par Ultrason



**INTRODUCTION  
GÉNÉRALE**

## INTRODUCTION GENERALE

---

Le monde connaît un développement rapide dans le domaine de la chimie dans ses diverses spécialités. Ce développement a contribué à trouver des solutions efficaces dans différents domaines, comme la médecine, l'industrie, l'agriculture...etc. Cependant, il a aussi eu un impact négatif sur la nature et l'humanité. Par exemple, les déchets chimiques médicaux ou de laboratoire, ainsi que les émissions des usines, ont causé de nombreuses maladies chroniques, des stress oxydatifs menant au cancer et aux maladies cardiaques, et d'autres maladies [1].

Pour remédier à cela, une nouvelle forme de chimie, la chimie verte, a vu le jour. Elle repose sur des matières biologiques, comme les plantes, pour développer des solutions et des traitements, offrant ainsi des alternatives durables[2]. Citant l'utilisation des compléments alimentaire riches en biomolécules antioxydantes, issues des plantes, pour lutter contre le stress oxydatif [3, 4], la production de produits cosmétiques naturels comme les crèmes solaires à base de plantes pour se protéger contre les rayons UV [5,6], la synthèse des nanoparticules utilisée en biofiltration d'eau [9, 10,22] et d'autre domaines.

*Azolla pinnata* est une fougère aquatique flottante, reconnue pour sa capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à sa symbiose avec la cyanobactérie *Anabaena azollae* [11]. Sa riche composition biochimique, incluant des protéines, des acides aminés, et des vitamines, en fait une ressource précieuse pour l'agriculture durable et l'alimentation animale. Ainsi que pour ses biomolécules aux propriétés antioxydantes [7]. L'exploitation d'*A. pinnata* permet non seulement d'améliorer la fertilité des sols et de réduire la dépendance aux engrais chimiques, mais aussi de fournir une source nutritive alternative et écologique [22].

Ce travail a pour objectif d'optimiser l'extraction des molécules bioactives d'*A. pinnata* en variant plusieurs paramètres, notamment la méthode de séchage et d'extraction, tout en utilisant des solvants de polarités différentes afin d'obtenir le meilleur rendement en biomolécules. Ces composés seront ultérieurement utilisés pour la synthèse de nanoparticules d'argent. Par la suite, ces nanoparticules ont été caractérisées à l'aide de diverses techniques spectroscopiques.

Ce manuscrit sera décliné en trois chapitres présentés comme suit :

**Chapitre I :** présentera des généralités sur l'*A. pinnata*, sa classification, sa culture et reproduction, ainsi que sa composition biochimique et ses utilisations.

**Chapitre II :** exposera le matériel utilisé ainsi que la méthodologie adoptée pour cette étude.

**Chapitre III :** regroupera les résultats obtenus, accompagnés de leur interprétation.

Le manuscrit se terminera par une conclusion générale qui résumera les principaux résultats obtenus.



**CHAPITRE I**  
**GENERALITES**

### I.1 *Azolla Pinnata*

La fougère aquatique *A. pinnata*, est une source d'alimentation peu commune. Elle appartient à la famille des *Azollaceae* et à l'ordre des Ptéridophytes. Il existe plusieurs espèces différentes d'*Azolla*, principalement présentes dans les régions tropicales et subtropicales, où elles poussent naturellement dans les eaux stagnantes des drains, canaux, étangs, rivières, marais et zones humides. Une caractéristique notable de l'*Azolla* est sa capacité à héberger l'*Anabaena-azollae*, une cyanobactérie qui vit dans les cavités de ses feuilles, ce qui lui permet de fixer de grandes quantités d'azote atmosphérique [11].

### I.2 Classification de l'*Azolla*

Les espèces d'*Azolla* sont regroupées en deux sous-genres : *Euazolla* et *Rhizosperma* et représentés dans le tableau I.1 et illustrés dans la figures I.1 .

**Tableau I.1** : Les espèces d'*Azolla* [12]

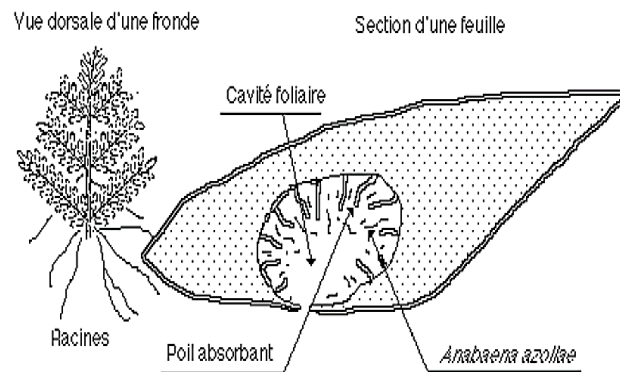
<b>Euazolla</b>	<b>Rhizosperma</b>
<i>A. caroliniana Willd</i>	<i>A. nilotica Decne</i>
<i>A. filiculoides Lam</i>	<i>A. pinnata R. Br</i>
<i>A. mexicana Presl</i>	/
<i>A. microphylla Kaulf</i>	/
<i>A. rubra R.Br</i>	/



**Figure I.1** : Les différentes espèces d'*Azolla* [46]

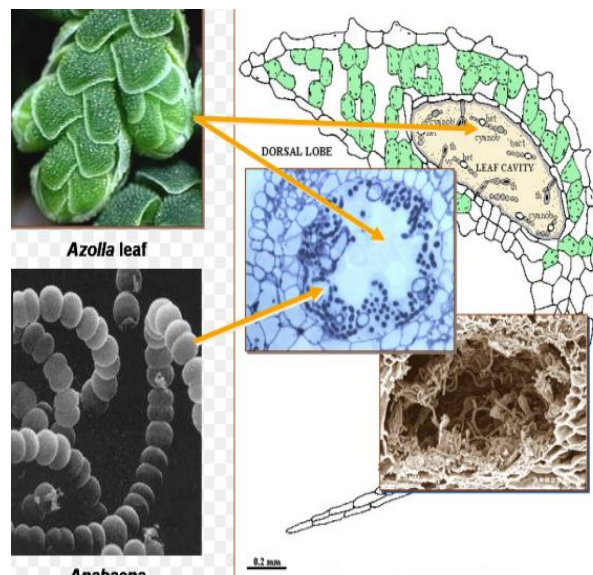
### I.3 La morphologie de l'*Azolla pinnata*

L'*A. pinnata* est fréquemment désignée sous le terme de "fronde". La tige principale de chaque fronde, généralement de 3 à 4 cm de longueur maximum, flotte à la surface de l'eau et est couverte de petites feuilles alternes étroitement imbriquées, ce qui dissimule la tige. Sa forme peut varier entre plus ou moins circulaire ou triangulaire en fonction des espèces [12].



**Figure I.2 :** La morphologie d'une fronde [13]

Les feuilles d'*A. pinnata* sont formées de deux lobes distincts : un lobe dorsal chlorophyllien qui abrite dans une cavité le microorganisme fixateur d'azote et un lobe ventral qui assure la flottaison de la fronde [14].



**Figure I.3 :** Lobe dorsal d'une feuille d'*A. pinnata* [15]

## I.4 Conditions de culture

La croissance optimale d'*A. pinnata* est observée en été, suivie par le printemps, pouvant doubler sa masse en seulement 2 à 5 jours[16].

Les conditions de croissance d'*A.pinnata* sont hiérarchisées comme suit : une gestion adéquate de l'eau, une protection contre les fortes intensités lumineuses, des températures nocturnes minimales de 15°C, diurnes de 25°C et maximales de 35°C, un apport de phosphore, et dans une moindre mesure, de calcium, de magnésium et d'oligo-éléments, ainsi qu'une protection contre les parasites. Une propriété notable d'*A.pinnata* est sa capacité à réagir aux conditions défavorables par des changements morphologiques, par exemple elle devient rouge pourpre en cas d'intensité lumineuse excessive[14].

## I.5. Reproduction

Comme pour toutes les fougères, *A.pinnata* se reproduit à la fois de manière végétative et sexuée. En conditions de reproduction végétative, lorsque la plante atteint environ 1 à 2 cm de diamètre, les ramifications les plus anciennes se détachent pour former de nouvelles frondes plus petites. Pendant cette phase, l'*Anabaena* se reproduit de manière synchronisée avec l'hôte.

Le cycle de reproduction sexuée se déclenche lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables. Des spores mâles (mégaspores) et des spores femelles (microspores) se forment sous la plante, constituant des formes de survie d'*A.pinnata*. La fécondation du gamète femelle par le gamète mâle donne naissance à une jeune plantule. Pendant cette phase, l'association continue entre la fougère et la cyanobactérie est maintenue par la présence de spores d'*Anabaena* (ou akinètes) dans les mégaspores d'*A.pinnata* [14].

## I.6 La composition biochimique de l'*Azolla Pinnata*

Sur une base de poids sec, l'*A.pinnata* présente une composition typique comprenant environ 25 à 35 % de protéines et environ 7 à 10 % d'une combinaison d'acides aminés, de substances bioactives et de biopolymères. Sa teneur en glucides et en huiles est très faible. Parmi ses composants notables figurent des minéraux essentiels (10 à 15 %) tels que le calcium, le phosphore, le potassium, le fer, le cuivre et le magnésium, ainsi que des nutriments tels que les chlorophylles, les caroténoïdes [17] et diverses vitamines, notamment la vitamine A et la vitamine B12, ainsi que le bêta-carotène[18]. *A.pinnata* renferme aussi des métabolites secondaires bioactifs, incluant des phénols, flavonoïdes, des tanins, du saccharose, des glycosides d'antraquinone et des stéroïdes (ou alcaloïdes stéroïdiens). [18].

Ces composants bioactifs sont considérés comme des antioxydants naturels [19] et peuvent être extraits à l'aide de plusieurs méthodes conventionnelles, telles que la percolation, la macération, la décoction, l'extraction Soxhlet, [20] ainsi que des méthodes modernes telles que l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction assistée par ultrasons (UAE) et l'extraction utilisant des fluides supercritiques (SFE) dépendent du groupement moléculaire visé [21].

## **I.7 Exploitation de l'*Azolla pinnata***

*L.A.pinnata*, une plante aquatique, également connue sous le nom d'**or vert**, présente un fort potentiel pour être utilisée dans divers domaines tels que l'alimentation humaine, l'alimentation animale et le fourrage [22].

### **I.7.1 *A.pinnata* : source d'alimentation et engrais**

*L'A. pinnata* est largement exploitée comme source de nourriture dans l'industrie avicole et comme engrais pour enrichir les sols des rizières. De plus, elle est utilisée comme agent larvicide pour combattre les larves [23]. En tant qu'excellent engrais organique, son utilisation efficace et réfléchie pourrait constituer une base solide pour le développement de l'agriculture en général, et de l'aquaculture en particulier. L'emploi de ces fertilisants organiques dans la production piscicole est prometteur. En effet, ils représentent une alternative nécessaire aux engrais chimiques, qui causent de nombreux dommages à l'environnement et à la biodiversité. En rationalisant cette pratique dans les zones rurales, notamment pour l'élevage des poissons, nous pourrions contribuer de manière significative au développement durable de la pisciculture. [24]

### **I.7.2 *A. pinnata* : antioxydant, antibactérien et complément alimentaire**

La fiabilité de *l'A.pinnata* en tant que source potentielle de développement de compléments alimentaires a été évaluée en examinant ses propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Les résultats montrés en [22] montrent une présence importante des antioxydants.

De plus, une activité antibactérienne satisfaisante a été observée contre des agents pathogènes tels que *Staphylococcus sp.* et *Bacillus sp.* Ces caractéristiques antioxydantes et antimicrobiennes de *l'A.pinnata* renforcent son potentiel en tant que source nutritionnelle.

### **I.7.3 *A. pinnata* comme agent de filtration d'eau**

La fougère aquatique *Azolla*, qui pousse naturellement, est une approche excellente pour le traitement des eaux usées dans les tests expérimentaux. Sa fonction principale est de réduire la demande en oxygène métabolique et chimique. Cette méthode peut également réduire d'autres variables telles que l'azote, le phosphate et le potassium. L'algue *A.pinnata* peut stocker les contaminants dans ses tissus en consommant de l'eau pour son développement [22].[ 45]

### **I.7.4 *A.pinnata* en nanotechnologie**

La nanotechnologie, définie comme la recherche et le développement opérant à l'échelle atomique, moléculaire ou macromoléculaire [25], a trouvé en l'*A.pinnata*, une fougère aquatique, une source prometteuse pour la synthèse de nanoparticules[9,10]. Ces nanoparticules, dont la taille se situe entre 1 et 100 nm, possèdent des propriétés uniques et sont largement exploitées dans divers domaines, tels que l'électronique, le biomédical, l'environnement et les matériaux[25]. L'*A. pinnata* a été utilisée avec succès dans la production de nanoparticules de sélénium, bénéfiques pour le traitement des eaux usées [10], de plus une étude a montré que les nanoparticules de sélénium ont une activité catalytique puissante sur la transformation du p-Tolualdéhyde en acide p-Toluique où le rendement % a été trouvé à 78,3% avec un avantage que les nanoparticules de sélénium peuvent être réutilisées [10]. ainsi que dans la synthèse de nanoparticules d'argent [9] , ayant des applications variées en catalyse, biocapteurs [27] le contrôle du gradient de charges électriques [28]. Cette utilisation de l'*A. pinnata* comme source de nanoparticules offre des opportunités significatives pour le développement de la nanotechnologie et sa contribution à divers secteurs industriels et environnementaux. [25]

**CHAPITRE II**  
**MATERIEL & METHODES**

**II.1 INTRODUCTION**

L'optimisation de l'extraction des biomolécules actives exige une approche méthodologique, tenant compte de divers paramètres influant sur le processus d'extraction.

Dans le cadre de cette étude, deux techniques de séchage ont été réalisées: le séchage à l'étuve et la lyophilisation. En ce qui concerne l'extraction, trois méthodes ont été mises en œuvre: l'utilisation d'ultrasons, le reflux ainsi qu'une combinaison des deux (ultrasons + reflux). Pour chacune de ces méthodes, trois solvants distincts ont été utilisés : eau distillée, méthanol/eau (80 :20 ; v/v), acétone/eau (90 :10; v/v). Après l'obtention des biomolécules souhaitées, leur pouvoir antiradicalaire ainsi que réducteur seront évaluées à l'aide des tests DPPH et FRAP respectivement. Ensuite, l'extrait aqueux offrant le meilleur rendement en biomolécules bioactives sera sélectionné pour la synthèse des nanoparticules d'argent. Enfin, ces nanoparticules seront caractérisées en utilisant les techniques suivantes ( UV, IR, DRX, MEB).

Le schéma présenté dans figure (II.1) résume les principales étapes de la méthodologie expérimentale utilisée pour cette étude sur *A.pinnata* et la synthèse de nanoparticules d'argent.

