

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique Et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة الحراش - الجزائر

École Nationale Supérieure Agronomique – El Harrach – Alger



Département De Technologie Alimentaire

Laboratoire De Recherche En Technologie Alimentaire Et Nutrition Humaine

LRTANH

THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE DOCTORAT EN SCIENCES
AGRONOMIQUES

Spécialité : Sciences Et Qualité Des Aliments

Présentée par

Mme. KHEYAR-BOUKHRIS Farida

THÈME

**Caractérisation physicochimique et biologique
du *Moringa oleifera* Lam. cultivé en Algérie.**

Soutenue publiquement le 16/03/2025

Devant le Jury composé de :

Président	Mme. TELLAH Sihem	Professeur	(E.N.S.A. El Harrach)
Directeur	M. BITAM Arezki	Professeur	(E.N.S.A. El Harrach)
Examineurs	Mme. DOUMANDJI Amel	Professeur	(Univ. Blida1)
	Mme. YAHIAOUI Karima	Professeur	(Univ. Boumerdès)

Année Universitaire: 2024/2025

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

PARTIE I. Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur *Moringa oleifera* 5

1.1. Origine et répartition géographique 5

1.2. Classification systématique..... 5

1.3. Description botanique 6

1.4. Exigences écologiques, plantation et production..... 7

1.5. Les multiples usages du Moringa..... 8

1.6. Incorporation de la poudre de feuilles de *M. oleifera* dans divers produits
alimentaires 10

1.7. Contenu nutritionnel des feuilles de *Moringa oleifera* 11

1.8. Propriétés pharmacologiques des feuilles de *M. oleifera* 15

1.8.1. Activité antimicrobienne et antifongique..... 15

1.8.2. Activité anti-inflammatoire..... 16

1.8.3. Stress oxydatif..... 16

1.8.4. Activité antioxydante 16

1.8.5. Activité antitumorale et anticancéreuse 17

1.8.6. Activité anti-obésité 17

1.8.7.	Activité antidiabétique et cicatrisante	17
Chapitre 2 : Aperçu de quelques concepts théoriques sur les plans d'expériences		18
2.1.	Méthodologie de surface de réponse (RSM).....	18
2.1.1.	Terminologie.....	19
2.1.2.	Étapes pour l'application RSM.....	19
2.1.2.1.	Étude préliminaire.....	20
2.1.2.2.	Choix du plan expérimental	20
2.1.2.3.	Traitement mathématique et statistique des données.....	21
2.1.2.4.	Vérification du modèle ajusté	21
2.1.2.5.	Détermination des conditions optimales.....	22
2.1.3.	Plans d'expérience	22
2.1.3.1.	Plan Box-Behnken (BBD)	23
2.2.	Applications du RSM dans l'optimisation du processus d'extraction assistée par micro-ondes (MAE)	24
2.2.1.	Historique du micro-ondes.....	24
2.2.2.	Principe de MAE.....	25
2.2.3.	Instruments.....	25
2.2.4.	Facteurs influençant la performance de la MAE	26
2.2.5.	Comparaison entre MAE et d'autres techniques d'extraction	26
Chapitre 3 : Composés phénoliques : Chimie et réactivité.....		28
3.1.	Généralités	28
3.2.	Classification.....	29

3.2.1.	Acides phénoliques	29
3.2.2.	Flavonoïdes	31
3.2.3.	Tanins.....	31
3.3.	Rôles des composés phénoliques dans la nutrition et la physiologie humaine	33
3.4.	Mécanisme d'action des composés phénoliques dans la capacité antioxydante	34
3.5.	Composés phénoliques typiques du <i>Moringa oleifera</i>	34

PARTIE II. Partie expérimentale

Chapitre 4 : Evaluation de la qualité nutritionnelle des feuilles de *Moringa oleifera*..... 36

4.1.	Matériel et Méthodes	37
4.1.1.	Préparation du matériel végétal.....	37
4.1.2.	Séchage et broyage.....	37
4.1.3.	Caractérisation physico-chimique de la poudre de feuilles de <i>M. oleifera</i>	38
4.1.3.1.	Taux d'humidité et matière sèche	38
4.1.3.2.	Taux de cendre	39
4.1.3.3.	Teneur brute en fibres	39
4.1.3.4.	Mesure de PH.....	40
4.1.3.5.	Teneur en glucides totaux	40
4.1.3.6.	Teneur en protéines totales	40
4.1.3.7.	Teneur en matière grasse totale.....	41
4.1.3.8.	Valeur énergétique	41
4.1.3.9.	Teneur en acide ascorbique.....	41

4.2.	Résultats et discussion	42
4.2.1.	Détermination de l'humidité, le pH, la teneur en cendres et en fibres.....	42
4.2.2.	Estimation de la teneur en protéines, lipides et glucides totaux	44
4.2.2.1.	Protéines totales	44
4.2.2.2.	Lipides totaux.....	45
4.2.2.3.	Glucides totaux	45
4.2.3.	Estimation de la teneur en vitamine C	45
4.3.	Conclusion du chapitre.....	47

Chapitre 5 : Extraction assistée par micro-ondes pour une récupération optimale des composés bioactifs des feuilles de *Moringa oleifera*, et identification par analyse LC-QTOF-HRMS **48**

5.1.	Optimisation de la MAE des TPC par application de la méthodologie de surface de réponse, avec comparaison aux méthodes conventionnelles	49
5.1.1.	Matériel et Méthodes	49
5.1.1.1.	Matériel végétal.....	49
5.1.1.2.	Optimisation de l'extraction assistée par micro-ondes des composés phénoliques totaux (TPC).....	49
5.1.1.2.1.	Méthodologie séquentielle	49
5.1.1.2.2.	Méthodologie de la surface de réponse (RSM).....	50
5.1.1.3.	Procédés conventionnels d'extraction solide-liquide des composés phénoliques.....	52
5.1.1.3.1.	Extraction par macération (ME).....	52
5.1.1.3.2.	Extraction aqueuse des composés phénoliques.....	52
	A. Extraction par infusion (IE).....	52

B. Extraction par décoction (DE).....	53
5.1.1.4. Dosage