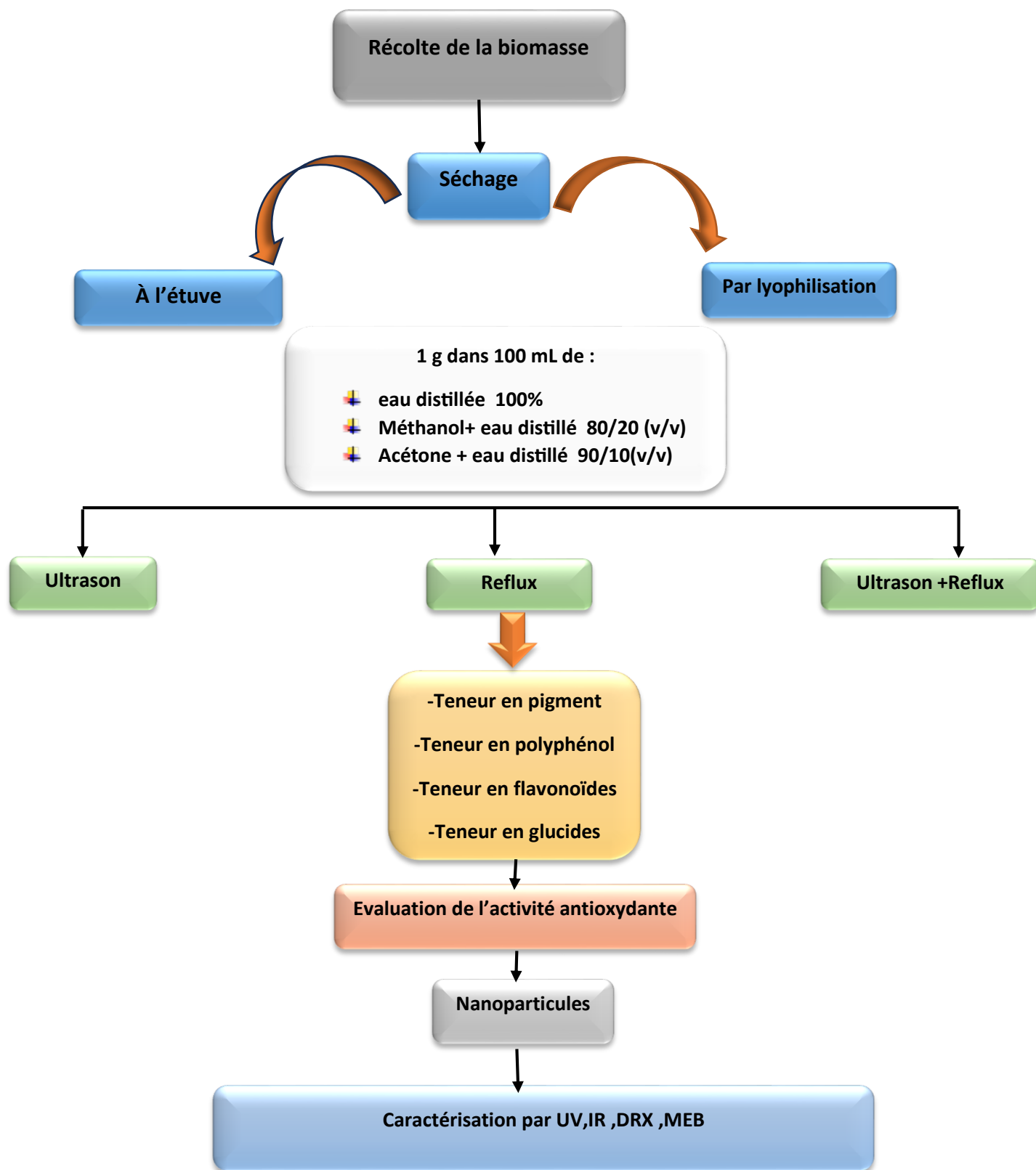


Figure II.1 : Méthodologie expérimentale

## II.2 Réactifs et solvants

Les divers produits utilisés dans les différentes expérimentations et analyses réalisées sont présentés dans le tableau II.1.

**Tableau II.1** : Produits utilisés pour les expérimentations

Produits	CAS	Fournisseur
Méthanol	67-56-1	Sigma Aldrich
Acétone	67-64-1	Sigma Aldrich
Dihydrogénophosphate De Sodium ( NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	7558-80-7	Sigma Aldrich
Hydrogénophosphate De Sodium (Na <sub>2</sub> hpo <sub>4</sub> )	7558-79-4	Sigma Aldrich
K <sub>3</sub> FECN <sub>6</sub> (Hexacyanoferrate(III) De Potassium)	13746-66-2	Sigma Aldrich
TCA (Acide Trichloroacétique)	03-9	Sigma Aldrich
FECL <sub>3</sub> (Chlorure De Fer(III))	7705-08-0	Sigma Aldrich
AgNO <sub>3</sub> (Nitrate D'argent)	7761-88-8	Sigma Aldrich
La Catéchine	154-23-4	Sigma Aldrich
Acide Gallique	149-91-7	Sigma Aldrich
Acide Ascorbique (Vitamine C)	50-81-7	Sigma Aldrich
2,2-Diphényl-1-Picrylhydrazyle (Dpph)	1898-66-4	Sigma Aldrich
NaNO <sub>2</sub> (Nitrite De Sodium)	7632-00-0	Sigma Aldrich
AlCO <sub>3</sub> (Carbonate D'aluminium)	21645-51-2	Merck
NaOH (Hydroxyde De Sodium)	1310-73-2	Sigma Aldrich
Folin-Ciocalteu (Réactif Folin-Ciocalteu)	62625-14-1	Sigma Aldrich
Carbonate De Sodium (Soude)	497-19-8	PROLABO
Acide sulfurique H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7664-93-9	RROLABO
Phénol C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	108-95-2	Sigma Aldrich

### II.3 Préparation des échantillons

La biomasse aquatique étudiée dans notre recherche est *A. pinnata* (figure II.2). Cette plante a été séchée initialement en utilisant deux méthodes : l'étuve et la lyophilisation.

Les échantillons d'*A.pinnata* ont été préalablement lavés à l'eau du robinet, puis rincés à l'eau distillée et séchés dans une étuve à une température de 45°C pendant 4 jours. Pour la deuxième méthode de séchage qui est la lyophilisation, la matière rincée a été congelée, puis placée directement dans le lyophilisateur (Christ Martin ALPHA 1-2 LD plus), permettant ainsi la lyophilisation sous vide pendant 48 heures

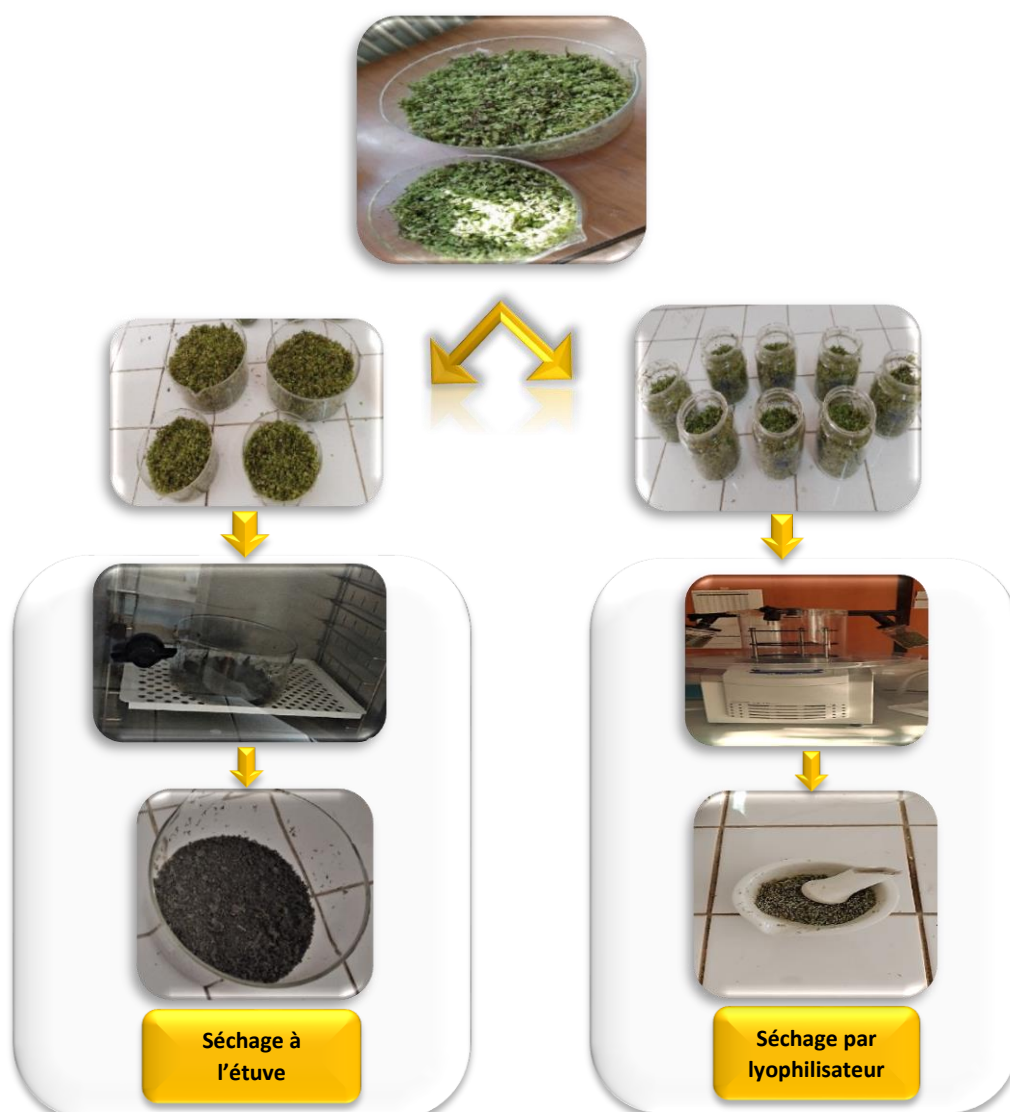


Figure II.2 : Séchage de l'*A. pinnata* par les deux méthodes (étuve et lyophilisation)

### II.4 Extraction des composés bioactifs de *l'azolla pinnata*

Les méthodes d'extraction des plantes sont cruciales, variant entre traditionnelles et modernes. Les méthodes traditionnelles, simples et peu coûteuses, utilisent des solvants et sont chronophages [21]. tandis que les méthodes modernes, plus complexes et coûteuses, sont utilisées pour l'extraction des produits naturels [20]. La figure II.3 montre l'étape d'extraction des biomolécules à partir de *l'A. pinnata*.

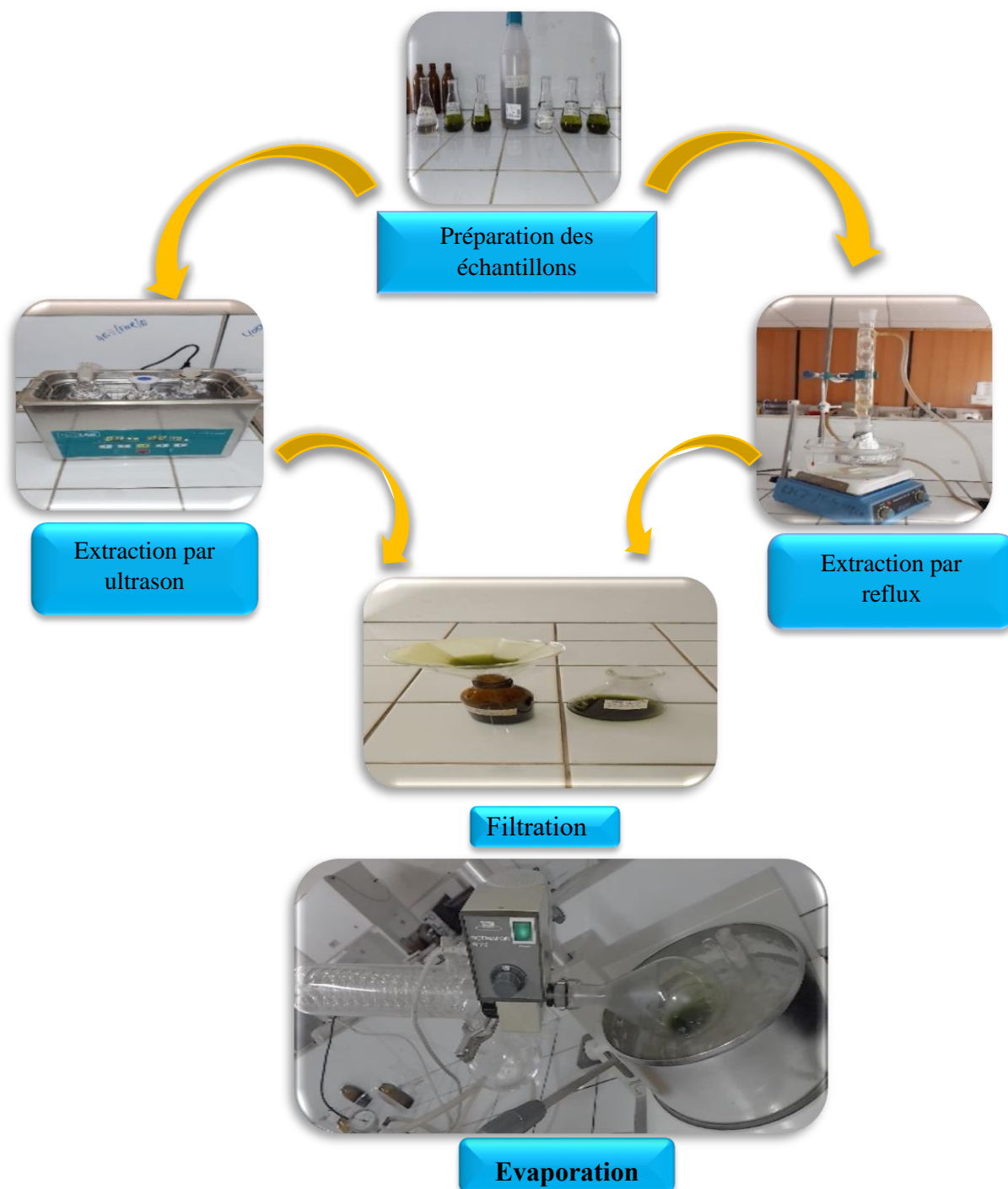


Figure II.3 : Extraction des composés bioactifs d'*A. pinnata*.

#### II.4.1 l'extraction assistée par ultrasons (UAE)

L'extraction par ultrasons a été réalisée en plaçant un erlenmeyer contenant 1g d'*A.pinnata* sèche et 100 ml de solvant dans un bain ultrasonique (iso lab )pendant une durée de cinq minutes à température ambiante (22°C). Trois solvants distincts ont été utilisés : eau distillée, méthanol/eau (80 :20 ; v/v), acétone/eau (90 :10; v/v).

Les ultrasons utilisent des ondes de haute fréquence, créant des vibrations qui provoquent la dilatation et la compression du matériau qui est dans ce cas de *l'A. pinnata*, ce mouvement oscillant génère des bulles ou des cavités dans le solvant utilisé (entraînant une augmentation de la température et la rupture de la tension superficielle de la membrane cellulaire. Cela facilite la pénétration du solvant dans le tissu végétal, permettant l'extraction les composants actifs par différence de concentration [30].

#### II.4.2 L'extraction par reflux

Les mélanges préparés (1 g d'*A.pinnata* sèche et 100 ml de solvant) ont été placées dans un ballon à col rodé et chauffées dans un montage de reflux à une température de 45°C pendant une durée d'une heure.

L'extraction par reflux est une technique offre l'avantage d'être simple, couramment utilisée en chimie pour extraire des composés bioactifs à partir de la biomasse, grâce à un choix de solvant adéquat aux composés ciblés. Ce processus implique le chauffage d'un solvant jusqu'à ébullition, puis la condensation des vapeurs de ce solvant, qui retombent ensuite continuellement sur la matière végétale (*A. pinnata*) contenant les composés à extraire. Le solvant chaud en circulation constante facilite une interaction prolongée avec la matière végétale permettant une extraction efficace des substances désirées.

#### II.4.3 Extraction en combinant les ultrasons et le reflux

Les mélanges (1 g d'*A.pinnata* sèche et 100 ml de solvant) ont été immergés dans un bain ultrasonique pendant cinq minutes à une température ambiante de 22°C. Ensuite, ils ont été transférés vers le montage de reflux pendant une heure à une température de 45°C.

A la fin de la durée de chaque extraction, les extraits ont été filtrés dans des flacons à l'aide de papier filtre, puis évaporés pour calculer le rendement. Ensuite, ils ont été récupérés et conservés au congélateur pour utilisation ultérieure.

### II.5 Rendement

Le rendement est défini comme la quantité totale d'un soluté que l'on retrouve dans l'extrait. Il est exprimé en pourcentage (%) et calculé en utilisant la formule indiquée dans l'équation suivante:

$$R = (M1/M2) * 100 \quad (II.1)$$

M1 : la masse en gramme (g) de l'extrait évaporé.

M2: la masse en gramme (g) de la matière sèche.

## II.6 Teneur en pigment

Les pigments que nous avons identifiés dans cette étude sont la chlorophylle a (Chl a), la chlorophylle b (Chl b) et les caroténoïdes (Car). Les absorbances des solutions ont été ensuite mesurées à 470, 652,4 et 665,2 nm pour la quantification des pigments[31]. Ces pigments ont été déterminés dans l'extrait en utilisant les équations suivantes :

- **90% Méthanol avec 10% eau (v/v):**

$$\text{Chl a}(\mu\text{g/ml}) = 16,82A_{665,2} - 9,28A_{652,4} \quad (\text{II.2})$$

$$\text{Chlb}(\mu\text{g/ml}) = 36,92A_{652,4} - 16,54A_{665,2} \quad (\text{II.3})$$

$$\text{Car}(\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 1,91\text{Cha} - 95,15\text{Chb})/225 \quad (\text{II.4})$$

- **80 %Acétone avec 20% eau (v/v):**

$$\text{Chl a}(\mu\text{g/ml}) = 12,25A_{663,2} - 2,79A_{646,8} \quad (\text{II.5})$$

$$\text{Chl b}(\mu\text{g/ml}) = 21,50A_{646,8} - 5,10A_{663,2} \quad (\text{II.6})$$

$$\text{Car}(\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 1,82\text{Cha} - 85,02\text{Chb})/198 \quad (\text{II.7})$$

Ces équations sont conçues pour des mélanges contenant 80% d'acétone et 90% de méthanol, tandis que nos extraits contiennent 80% de méthanol et 90% d'acétone. Pour cette raison, nous avons ajusté les proportions de nos extraits pour correspondre aux proportions indiquées dans les équations.

## II.7 Détermination de la teneur en polyphénol

Pour déterminer la concentration totale des polyphénol dans des échantillons d'extraits, la méthode de Folin-Ciocalteu a été utilisée [32]. Cette méthode repose sur la réaction des phénols avec le réactif de Folin-Ciocalteu en milieu alcalin, formant un produit de couleur bleue.

Le dosage des polyphénol a été réalisé comme suit :

Dans des tubes, 200  $\mu\text{L}$  de l'extrait ont été mélangés avec 1 mL du réactif de Folin-Ciocalteu (1 N) , ensuite, 800  $\mu\text{L}$  de la solution de carbonate de sodium à 7,5% sont ajoutés dans les tubes contenant le réactif et l'extrait. Les tubes sont mélangés à l'aide d'un vortex pour assurer une bonne homogénéité des réactifs.

Les tubes préparés sont incubés dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. Cette étape permet au réactif de réagir avec les polyphénol présents dans les

échantillons. Après l'incubation, l'absorbance de la solution de chaque tube a été mesurée à 765 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

Une gamme d'étalons est préparée simultanément, sous les mêmes conditions opératoires, en utilisant l'acide gallique comme référence.

La concentration des polyphénol est ensuite exprimée en milligrammes équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g ES). Cette valeur donne une estimation de la teneur totale en polyphénol des extraits analysés.

### **II.8 Détermination de la teneur en flavonoïdes**

Pour déterminer la teneur des flavonoïdes présente dans les extraits, la méthode colorimétrique utilisant le trichlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) et la soude ( $\text{NaOH}$ ) a été employée [32]. Le trichlorure d'aluminium forme un complexe jaune avec les flavonoïdes tandis que la soude forme un complexe de couleur rose qui absorbe dans le spectre visible à 510 nm.

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon le protocole suivant :

500  $\mu\text{L}$  de chaque extrait ont été mélangés avec 2 mL d'eau distillée dans des tubes d'analyse. Ensuite, 150  $\mu\text{L}$  d'une solution de nitrite de sodium ( $\text{NaNO}_2$ ) à 15 % ont été ajoutés au mélange, suivi d'une incubation à température ambiante pendant 6 minutes.

Après cette première incubation, 150  $\mu\text{L}$  de chlorure d'aluminium hexahydraté ( $\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ ) à 10 % ont été ajoutés à chaque tube, et les tubes ont ensuite été incubés de nouveau à température ambiante pendant 6 minutes supplémentaires.

Puis, un volume de 2 mL d'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ) à 4 % ont été ajoutés à chaque tube, et le volume total a été complété à 5 mL avec de l'eau distillée.

Les tubes ont ensuite été agités vigoureusement pour assurer l'homogénéité du mélange, puis incubés pendant 15 minutes à température ambiante. Après cette incubation finale, l'absorbance a été mesurée à 510 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible.

Pour établir la relation entre l'absorbance et la concentration, une gamme étalon a été préparée en utilisant de la catéchine à différentes concentrations, suivant les mêmes conditions expérimentales. Les résultats obtenus ont été exprimés en milligrammes équivalents de catéchine par gramme d'extrait sec (mg ECA/g ES), ce qui permet d'estimer la teneur en catéchine des échantillons analysés.

## II.9 Détermination de la teneur en glucides totaux

Le dosage des glucides totaux a été effectué par la méthode au phénol/acide sulfurique[33]. Cette technique repose sur la condensation des produits de déshydratation des oses avec le phénol, qui agit comme chromogène, formant des chromophores jaune-orange.

Le dosage est réalisé comme suit :

- 0,5 mL de l'extrait aqueux à analyser est introduit dans un tube à essai.
- 0,5 mL de solution de phénol à 5% est ajouté.
- Les tubes sont soigneusement agités à l'aide d'un vortex.
- 2,5 mL d'acide sulfurique concentré est ajouté.
- Les tubes sont laissés 30 minutes dans l'obscurité.
- L'absorbance des échantillons est mesurée à 490 nm.

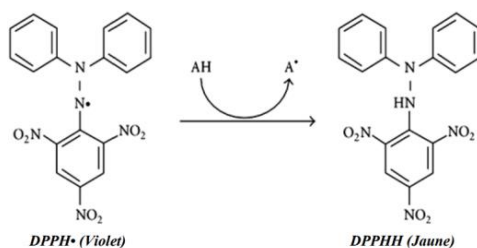
Le glucose est utilisé comme référence, et une courbe d'étalonnage a été établie en utilisant une gamme de concentrations de glucose.

## II.10 Evaluation de l'activité antioxydante

L'évaluation de l'activité antioxydante des extraits a été réalisée en mesurant leur capacité à piéger les radicaux libres et leur pouvoir antioxydant réducteur des ions ferriques (FRAP) [34, 35] .

### II.10.1 Piégeage du radical libre DPPH•

Le DPPH• est un radical libre stable de couleur violette, présentant une absorption maximale à 517 nm. En présence d'antioxydants, capables de piéger (neutraliser) le radical DPPH• (Fig.II.4), la couleur change du violet au jaune.



**Figure II.4 :** Mécanisme réactionnelle du test DPPH

Les mesures d'absorbance à 517 nm permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH•, calculé à l'aide de l'équation (II.8) suivante :

$$\text{DPPH}^{\bullet} \% = [(A1 - A2) / A1] \times 100 \quad (\text{II.8})$$

A1 : Absorbance du contrôle (solution de DPPH sans extrait)

A2 : Absorbance après ajout de l'extrait.

Pour évaluer l'activité antioxydante des extraits le protocole suivant a été réalisé [35] : 50 µL de chaque échantillon à diverses concentrations ont été ajoutés à 1,950 mL d'une solution de DPPH<sup>•</sup> fraîchement préparée dans le méthanol à une concentration de 0,0025 mg/mL.

Le mélange a ensuite été agité à l'aide d'un vortex et laissé reposer pendant 30 minutes à l'obscurité pour permettre la réaction.

Après cette période d'incubation, la diminution de l'absorbance du radical libre due à l'activité de l'extrait comme donneur de protons a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. L'activité antioxydante de l'extrait a été exprimée en IC50 (concentration d'inhibition à 50

L'acide ascorbique (vitamine C) a été utilisé comme référence, étant donné son fort pouvoir antioxydant. Ainsi, les valeurs IC50 des extraits ont été comparées à celle de l'acide ascorbique pour évaluer leur efficacité relative en tant qu'antioxydants[36].

### II.10.2 Réduction de fer FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power)

Le pouvoir réducteur des différents extraits d'*A.pinnata* a été évalué en utilisant la méthode du FRAP.

Son principe repose sur la réduction du fer ferrique (Fe<sup>+3</sup>) présent dans le complexe en fer ferreux (Fe<sup>+2</sup>). Cette réaction se traduit par un changement de couleur du fer ferreux (Fe<sup>+2</sup>) passant du bleu vert au jaune, et son absorbance est mesurée à 700 nm.

1 mL d'extrait à différentes concentrations a été mélangé avec 2,5 mL de la solution tamponne de phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 ml de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> à 1 % ( m/v). Ce mélange a ensuite été incubé à 50°C pendant 20 minutes [36].

Après incubation, 2,5 mL d'acide trichloroacétique (10 % m/v) ont été ajoutés pour stopper la réaction. Le mélange a été ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 tr/min et

2,5 mL du surnageant obtenu ont été transférés dans des tubes contenant 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de FeCl<sub>3</sub> (1 % m/v).

L'absorbance de la solution résultante a été mesurée à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. L'acide ascorbique (Vitamine C) a été utilisé comme standard car il possède de bonnes propriétés réductrices.

## II.11 Synthèse des nanoparticules d'argent

Pour la synthèse des nanoparticules, un mélange réactionnel contenant différentes concentrations d'extrait d'*A.pinnata* et diverses concentrations de nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>) a été préparé [10].

L'extrait utilisé dans cette étude est un extrait aqueux obtenu par la méthode d'ultrason à partir l'*A.pinnata* lyophilisée. Le mélange réactionnel a été préparé en mélangeant un volume de 1,5ml AgNO<sub>3</sub> (1mM) et 1,5 ml d'extrait préparé à différentes concentrations (0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ; 0,5 mg/ml).

L'effet de la concentration d'AgNO<sub>3</sub> sur la synthèse des nanoparticules d'argent a également été étudié en maintenant constante la concentration de l'extrait (1,5 mg/mL), et en variant la concentration de la solution d'AgNO<sub>3</sub> (1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 mM).

Ces mélanges sont soumis à une agitation pendant 24 heures à une température ambiante, puis centrifugé à 3000 tr/min pendant 10 minutes après chaque rinçage (5 fois) utilisant de l'eau distillée, pour être analysés par spectroscopie UV-Visible.

Pour une caractérisation approfondie, les nanoparticules d'argent ont été lyophilisées et examinées par spectroscopie infrarouge (IR), diffraction des rayons X (DRX) et microscopie électronique à balayage (MEB).

### II.11.1 Caractérisation des nanoparticules obtenus

La caractérisation des nanoparticules peut être réaliser par plusieurs méthodes [10], et pour notre travail la caractérisation est réaliser par spectroscopie UV-visible, spectroscopie Infrarouge (IR) , Diffraction des rayons X (DRX) et Microscope Électronique à Balayage (MEB).

#### a-spectroscopie UV-visible

Les nanoparticules ont une surface spécifique possèdent un grand nombre d'atomes et par conséquent un grand nombre d'électrons libres en surface.

L'excitation de cette surface métallique par la lumière entraîne la vibration collective des électrons [42]. Cette excitation provoque une résonance des électrons à une longueur d'onde de 450 nm, qui a été observé en utilisant la spectroscopie UV-visible.

**b-Principe de la spectroscopie Infrarouge (IR)**

Le spectre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) montre les pics d'absorption et de transmission moléculaires correspondant aux fréquences des vibrations entre les atomes d'*A.pinnata*. Cette technique est utilisée pour confirmer l'interaction entre l'argent et les bio-réducteurs présent dans notre biomasse. La réaction entre les nanoparticules d'argent et les biomolécules peut être détectée par le déplacement des bandes caractéristiques attribuées aux différents groupes fonctionnels présents dans les biomolécules (polyphénol, flavonoïdes, pigments), tels que les groupements carbonyles, hydroxyles et amines [41].

**c-Principe de la diffractométrie des rayons X (DRX)**

La diffraction des rayons X (DRX) est une technique analytique employée pour analyser les structures cristallographiques dans le but d'identifier les nanoparticules d'argent synthétisés. Cette méthode permet de caractériser leur structure cristalline, qu'ils soient sous forme massive ou en poudre. Elle permet d'identifier les composés cristallins en comparant les spectres obtenus avec ceux de composés répertoriés dans une base de données [40].

**d-Principe du microscope électronique à balayage (MEB)**

Le microscope électronique à balayage (MEB) utilise un faisceau d'électrons pour produire des images détaillées de la surface des échantillons. En balayant la surface point par point, les interactions entre les électrons incidents et les atomes de l'échantillon génèrent divers signaux, tels que les électrons secondaires, les électrons rétrodiffusés et les rayons X caractéristiques. Ces signaux sont collectés et transformés en une image topographique de la surface, permettant une résolution élevée et offrant des détails sur la morphologie et la composition de notre biomasse.

**CHAPITRE III**  
**RESULTATS & DISCUSSION**

### III.1 Rendement

Le tableau III.1 montre les résultats des rendements obtenus pour différents extraits exprimés en (% g/g) de matière sèche.

**Tableau III.1** : Résultats des rendements des extraits.

Séchage par : Méthode d'extraction	Etuve			Lyophilisateur		
	Ultrason	Reflux	Ultrason+reflux	ultrason	Reflux	Ultrason+reflux
Eau	12,08%	9,1%	18,59%	19,78%	19,59%	13,85%
Méthanol 80%	8,47%	8,97%	9,8%	24,58%	15,59%	14,29%
Acétone 90%	7,18%	7,29%	4,59%	14,48%	14,09%	7,99%

Selon ces résultats, le rendement le plus élevé (24,58 %) a été obtenu pour l' d'*A.pinnata* lyophilisée, en utilisant l'ultrason comme méthode d'extraction et du méthanol à 80 %. En revanche, le rendement le plus faible (4,59%) a été obtenu pour l'*A.pinnata* séchée à l'étuve avec de l'acétone 90% en utilisant la combinaison des deux méthodes d'extraction « ultrason et le reflux ». Pour la majorité des extraits les rendements les plus élevés ont été obtenu en utilisant le solvant aqueux suivi du méthanol 80% et les plus faibles pour acétone 90%. Ces différences de rendement peuvent s'expliquer par la polarité du solvant utilisé et la nature des composés à extraire. En effet, plus un solvant est polaire, plus il est efficace pour extraire des composés polaires comme les protéines et les sucres..etc. Tandis qu'un solvant moins polaire est mieux adapté à l'extraction de composés apolaires comme les caroténoïdes.

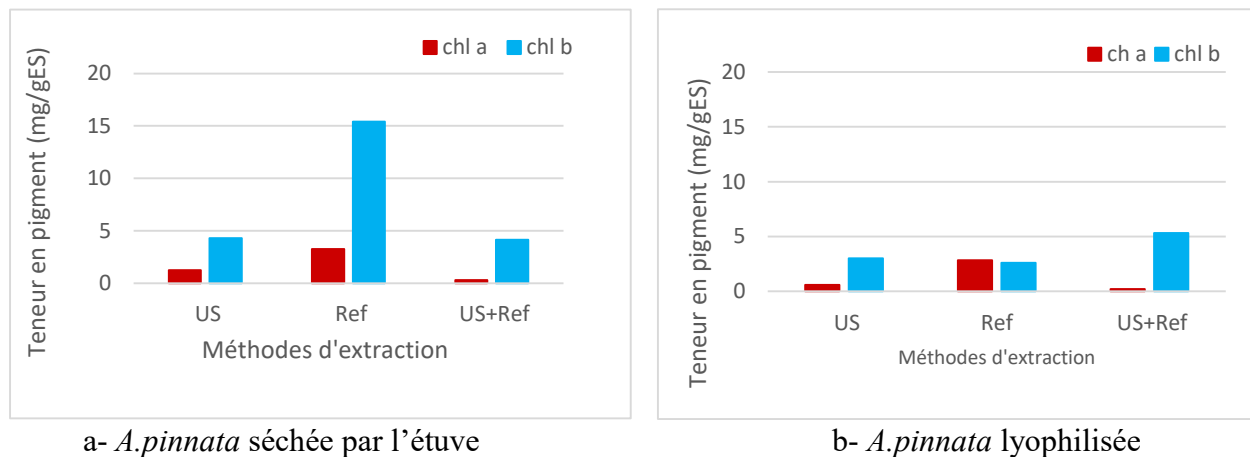
Le mélange de deux solvants permet de moduler la polarité, ce qui donne une solution de polarité intermédiaire, idéale pour extraire des composés de polarité moyenne[38]. Pour notre étude le solvant aqueux, le plus polaire, a donné les meilleurs rendements, cela s'explique par la composition biochimique de l'*A.pinnata*, dont plusieurs composés sont de nature polaire [17 ,18] .

En ce qui concerne la méthode de séchage et d'extraction, la lyophilisation associée à l'utilisation des ultrasons a permis d'obtenir les rendements les plus élevés, en remarquant ainsi que l'extraction par reflux a influencé négativement sur le rendement dans le cas de la combinaison des US et le reflux.

L'*A.pinnata* séchée à l'étuve a donnée de faibles rendements par rapport à l' d'*A.pinnata* lyophilisée quelle que soit la méthode d'extraction .Ces résultats peuvent être expliqués par l'influence de la chaleur sur les composés thermosensibles (utilisation de l'étuve et du reflux). Dans ce cas, la lyophilisation, ainsi que l'extraction par ultrason, se sont révélées plus efficaces.

### III.2 Teneur en pigment

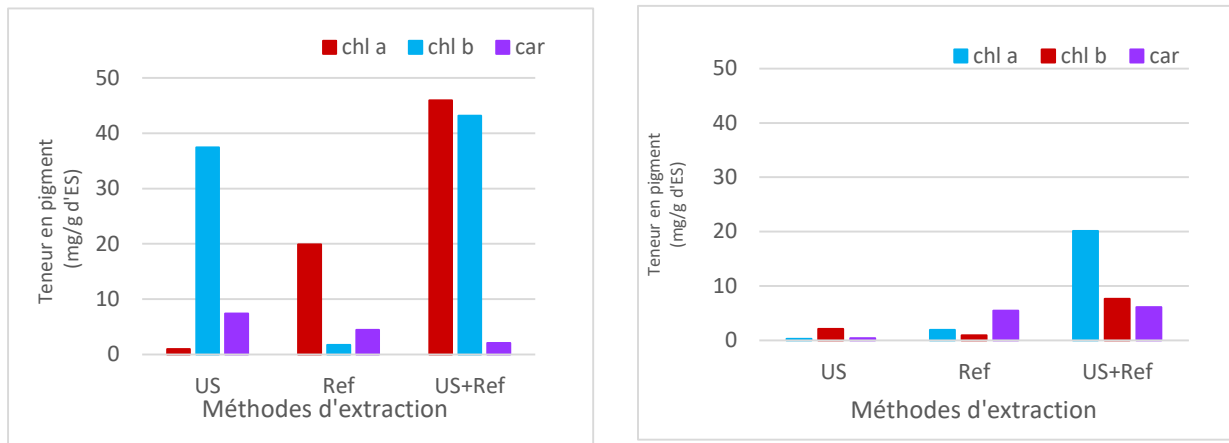
Les pigments que nous avons déterminés dans cette étude sont la chlorophylle a, la chlorophylle b et les caroténoïdes. Les résultats obtenus sont représentés dans des graphiques indiqués dans la figure III.1 ,III.2 et III.3:



**Figure III.1** : Teneur en pigment d'extrait aqueux

Les résultats obtenus avec l'extrait aqueux étaient homogènes, avec de légères variations. La teneur de la chlorophylle a et b dans l'*A. pinnata* séchée à l'étuve, ainsi que la chlorophylle a dans l'*A. pinnata* lyophilisée, étaient plus élevées lorsqu'on utilisait l'extraction par reflux.

En ce qui concerne la chlorophylle b, l'*A. pinnata* lyophilisée a montré la plus grande teneur lorsqu'on combinait les deux méthodes d'extraction. Enfin, il a été observé que la méthode de séchage n'avait pas une influence significative sur l'extraction des chlorophylles a et b.



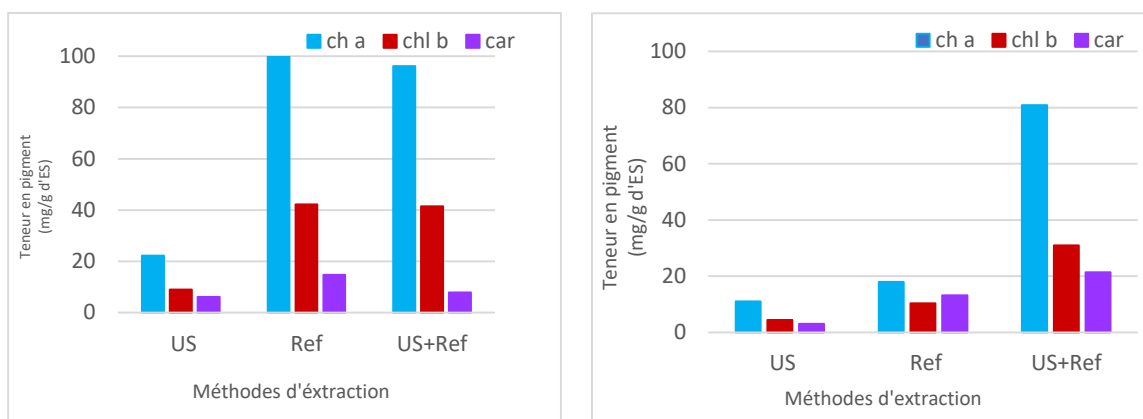
a- *A. pinnata* séchée par l'étuve

b- *A. pinnata* lyophilisée

**Figure III.2 :** Teneur en pigment dans l'extrait Méthanol 80%.

L'extrait du méthanol 80% a révélé la présence de la chlorophylle a, b et des caroténoïdes, ces derniers étant présents en quantités inférieures à celles des chlorophylles a et b. Toutefois, la quantité de caroténoïdes restait similaire, quelle que soit la méthode de séchage ou d'extraction utilisée.

Les valeurs les plus élevées pour les chlorophylles a, b et les caroténoïdes ont été obtenues en combinant les deux méthodes d'extraction (US+Ref). En ce qui concerne la méthode de séchage, le séchage à l'étuve s'est avéré être la plus efficace.



a- *A. pinnata* séchée par l'étuve

b- *A. pinnata* lyophilisée

**Figure III.3** : Teneur en pigment dans l'extrait Acétone 90%

L'extrait d'acétone 90% a révélé la présence de chlorophylle a, de chlorophylle b et des caroténoïdes, avec une quantité de chlorophylle a supérieure à celle de la chlorophylle b et des caroténoïdes. Ces résultats sont significatifs car ils indiquent que l' *A. pinnata* séchée à l'étuve, en utilisant uniquement l'extraction par reflux, est plus efficace pour extraire ces pigments que l' *A. pinnata* lyophilisée. Cette dernière nécessitait la combinaison des deux méthodes d'extraction (US+Ref) pour obtenir des résultats comparables.

En résumé, les résultats ont montré que la plus haute valeur de chlorophylle a (125,665 mg/gES) a été enregistrée en utilisant l'étuve pour le séchage et le reflux comme méthode d'extraction en utilisant de l'acétone à 90 %.

Pour la chlorophylle b, la valeur la plus élevée (43,173 mg/gES) a été obtenue en utilisant du méthanol à 80 % et l'extraction par ultrason suivie par reflux pour l' *A. pinnata* séchée à l'étuve.

Concernant les caroténoïdes, l'acétone à 90 % a donné les meilleurs résultats, avec la valeur la plus élevée (21,389 mg/gES) obtenue pour l' *A. pinnata* lyophilisée et utilisant les deux méthodes d'extraction (ultrason et reflux), contrairement aux extraits aqueux qui n'ont présenté aucune extraction de ce type de pigments, ce phénomène s'explique par la nature lipophile de ces molécules, dont la solubilité dépend principalement de la polarité du solvant utilisé [38].

La méthode de séchage à l'étuve avec reflux s'est avérée optimale, probablement en raison de l'effet favorable de la chaleur sur l'extraction des pigments. En ce qui concerne le solvant, l'acétone à 90 % a été le plus efficace, suivie du méthanol à 80 % et de l'eau. Cette efficacité s'explique par la polarité modérée de l'acétone par rapport à l'eau, ce qui la rend plus adaptée à l'extraction des pigments de nature apolaire [38].

### III.3 Teneur en flavonoïdes et en polyphénol totaux

Les teneurs de flavonoïdes et des polyphénol totaux présentes dans différents extraits de l'*A. pinnata* sont obtenues à partir des équations de régression linéaire de chaque courbe d'étalonnage (Figure III.4 et III.5).

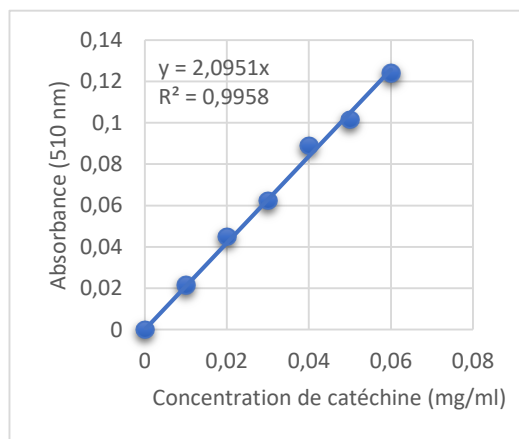


Figure III.4 : Courbe d'étalonnage de la catéchine

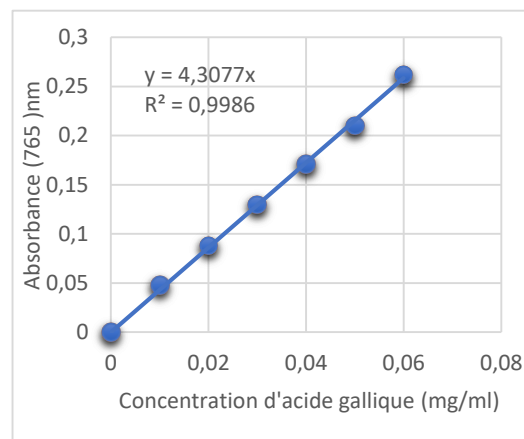


Figure III.5: Courbe d'étalonnage l'acide gallique

Les résultats des dosages des flavonoïdes et des polyphénol de notre étude sont indiqués dans les figures III.6, III.7 et III.8.

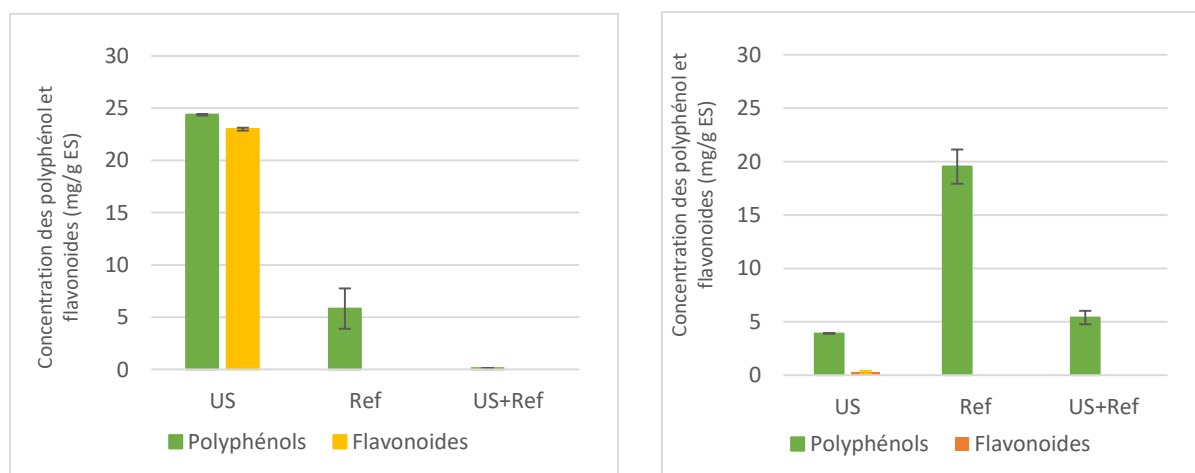
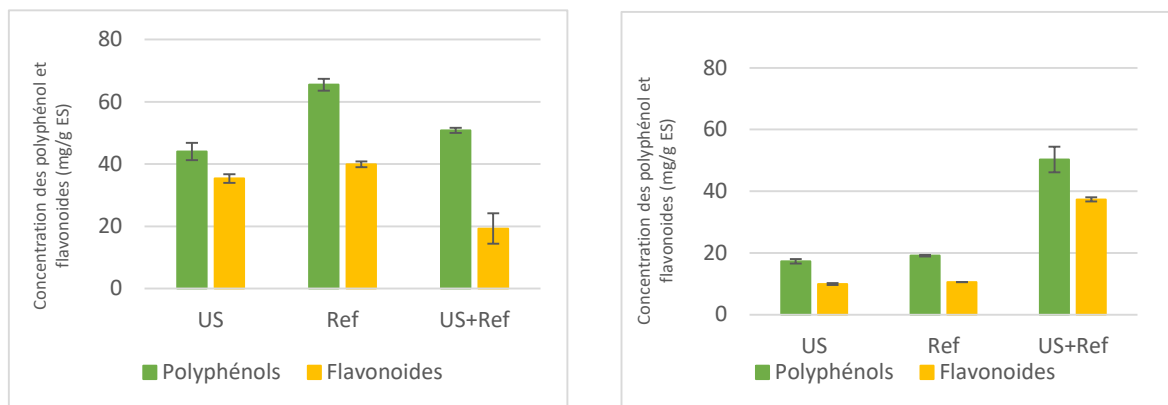


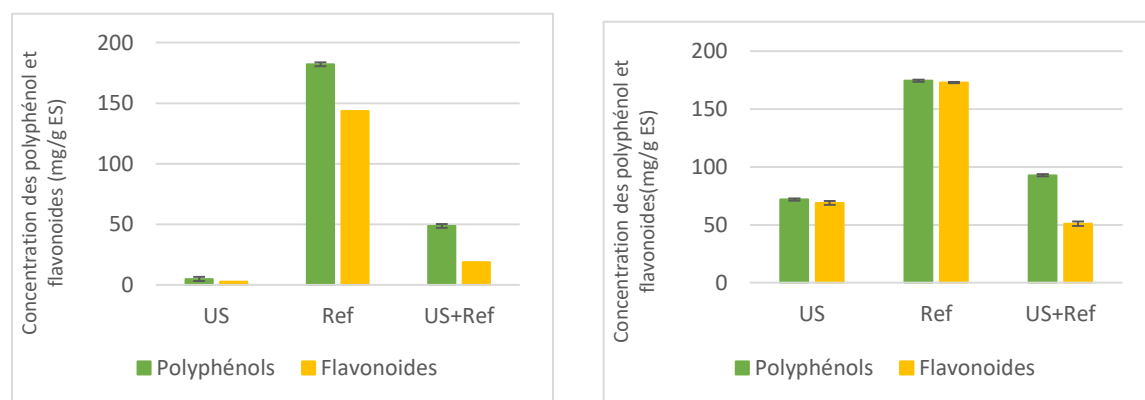
Figure III.6 : Teneur en polyphénol et flavonoïdes dans l'extrait aqueux.

L'extrait aqueux possède des polyphénol pour les deux méthodes de séchage, tandis les flavonoïdes n'ont été extraits qu'en utilisant la méthode par ultrasons.



**Figure III.7 :** Teneur en polyphénol et flavonoïdes dans l'extrait méthanol 80%.

L'extrait de méthanol à 80 % a permis d'obtenir à la fois des polyphénol et des flavonoïdes pour les deux méthodes de séchage. Toutefois, l' *A.pinnata* séchée à l'étuve avec seulement l'extraction par reflux a donné des résultats plus élevés que l' *A.pinnata* lyophilisée, qui a nécessité la combinaison des deux méthodes d'extraction (US+Reflux).



**Figure III.8 :** Teneur en polyphénol et flavonoïdes dans l'extrait acétone 90%.

Les résultats obtenu pour l'extrait d'acétone 90% (Figure III.8 ) montre qu'il possède à la fois les polyphénol et les flavonoïdes avec seulement extraction par le reflux, mais l' *A.pinnata* lyophilisée a donné de meilleurs résultats.

Les résultats de cette étude montre que l' *A.pinnata* séchée à l'étuve, possède la teneur la plus élevée en polyphénol ( $182,09 \pm 9,04$  mg GAE / g ES) et en flavonoïdes ( $143,55 \pm 0,17$  mg ECA / g ES) pour le solvant d'acétone à 90 % utilisant la méthode de reflux. En revanche, la teneur la plus faible ( $0,12 \pm 0,01$  mg GAE / g ES) pour les polyphénol et aucune présence de flavonoïdes a été constatée dans l'extrait aqueux.

Concernant les méthodes d'extraction, le reflux a donné les meilleurs résultats utilisant le méthanol à 80 % et l'acétone à 90 %, tandis que l'ultrason a été la plus efficace méthode pour l'extrait aqueux. De manière générale, pour l' *A.pinnata* séchée à l'étuve, le méthanol a donné de bons résultats lorsque la méthode de reflux a été utilisée.

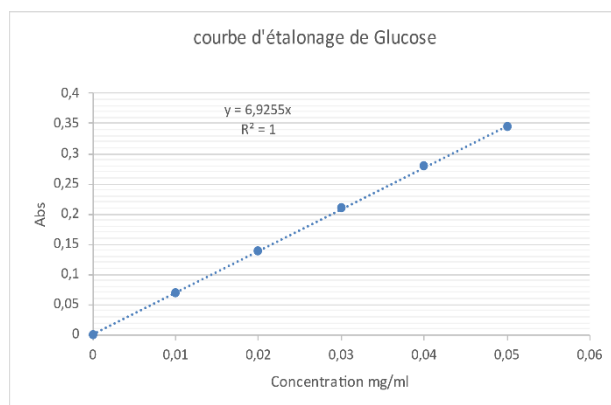
Les résultats des teneurs en flavonoïdes et polyphénol de l' *A.pinnata* séchée par lyophilisation montrent que les plus importantes concentrations en polyphénol (174,45 mg GAE / g ES) et en flavonoïdes (173,02 mg ECA / g ES) ont été obtenues avec de l'acétone à 90 % en utilisant la méthode d'extraction par reflux. Par contre, l'extrait aqueux a montré les plus faibles teneurs en polyphénol (3,92 mg GAE / g ES) et une absence totale des flavonoïdes.

En ce qui concerne les techniques d'extraction, la méthode de reflux a produit les meilleurs résultats pour les trois solvants. Dans l'ensemble, pour l' *A.pinnata* séchée par lyophilisation, l'acétone 90% a montré une efficacité à extraire les polyphénol et flavonoïdes élevées par rapport au méthanol 80% et l'eau 100%.

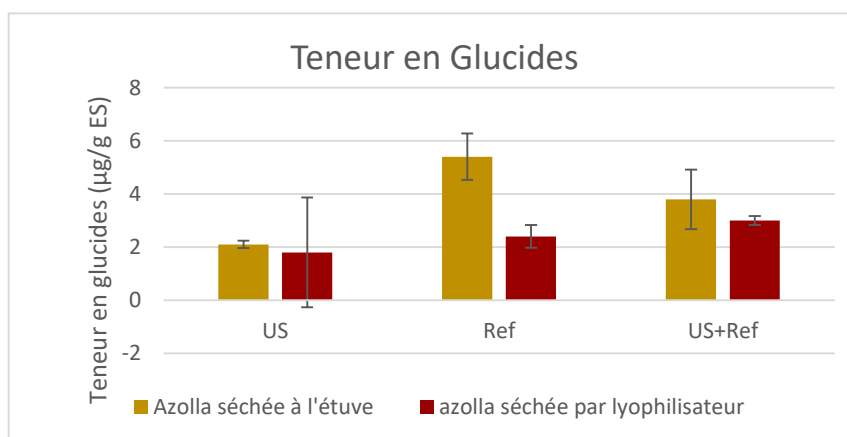
Globalement, la méthode de séchage à l'étuve, combinée à l'extraction par reflux, a montré la meilleure efficacité pour extraire les polyphénol et les flavonoïdes. Parmi les solvants testés, l'acétone à 90% s'est révélé le plus performant, donnant les valeurs les plus élevées de flavonoïdes et de polyphénol, suivi par le méthanol 80%. L'eau, en revanche, a donné des résultats peu convaincants. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans des travaux précédents [39]. Cette observation peut s'expliquer par le fait que l'ajout d'eau aux solvants organiques augmente la solubilité des polyphénol, grâce à la modulation de la polarité du solvant organique. Cette augmentation pourrait être liée à l'affaiblissement des liaisons d'hydrogène dans les solutions contenant de l'eau. Elle pourrait également résulter de l'augmentation de la basicité et du degré d'ionisation des polyphénol dans ce type de solution [39].

### III.4 Teneur en glucide

La quantité des glucides de chaque extrait sont obtenues à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage présenté en figure III.9. Les résultats sont ensuite exprimées ( $\mu\text{g/g}$  d'extrait) et indiqués dans la figure III.10 :



**Figure III.9 :** courbe d'étalonnage des glucides



**Figure III.10:** Résultats de la teneur en glucides en différents extraits aqueux pour les différentes méthodes d'extraction

Les sucres sont solubles dans l'eau ce qui explique le choix du solvant aqueux pour la détermination de la teneur en glucides.

L' *A.pinnata* séchée à l'étuve et en utilisant la méthode de reflux a donné la plus grande valeur de teneur en glucides ( $5,4 \pm 0,87 \mu\text{g/g}$  d'extrait) quant à la plus faible valeur ( $1,8 \pm 2,07 \mu\text{g/g}$  d'extrait) a été marqué en utilisant la méthode d'ultrason pour l' *A.pinnata* lyophilisée.

Les résultats montre que la meilleure méthode de séchage afin d'extraire les glucides est le séchage à l'étuve, et la meilleure méthode d'extraction est le reflux. Il est remarquable que l'ultrason défavorise l'extraction des glucides.

Selon la bibliographie [17], et confirmé par la présente étude, bien que *A. pinnata* contienne des glucides, leur quantité peut être considérée comme faible par rapport à d'autres composants tels que les polyphénol, les flavonoïdes et les pigments.

### III.5 Evaluation de l'activité antioxydante

Les résultats obtenus ont révélés la présence des biomolécules dans *A.pinnata* (polyphénol, flavonoïdes et pigments), tous connus pour leurs propriétés antioxydantes [39] qui suggère que *A.pinnata* pourrait avoir des propriétés antioxydantes significatives.

Une évaluation du pouvoir antiradicalaire et réducteur des différents extraits obtenu a été réalisée en utilisant le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) et le test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) respectivement.

#### III.5.1 Evaluation du pouvoir antiradicalaire par le test de DPPH• :

L'activité antioxydante des différent extraits a été évaluée par la détermination du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH•. Une droite d'étalonnage (figure III.11) établie à partir de solutions d'acide ascorbique à différentes concentrations (utilisé comme référence en raison de sa réactivité avec les radicaux libres et son pouvoir antioxydant très fort).

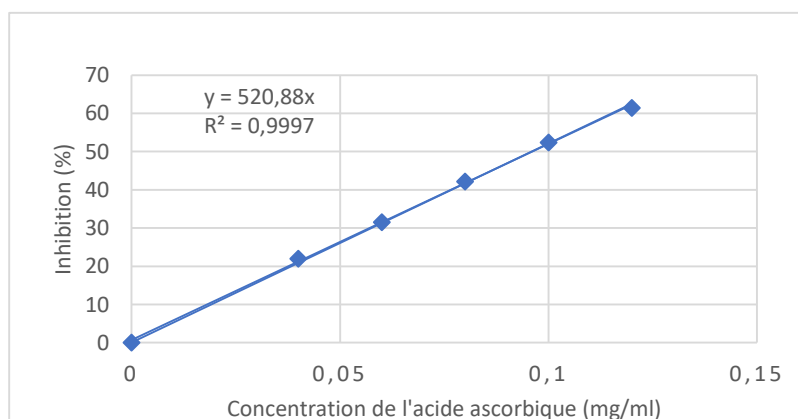
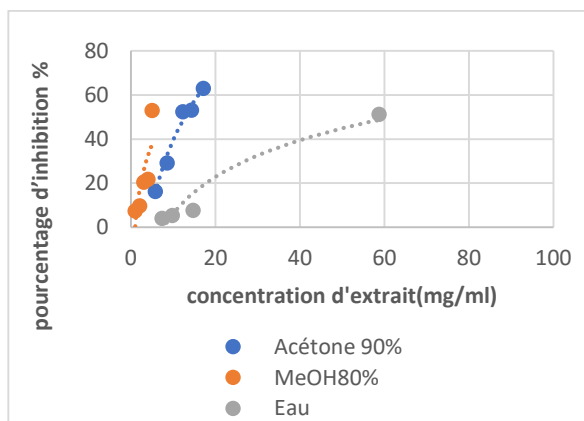
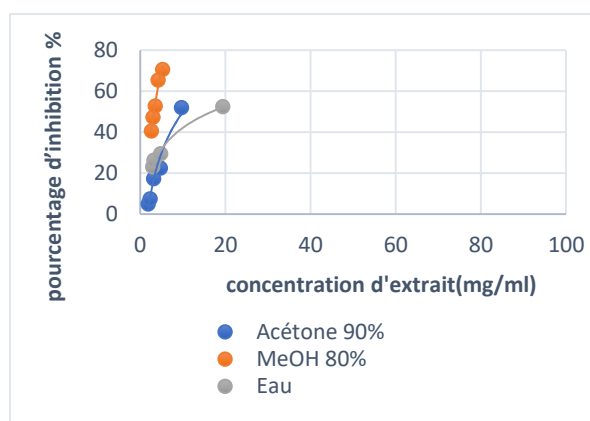


Figure III.11 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

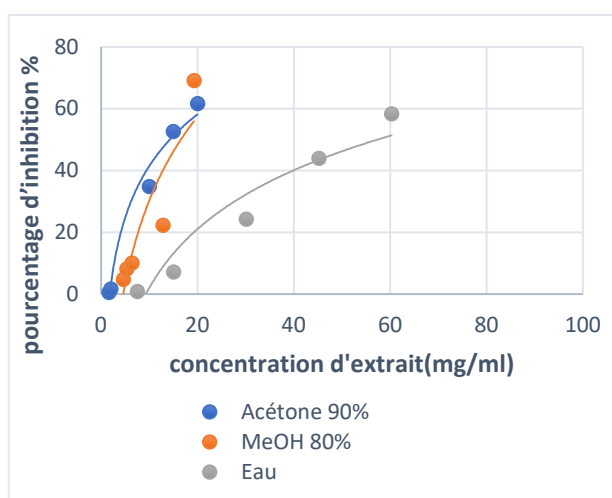
Les courbes dans la figures III.12 illustrent le taux d'inhibition du radical DPPH• exprimés en pourcentage, en fonction des concentrations croissantes de chaque extrait. Ces données ont été obtenues en utilisant les deux méthodes de séchage les trois méthodes d'extraction en utilisant les différents solvants.



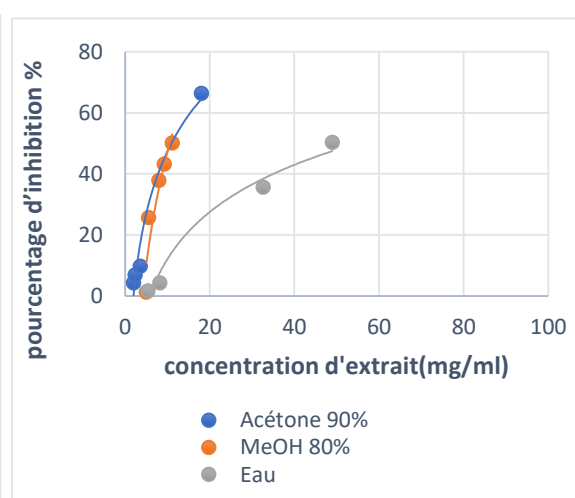
a- Extraction par ultrason de l' *A.pinnata* séchée par l'étuve



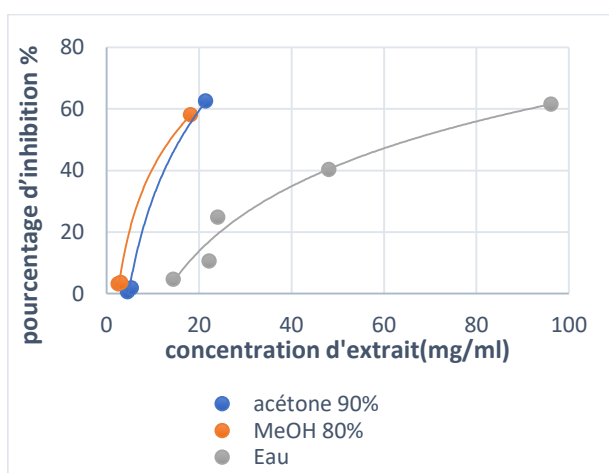
b- Extraction par ultrason de l' *A.pinnata* lyophilisée.



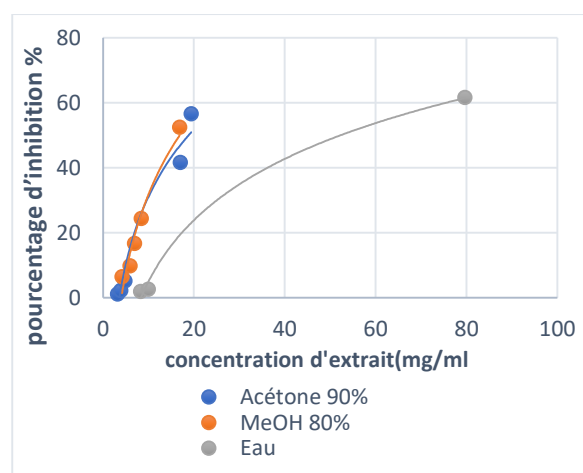
c- Extraction par reflux de l' *A.pinnata* séchée par l'étuve



d- Extraction par reflux de l' *A.pinnata* lyophilisée



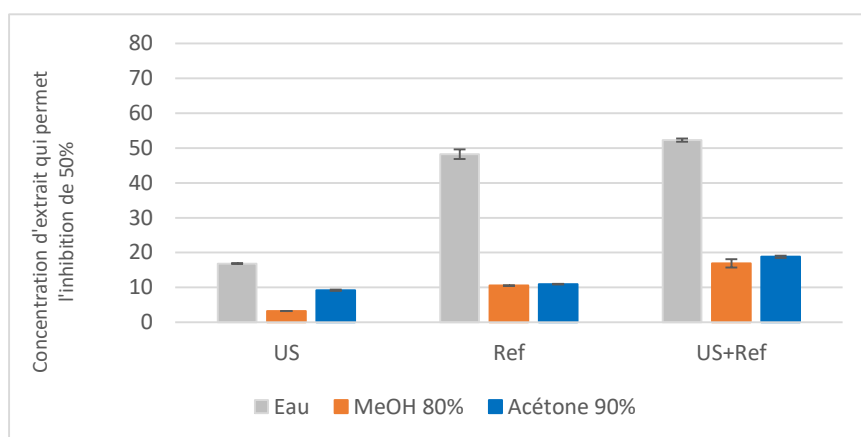
e- Extraction par US+Ref de l' *A.pinnata* séchée par l'étuve



f- Extraction par US+Ref de l' *A.pinnata* lyophilisée

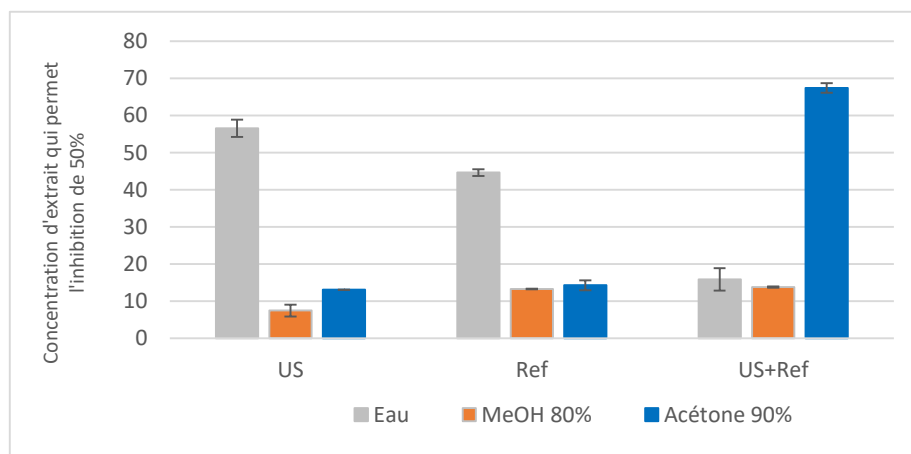
Figures III.12 : les taux d'inhibition du radical DPPH• exprimés en pourcentage, en fonction des concentrations croissantes de chaque extrait

Le IC50 « concentration nécessaire pour inhiber 50% des radicaux libres de chaque extrait » est déterminé graphiquement et illustrer dans les figures III.13 et III.14 pour l' *A.pinnata* séchée à l'étuve et lyophilisés respectivement.



**Figures III.13 :** Concentration de chaque extrait qui permet l'inhibition de 50% des radicaux libres pour l' *A.pinnata* séchée à l'étuve

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits, quelle que soit la méthode de séchage et d'extraction et le solvant utilisés, ont la capacité de piéger le radical libre DPPH•, et que plus la concentration de l'extrait augmente, plus le pourcentage de piégeage augmente.



**Figures III.14:** Concentration de chaque extrait qui permet l'inhibition de 50% des Radicaux libres pour l' *A.pinnata* séchée par lyophilisateur.

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits, quelle que soit la méthode de séchage et d'extraction et le solvant utilisés, ont la capacité de piéger le radical libre DPPH•, et que plus la concentration de l'extrait augmente, plus le pourcentage de piégeage augmente.

En ce qui concerne l' *A.pinnata* séchée par l'étuve, la figure (III.12) montre que le pouvoir antiradicalaire le plus élevé est pour une concentration de ( 3,23±0,02 mg/mL) a été obtenu pour l'extrait de méthanol 80% en utilisant les ultrasons pour l'extraction, et le pouvoir le plus faible a été obtenu pour l'extrait aqueux par une concentration de ( 52,3±0,48 mg/mL) en combinant les deux méthodes d'extraction (US+ Ref).

Quant à l' *A.pinnata* lyophilisée, les résultats obtenus la figure (III.13) indique que le pouvoir antiradicalaire le plus élevé pour la concentration de (7,48±1,62 mg/mL) a été obtenu en utilisant la méthode d'extraction par ultrasons dans l'extrait méthanol 80%, tandis que le pouvoir le plus faible pour une concentration de (67,41±1,32 mg/mL) a été obtenu en utilisant les deux méthodes d'extraction ultrasons combinés avec le reflux dans l'extrait acétone 90%.

En résumé, tous les extraits montrent une capacité à piéger les radicaux libres, mais avec des résultats variés. Le méthanol 80% s'est avéré le plus efficace, suivi de l'acétone 90%, tandis que la solution aqueuse a donné des résultats les plus faibles. Cela est dû à la nature chimique des biomolécules présent dans l' *A.pinnata*, ayant une activité antiradicalaire, qui sont mieux extraites dans des solvants modérément polaire (méthanol 80%). Aussi l'extraction par ultrasons s'est révélée la méthode la plus efficace. Les résultats étaient cohérents, quelle que soit la méthode de séchage utilisée, ce qui suggère qu'elle n'a pas eu d'impact significatif.

### III.5.2 Evaluation du pouvoir réducteur par le test FRAP

Le pouvoir réducteur des différents extraits a été évalué par la détermination de la concentration d'extrait à une absorbance de 0,5 (EC50). Une courbe d'étalonnage montrée dans la figure III.15 utilisée comme référence est établie à partir de solutions d'acide ascorbique à différentes concentrations.

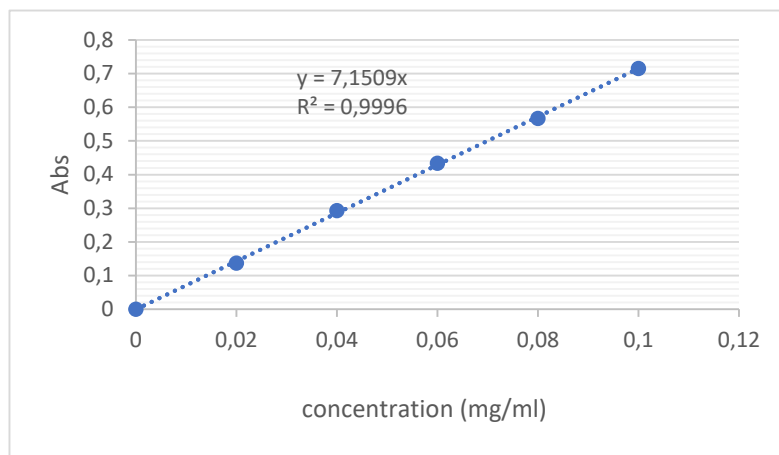
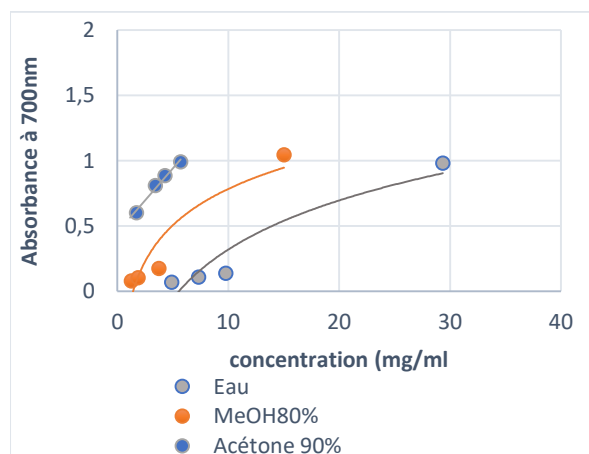
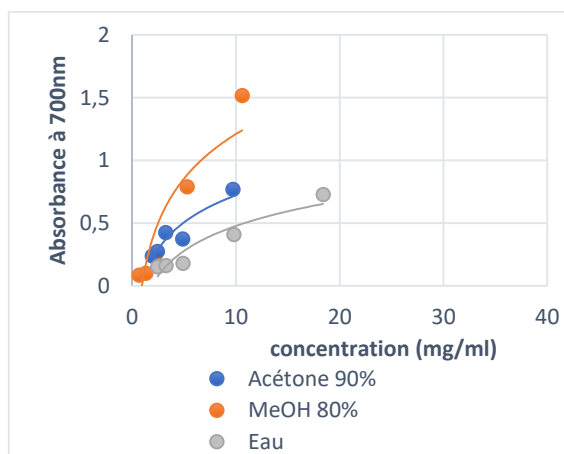


Figure III.15: Courbe d'étalonnage du test FRAP établie à partir d'acide ascorbique

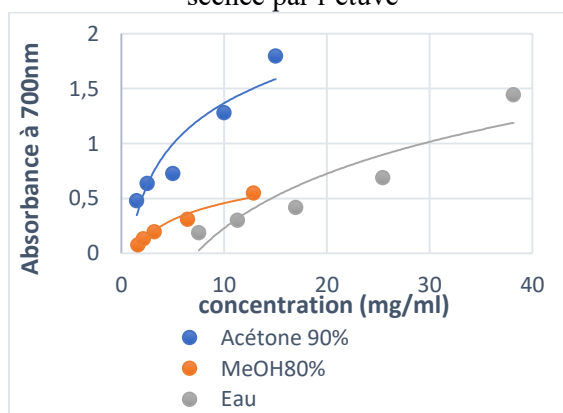
Les courbes dans la figure III.16 montre le pouvoir réducteur chaque extrait en fonction des différentes concentrations.



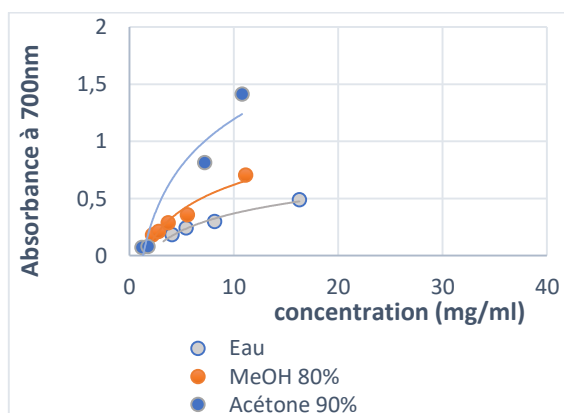
a- Extraction par US+Ref de l' *A.pinnata* séchée par l'étuve



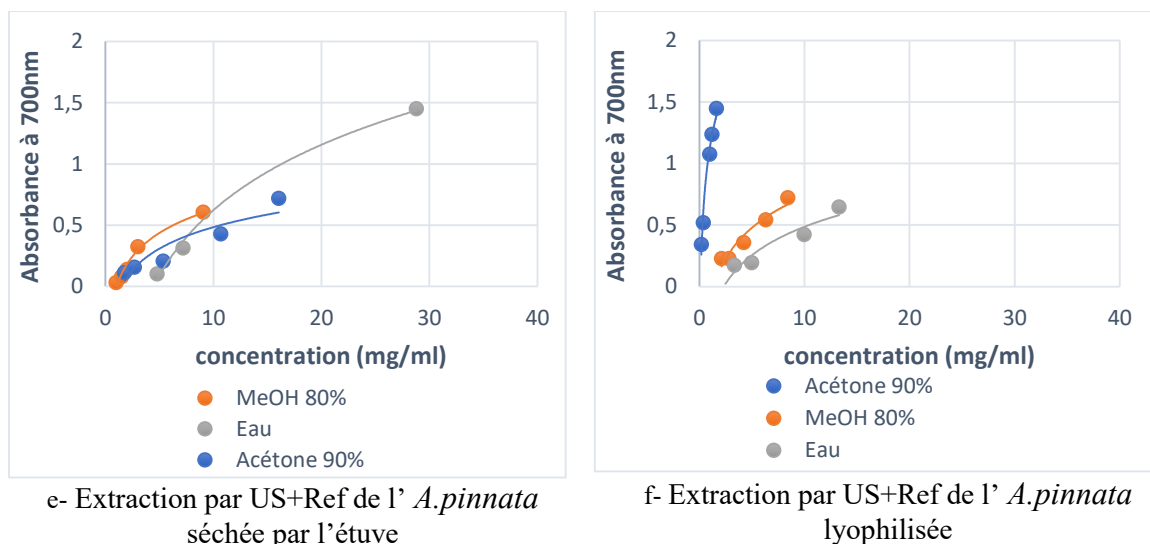
b- Extraction par US de l' *A.pinnata* lyophilisée



c- Extraction par Ref de l' *A.pinnata* séchée par l'étuve.



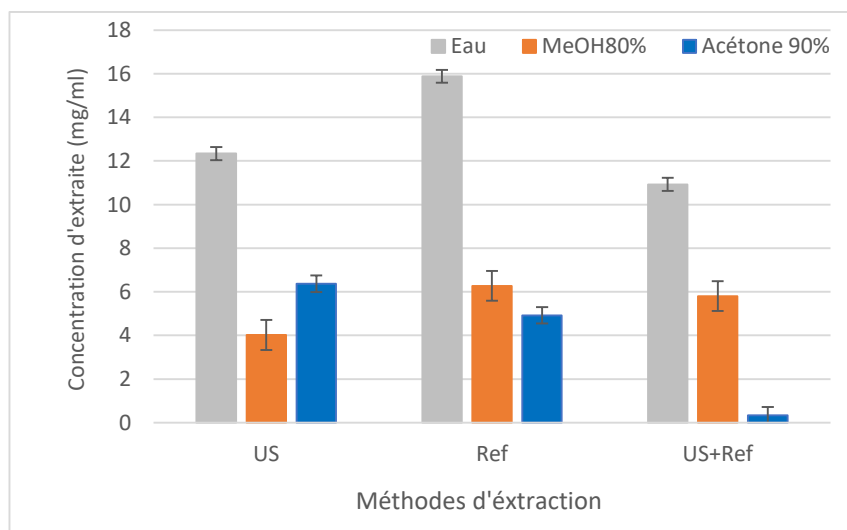
d- Extraction par Ref de l' *A.pinnata* lyophilisée



**Figure III.16 :** Pouvoir réducteur des différentes concentrations des extraits pour chaque méthode de séchage et pour les trois méthodes d'extraction.

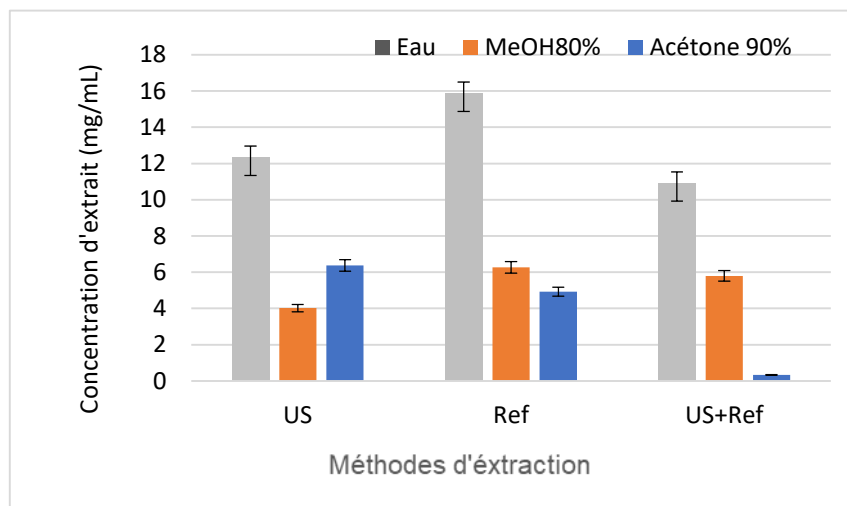
Les résultats montrent que plus la concentration augmente, plus la réduction du fer est importante. Cela signifie que les extraits contiennent des antioxydants qui ont un pouvoir réducteur.

Les résultats de EC50 des extraits pour différentes méthodes de séchage, d'extraction utilisant les trois solvants sont illustré dans les figures III.17 et III.18 (pour l' *A.pinnata* séchée à l'étuve et lyophilisée respectivement).



**Figure III.17 :** Concentration des extraits d' *A.pinnata* séchée à l'étuve à une absorbance de 0,5 (EC50).

Les résultats montrent que l'extrait ayant la plus grande capacité réductrice est l'extrait acétone 90% obtenu par ultrasons, avec une concentration de seulement ( $1,27 \pm 0,16$  mg/ml). En revanche, l'extrait ayant la plus faible capacité réductrice est l'extrait aqueux, nécessitant une concentration de  $17,82 \pm 0,04$  mg/ml pour la même méthode d'extraction.



**Figure III.18 :** Concentration des extraits d' *A.pinnata* séchée par lyophilisateur à une absorbance de 0,5 (EC50).

Les résultats indiquent que l'extrait d'acétone 90 % obtenu par combinaison des ultrasons et reflux possède la plus grande capacité réductrice, avec une concentration de seulement ( $0,33 \pm 1,32$ mg/ ml). À l'inverse, l'extrait aqueux obtenu par reflux présente la capacité réductrice la plus faible, nécessitant une concentration de ( $15,88 \pm 0,92$ mg/ml) pour avoir une absorbance de 0,5.

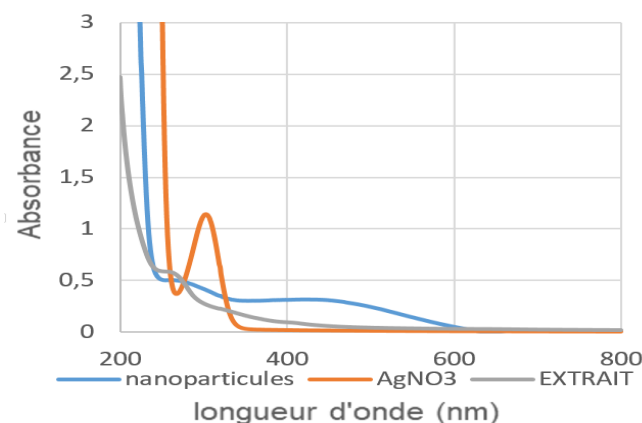
Pour le même solvant, et pour les deux méthodes de séchage, la méthode d'extraction n'a pas eu un rôle significatif, les résultats étant similaires. De même, la différence dans la méthode de séchage n'a pas entraîné de variations importantes.

## III.6 Synthèse des nanoparticules d'argent

### III.6.1 Caractérisation des NpsAg

#### A- analyse UV

Après 24 heures d'agitation des mélanges réactionnels de l'extrait et de la solution d'AgNO<sub>3</sub>, nous avons analysé les solutions avec un spectrophotomètre UV-Visible.



**Figure III.19** : Spectre UV-Visible de l'extrait, la solution d'AgNO<sub>3</sub> et le mélange réactionnel.

Les résultats obtenus (**Fig. III.19**) ont indiqué que la solution de nitrate d'argent (AgNO<sub>3</sub>) montre une absorbance maximale à 302 nm, tandis que l'extrait à 250 nm.

Le changement de couleur du mélange réactionnel vers le brun indique la formation des nanoparticules d'argent, en raison de la résonance plasmonique de surface des nanoparticules d'argent, qui est responsable de cette couleur [10]. Ce qui a été confirmé par la bande spectrale d'absorption caractéristique à 450 nm, ce qui est conformes aux résultats rapportés en littérature [10].

L'effet de la variation de la concentration d'extrait, ainsi que pour l'effet de la variation des concentrations de nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) sont illustrés dans les figures III.19 et III.20

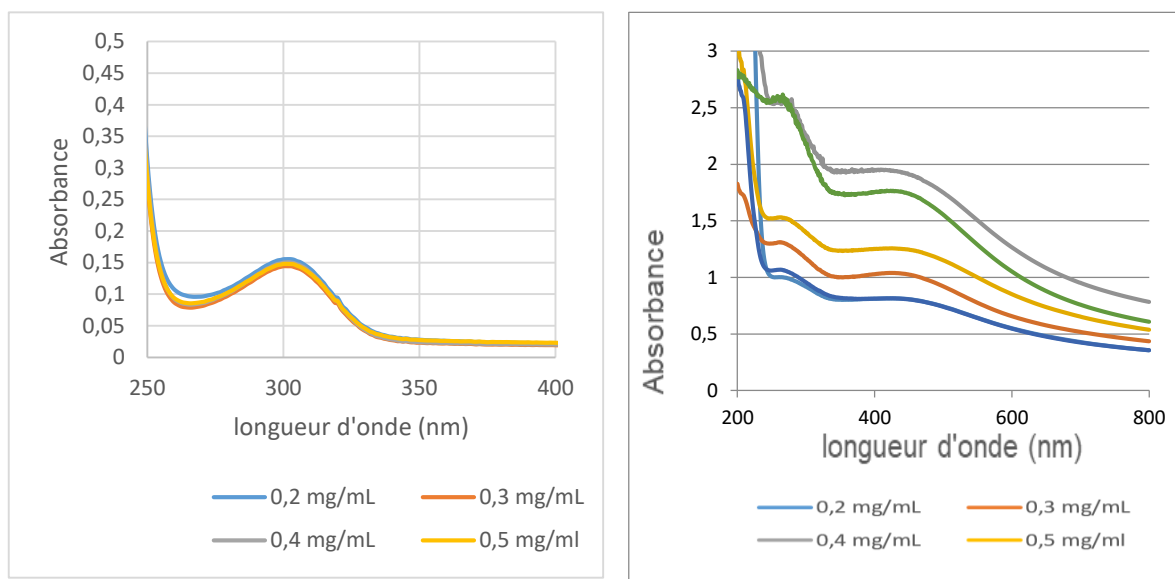


Figure III.20 : L'effet de la variation de la concentration d'extrait.

Les résultats obtenus de l'étude sur l'effet de la variation des concentrations d'extrait dans le mélange réactionnel ont montré une diminution de l'absorbance de la bande d' $\text{AgNO}_3$  à 302 nm. Cela indique que les ions  $\text{Ag}^+$  sont réduits par les molécules présentes dans l'extrait d'*A. pinnata*, ce qui confirme la formation de nanoparticules.

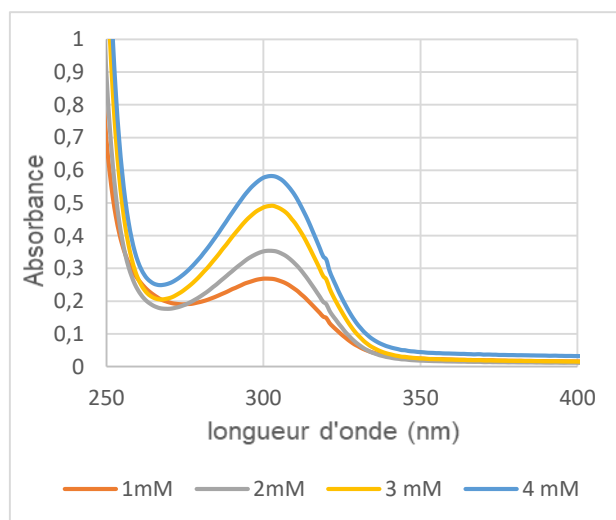


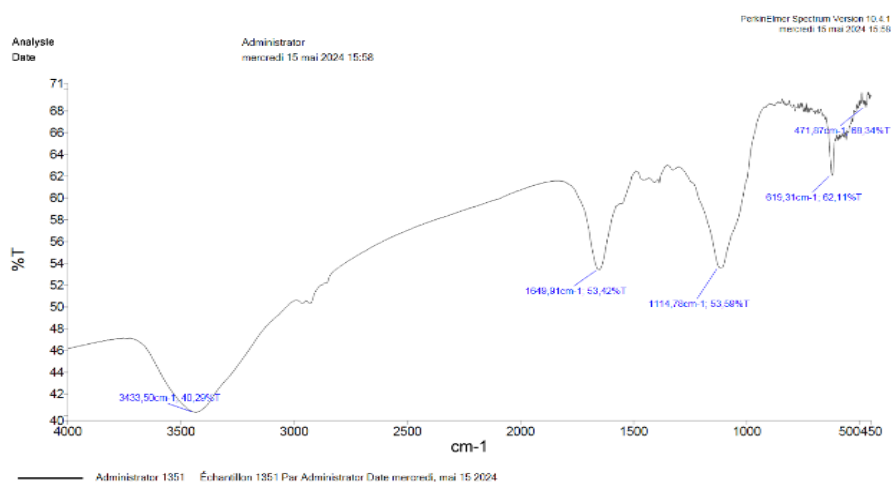
Figure III.21 : L'effet de la variation des concentrations de nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ )

L'effet de la variation des concentrations de nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) a révélé une augmentation de l'absorbance en fonction de l'augmentation de la concentration d' $\text{AgNO}_3$ . Cette étude a été réalisée avec une concentration constante de 1 mg/ml de l'extrait d'*A. pinnata*, indiquant ainsi que la concentration optimale de l'extrait doit être augmentée afin de maximiser l'efficacité de la réaction.

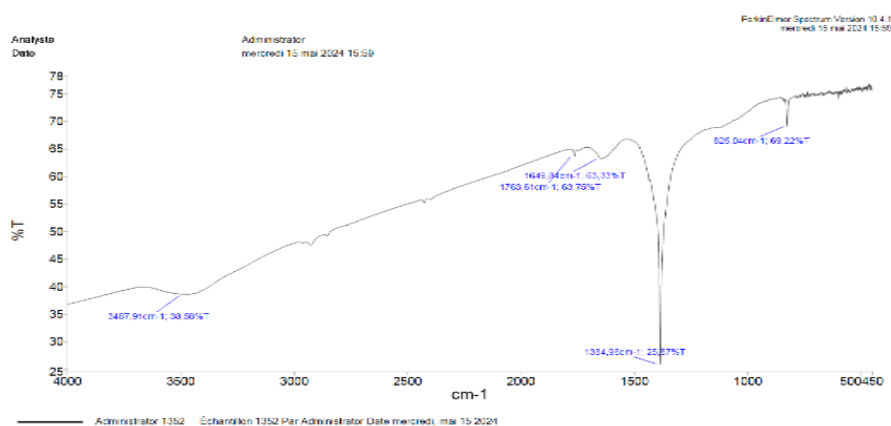
### B-Infrarouge (IR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) fournit des informations sur la structure des nanoparticules en analysant les modes de vibration des liaisons. Cette technique est utilisée pour confirmer l'interaction entre  $\text{Ag}^+$  et les biomolécules de notre fougère aquatique (*A. pinnata*). La formation des nanoparticules d'argent dans la solution aqueuses peut être validée par le déplacement des bandes caractéristiques attribuées aux différents groupes fonctionnels présents dans l' *A.pinnata* [42]

La caractérisation de nanoparticules obtenues par IR est montée dans la figure III.22



#### a- Spectre IR d'extrait



#### b-Spectre IR des nanoparticules d'argent

**Figure III.22** : Spectre IR d'extrait et des nanoparticules d'argent

Tableau III.3 : Groupes fonctionnels à partir d'analyse IR.

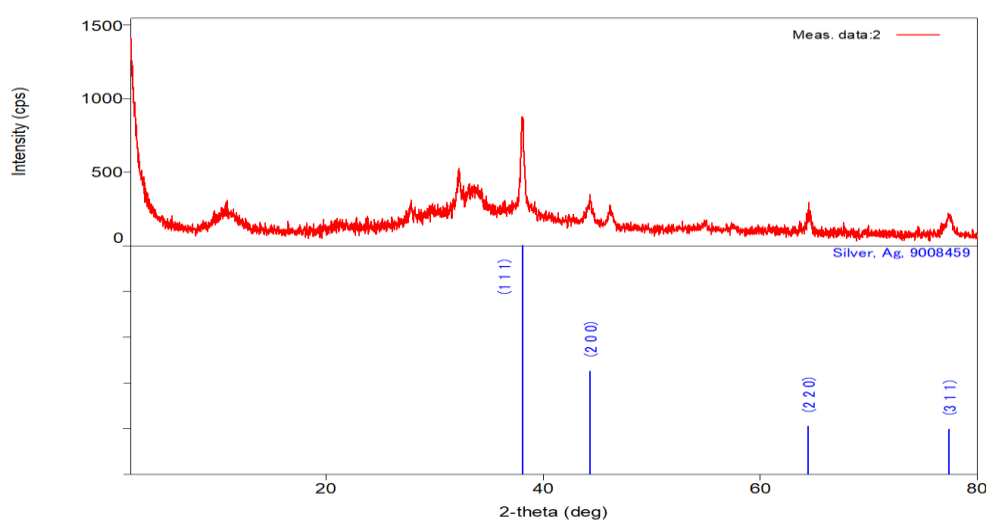
Échantillon	Nombre d'onde (cm <sup>-1</sup> )		Groupements fonctionnels
	Extrait aqueux	AgNPs	
<i>A. pinnata</i>	3433,50	3407,53	Groupe -OH
	1649,91	1644,52	Groupe C=C
	1114,78	1124,19	Groupe C-O
	619,31	593,33	Groupe C-X
	471,87	498,35	Groupe C-X

À partir des spectres obtenus, nous remarquons cinq bandes d'absorption : (a) 3433,50-3407,53 cm<sup>-1</sup>, (b) 1649,91-1644,52 cm<sup>-1</sup>, (c) 1114,78-1124,19 cm<sup>-1</sup>, (d) 619,31-593,33 cm<sup>-1</sup>, et (e) 471,87-498,35 cm<sup>-1</sup>.

Les bandes d'absorption à 1649,91-1644,52 cm<sup>-1</sup> sont généralement associées à la vibration d'élongation des liaisons C=O et les bandes à 1114,78-1124,19 sont souvent attribuées à la vibration d'élongation C-O [10,43]. Les groupes fonctionnels -C-O et -C=O aromatique sont probablement impliqués dans la réduction directe de Ag<sup>+</sup> en Ag et la stabilisation des nanoparticules d'argent formées [10].

### C-DRX :

Les structures des nanoparticules d'argent ont été analysées par diffraction des rayons X (DRX) pour déterminer avec précision la phase cristalline des nanoparticules. La DRX est une technique efficace pour caractériser l'argent métallique et identifier ses plans de diffraction. Le diffractogramme des rayons X des nanoparticules d'argent synthétisées à partir d'extrait aqueux d'*A.pinnata* est présenté dans la figure III.23.

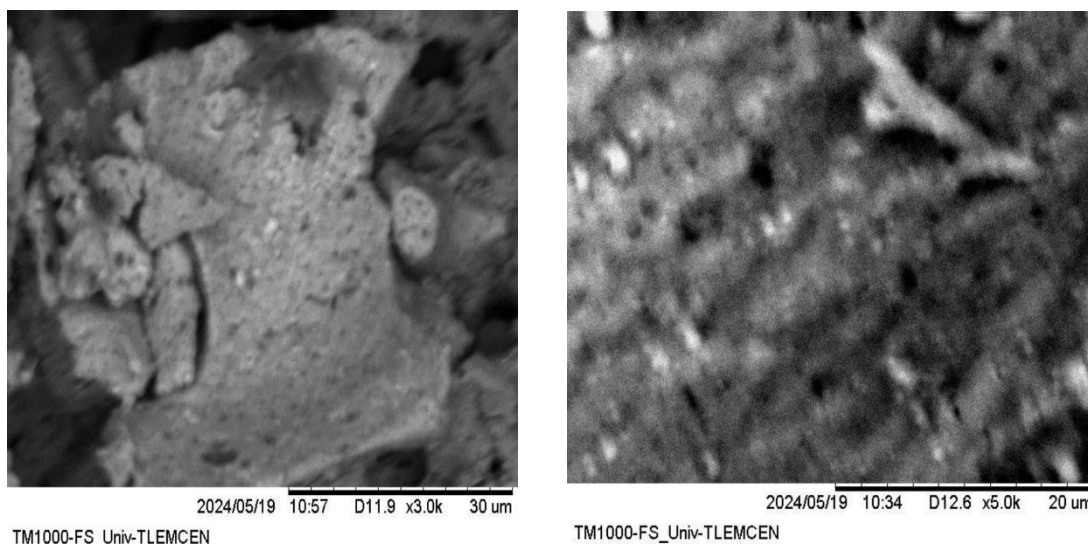
Figure III.23: Spectre DRX des Nps-Ag d'*A.pinnata*.

Les spectres obtenus pour les nanoparticules d'argent montrent quatre pics caractéristiques de l'argent métallique (Ag), situés respectivement à des angles de  $2\theta = 38^\circ$ ,  $44^\circ$ ,  $64^\circ$  et  $77^\circ$ . Ces pics correspondent aux plans cristallins (111), (200), (220) et (311) d'une structure cubique à faces centrées (CFC), indiquant ainsi la formation de nanoparticules d'argent.

Le pic intense à  $2\theta = 38^\circ$  est attribué à l'orientation (111). La largeur des pics suggère la présence de nanoparticules de taille nanométrique [44].

#### D-MEB :

Une analyse par microscope électronique à balayage (MEB) a été effectuée offrant des détails sur la morphologie des matériaux obtenus, les résultats sont montrés dans la figure III.24.



**Figure III.24 :** Résultats d'analyses des Nps-Ag par MEB

La morphologie des nanoparticules d'argent (NP-Ag) n'est pas clairement définie en raison des limitations de l'équipement utilisé ( $>10\mu\text{m}$ ). Les petites sphères blanches observées et qui sont de l'ordre des nanomètres, pourraient potentiellement représenter les NP-Ag.

Cependant, pour obtenir une caractérisation morphologique plus précise et détaillée, une analyse par microscopie électronique à transmission (MET) serait plus efficace.

Cette analyse permettrait de mieux comprendre la structure et la distribution des nanoparticules, ce qui est crucial pour leurs applications potentielles et pour optimiser les conditions de synthèses.



**CONCLUSION**

## Conclusion

---

La fougère aquatique *A. pinnata* représente une source riche en composés biomoléculaires aux bienfaits pour la santé et aux applications multiples. À travers cette étude, nous avons amélioré le processus d'extraction de ces composés dans le but de les exploiter de manière plus efficace.

Au cours de l'étude, deux méthodes de séchage différentes ont été utilisées : séchage à l'étuve et le séchage par lyophilisateur. Ensuite, trois méthodes d'extraction ont été employées l'extraction par ultrasons, l'extraction par reflux et une combinaison des deux. Trois solvants différents (eau distillée, méthanol 80% et acétone 90%) ont été utilisés pour chaque méthode d'extraction.

Les résultats de notre étude montrent que l'efficacité des méthodes d'extraction varie en fonction des biomolécules à extraire et de leur localisation dans la cellule. Certains composants nécessitent de la chaleur lors du séchage, tandis que d'autres lui sont sensibles, requièrent l'utilisation du lyophilisateur. De plus, certaines biomolécules à polarité élevée nécessitent un solvant à polarité élevée pour être extraites, tandis que celles à faible polarité nécessitent un solvant moins polaire. De même, pour les méthodes d'extraction il existe des biomolécules nécessitent uniquement de la chaleur, tandis que d'autres nécessitent la rupture de la paroi cellulaire par ultrasons.

Concernant nos résultats, le rendement le plus élevé a été obtenu avec les extraits aqueux utilisant les ultrasons sur l' *A.pinnata* lyophilisée. Les valeurs les plus importants de pigment ont été obtenues en utilisant l'acétone 90% avec reflux de l' *A.pinnata* séchée à l'étuve, suivie par le méthanol 80%. L'extraction des polyphénol et les flavonoïdes par reflux utilisant le méthanol 80% et l'acétone 90% était plus efficace en donnant des valeurs significatives.

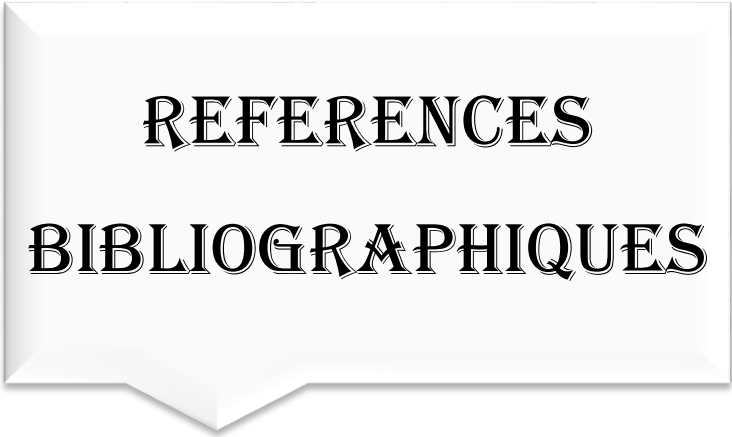
En ce qui concerne les glucides, l'extraction par reflux s'est révélée être une méthode plus adéquate pour l' *A.pinnata* séchée à l'étuve.

Les extraits d'acétone à 90 % et de méthanol à 80 % ont montré une activité antioxydante significativement supérieure à celle des autres extraits aqueux, ce qui s'explique par la nature des biomolécules d'une polarité modérée présentes dans l' *A. pinnata*.

La synthèse des nanoparticules d'argent e à partir de l'extrait aqueux d' *A. pinnata* a été confirmée par une caractérisation utilisant différentes méthodes spectroscopiques, révélant les résultats suivants:

- ✚ L'apparition d'une bande d'absorption à 450 nm par UV-visible.
- ✚ Les groupes fonctionnels correspondant à la formation de ces nanoparticules d'argent (-C-O, -C=O, O-H) identifiés par spectroscopie infrarouge (IR).
- ✚ La structure cristalline de type cubique à faces centrées (CFC) déterminée par diffraction des rayons X (DRX).

Cette étude pourrait se poursuivre par l'identification précise du type de nanoparticules synthétisées ainsi que par l'analyse détaillée de leur morphologie et de leurs propriétés physico-chimiques. Ces nanoparticules pourraient ensuite être utilisées dans divers domaines de la nanotechnologie, notamment en tant qu'agents de diagnostic, catalyseurs ou dans des applications de traitement de l'eau. De plus, il est possible d'étudier leur activité antioxydante et de les incorporer comme composant principal dans les compléments alimentaires ou les médicaments.



**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références Bibliographiques

---

1. Suess, M.J. and J.W. Huismans, La gestion des déchets dangereux: principes directeurs et code de bonne pratique 1984: Organisation mondiale de la Santé. Bureau régional de l'Europe.
2. Billy, E., Application des liquides ioniques à la valorisation des métaux précieux par une voie de chimie verte, 2012, Grenoble.
3. Haddouchi, F., T. Chaouche, and N. Halla, Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, 2016. 16(S1): p. S254-S262.
4. Zbadi, R., H. Mohti, and F. Moussaoui, Stress oxydatif: évaluation du pouvoir antioxydant de quelques plantes médicinales. *Médecine thérapeutique*, 2018. 24(2): p. 134-141.
5. SADOU, F.Z., et al., Formulation d'une crème anti-brûlure à base de plante *Carthamus caeruleus* L. 2020.
6. Guézennec, J., C. Moretti, and J.-C. Simon, Substances naturelles en Polynésie française: Stratégies de valorisation 2013: IRD Éditions.
7. Eltabakh, M., et al., Active bio-composite sodium alginate/maltodextrin packaging films for food containing *Azolla pinnata* leaves extract as natural antioxidant. *Journal of Polymers and the Environment*, 2021: p. 1-11.
8. Farook, M., et al., Phytochemical screening, Antibacterial and Antioxidant activity of *Azolla pinnata*. 2019.
9. Hajra, A. and N.K. Mondal, Utilization of aquatic fern *Azolla pinnata* as a green reducing agent for the synthesis of silver nanoparticles. *Indian Sci Cruiser*, 2017. 31(2): p. 10-16.
10. Rajagopal, G., et al., Phytofabrication of selenium nanoparticles using *Azolla pinnata*: Evaluation of catalytic properties in oxidation, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2021. 9(4): p. 105483.
11. Basak, B., et al., *Azolla* (*Azolla pinnata*) as a feed ingredient in broiler ration. *Int. J. Poult. Sci*, 2002. 1(1): p. 29-34.
12. Hédji, C.C., et al., Valorisation de *Azolla* spp, *Moringa oleifera*, son de riz, et de co-produits de volaille et de poisson en alimentation animale: synthèse bibliographique. *Journal of Applied Biosciences*, 2014. 81: p. 7277-7289.
13. Roger, P. and J. Garcia, Introduction à la microbiologie du sol. Université de Provence, Ecole supérieure d'ingénieurs de Luminy, France, 2001.
14. du Sénégal, A., de Koular (Sénégal) I Rice paddy field in I the koular valley'(Sénégal, WA frica).
15. Carrapiço, F., *Azolla* as a superorganism. Its implication in symbiotic studies. *Symbioses and Stress: Joint Ventures in Biology*, 2010: p. 225-241.
16. Sebastian, A., P. Deepa, and M.N.V. Prasad, *Azolla* farming for sustainable environmental remediation. *Handbook of assisted and amendment: Enhanced sustainable remediation technology*, 2021: p. 517-533.
17. Pillai, K., *Azolla*-A Sustainable Feed Substitute for Livestock. *SEDME (Small Enterprises Development, Management & Extension Journal)*, 2001. 28(4): p. 51-58.
18. Riaz, A., et al., Importance of *Azolla* plant in poultry production. *World's Poultry Science Journal*, 2022. 78(3): p. 789-802.
19. Sunkireddy, P., et al., Natural antioxidant biomolecules promises future nanomedicine based therapy for cataract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. 112: p. 554-562.
20. Rasul, M.G., Conventional extraction methods use in medicinal plants, their advantages and disadvantages. *Int. J. Basic Sci. Appl. Comput*, 2018. 2: p. 10-14.
21. Azwanida, N., A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med aromat plants*, 2015. 4(196): p. 2167-0412.
22. Jacob, M.M., et al. *Azolla pinnata*: Potential Phytoremediation, Antimicrobial, and Antioxidant Applications. in *Proceedings International*. 2020.
23. Husna Zulkarnin, N.S., et al., Larvicidal effectiveness of *Azolla pinnata* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) with its effects on larval morphology and visualization of behavioural response. *Journal of parasitology research*, 2018. 2018.
24. Adande, R. and E. Fiogbe, Utilisation des fertilisants organiques d'origine animale et végétale pour le développement de la pisciculture dans les étangs: Synthèse bibliographique. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development*, 2015. 2(12): p. 281-287.

## Références Bibliographiques

---

25. Biswas, P. and C.-Y. Wu, Nanoparticles and the environment. *Journal of the air & waste management association*, 2005. 55(6): p. 708-746.
26. Banfield, J.F. and H. Zhang, Nanoparticles in the environment. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 2001. 44(1): p. 1-58.
27. Sapountzi, E., Développement de nouveaux supports basés sur des nanofibres de matériaux hybrides électrofilées pour le développement de biocapteurs électrochimiques, 2015, Université Claude Bernard-Lyon I.
28. Rigoudy, C., Couches minces diélectriques avec des inclusions de nanoparticules d'argent réalisées par voie plasma conçues pour le contrôle du gradient de charges électriques sous irradiation électronique pour des applications spatiales, 2019, Université Paul Sabatier-Toulouse III.
29. Coulibaly, I., et al., Techniques de séchage des starters lactiques et mécanismes affectant la viabilité cellulaire suite à la lyophilisation. *BASE*, 2011.
30. García-Hernández, V.M., et al., Comparison of Soxhlet and ultrasound methods for oil extraction from Spanish flaxseeds. 2017.
31. Lichtenthaler, H.K. and C. Buschmann, Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, 2001. 1(1): p. F4. 3.1-F4. 3.8.
32. Singleton, V.L., R. Orthofer, and R.M. Lamuela-Raventós, [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in *Methods in enzymology* 1999, Elsevier. p. 152-178.
33. Albalasmeh, A.A., A.A. Berhe, and T.A. Ghezzehei, A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate polymers*, 2013. 97(2): p. 253-261.
34. Favier, A., Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 2003. 108(10): p. 863-832.
35. Bentabet, N., Z. Boucherit-Otmani, and K. Boucherit, Composition chimique et activité antioxydante d'extraits organiques des racines de *Fredolia aretioides* de la région de Béchar en Algérie. *Phytothérapie*, 2014. 12(6): p. 364-371.
36. Shah, P. and H. Modi, Comparative study of DPPH, ABTS and FRAP assays for determination of antioxidant activity. *Int. J. Res. Appl. Sci. Eng. Technol*, 2015. 3(6): p. 636-641.
37. Koffi, A.A., S. Muralidharan, and A. Trokourey, Corrosion inhibition of carbon steel using extract of *Mussaenda erythrophylla* leaves: interfacial action mode in sulfuric acid medium/Inhibition de la corrosion de l'acier à l'aide d'extrait de feuilles de *Mussaenda erythrophylla*: mode d'action interfaciale en milieu acide sulfurique. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 2015. 40: p. 31.
38. Franco, D., et al., Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem*, 2008. 7(8): p. 3210-3216.
39. Mahmoudi, S., M. Khali, and N. Mahmoudi, Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.). *Nature & Technology*, 2013(9): p. 35.
40. Nune, S.K., et al., Green nanotechnology from tea: phytochemicals in tea as building blocks for production of biocompatible gold nanoparticles. *Journal of materials chemistry*, 2009. 19(19): p. 2912-2920.
41. Rai, M. and C. Posten, *Green biosynthesis of nanoparticles: mechanisms and applications*. 2013: CABI. p.21.
42. Bin Ahmad, M., et al., Synthesis of silver nanoparticles in chitosan, gelatin and chitosan/gelatin bionanocomposites by a chemical reducing agent and their characterization. *Molecules*, 2011. 16(9): p. 7237-7248
43. Sudha, A., J. Jeyakanthan, and P. Srinivasan, Green synthesis of silver nanoparticles using *Lippia nodiflora* aerial extract and evaluation of their antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects. *Resource-Efficient Technologies*, 2017. 3(4): p. 506-515.

## Références Bibliographiques

---

44. Liu, T.-M., et al., One-step shell polymerization of inorganic nanoparticles and their applications in SERS/nonlinear optical imaging, drug delivery, and catalysis. *Scientific Reports*, 2014. 4(5593): p. 1-10
45. Alam, M.N., et al., *Murraya koenigii* Spreng. leaf extract: an efficient green multifunctional agent for the controlled synthesis of Au nanoparticles. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 2014. 2(4): p. 652-664.

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تحسين طرق استخراج الجزيئات الحيوية من السرخس المائي ازولا بيناتا بهدف استخدامها في تطبيقات متنوعة. تم تنفيذ طريقتين للتجفيف: التجفيف في الفرن والتجفيف بالتجميد. بعد ذلك، تم استخراج الجزيئات الحيوية باستخدام الموجات فوق الصوتية، والتسخين الانعكاسي، وطريقة جمع بين التقنيتين. تم استخدام ثلاثة مذيبات مختلفة القطبية: الماء، الميثانول بنسبة 80%، والأسيتون بنسبة 90%. تم تحديد محتوى الجزيئات الحيوية في كل مستخلص، مثل الكربوهيدرات، وكذلك الأصباغ، والبوليفينولات، والفلافونويدات نظراً لخصائصها المضادة للأكسدة. تم تقييم القدرة المضادة للجذور الحرة لهذه المستخلصات باستخدام اختبار DPPH (2,2-ثنائي فينيل-1-بيكريل هيدرازيل) وتم تقييم القدرة الاختزالية باستخدام اختبار FRAP القدرة المضادة للأكسدة الاختزالية الحديدية. تم تصنيع الجسيمات النانوية الفضية من المستخلص المائي الذي يحتوي على أعلى نسبة من الجزيئات النشطة بيولوجياً وتميزت باستخدام التحليل الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية-المرئية، التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء (IR)، حيود الأشعة السينية (XRD)، والمجهر الإلكتروني الماسح (SEM). أظهرت النتائج وجود كميات كبيرة من الأصباغ باستخدام الأسيتون بنسبة 80% و 90% من الأسيتون للبوليفينولات والفلافونويدات مع التسخين الانعكاسي والتجفيف في الفرن. سمحت تمييز الجسيمات النانوية باستخدام تقنيات مختلفة بتحديد منطقة الامتصاص للجسيمات النانوية الفضية (450 نانومتر)، والمجموعات الوظيفية التي تساهم في اختزال أيونات الفضة (Ag<sup>+</sup>)، والفئة البلورية التي تنتمي إليها) مكعب مركزي الوجه ('CFC').

**الكلمات المفتاحية:** ازولا بيناتا، الجزيئات الحيوية، النشاط المضاد للأكسدة، الجسيمات النانوية الفضية.

## Résumé

Cette étude a pour objectif d'optimiser les méthodes d'extraction des biomolécules de la fougère aquatique *A. pinnata* en vue de leur exploitation dans diverses applications. Deux méthodes de séchage ont été mises en œuvre : le séchage à l'étuve et la lyophilisation. Les biomolécules ont ensuite été extraites en utilisant des ultrasons, le reflux et une méthode combinant les deux techniques. Trois solvants de polarités différentes ont été employés : l'eau, le méthanol à 80 % et l'acétone à 90 %. Les teneurs en biomolécules présentes dans chaque extrait, telles que les glucides, ont été déterminées, de même que les pigments, polyphénol et flavonoïdes en raison de leurs propriétés antioxydantes. Le pouvoir antiradicalaire de ces extraits a été évaluée par le test DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) et le pouvoir réducteur a été évaluée par tests FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). Les nanoparticules d'argent ont été synthétisées à partir de l'extrait aqueux contenant les teneurs les plus élevés en molécules bioactives et caractérisées en utilisant la spectroscopie UV-Visibles, la spectroscopie infrarouge (IR), diffraction des rayons X (DRX), et la Microscopie Électronique à Balayage (MEB). Les résultats ont prouvé la présence de quantités importantes des pigments en utilisant l'acétone 80% et acétone 90% pour les polyphénol et les flavonoïdes avec les reflux et le séchage par l'étuve. La caractérisation des nanoparticules par différentes techniques a permis de déterminer la zone d'absorption des nanoparticules d'argent (450 nm), les groupes fonctionnels contribuant à la réduction d'Ag<sup>+</sup> et la classe cristalline à laquelle elles appartiennent (cubique face centrée 'CFC').

**Mots clés :** *A. pinnata*, Biomolécules, activité antioxydante, Nanoparticules d'argent.

## Abstract

This study aims to optimize the extraction methods of biomolecules from the aquatic fern *A. pinnata* for their exploitation in various applications. Two drying methods were implemented: oven drying and lyophilization. The biomolecules were then extracted using ultrasound, reflux, and a combined method of both techniques. Three solvents with different polarities were employed: water, 80% methanol, and 90% acetone. The content of biomolecules present in each extract, such as carbohydrates, as well as pigments, polyphenols, and flavonoids, were determined due to their antioxidant properties. The radical scavenging ability of these extracts was evaluated using the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) test, and the reducing power was assessed using the FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) test. Silver nanoparticles were synthesized from the aqueous extract containing the highest levels of bioactive molecules and characterized using UV-Visible spectroscopy, infrared spectroscopy (IR), X-ray diffraction (XRD), and scanning electron microscopy (SEM). The results demonstrated the presence of significant amounts of pigments using 80% acetone and 90% acetone for polyphenols and flavonoids with reflux and oven drying. Characterization of the nanoparticles using various techniques allowed for the determination of the absorption zone of silver nanoparticles (450 nm), the functional groups contributing to the reduction of Ag<sup>+</sup>, and the crystalline class they belong to (face-centered cubic 'FCC').

**Keywords:** *A. pinnata*, Biomolecules, Antioxidant activity, Silver nanoparticles.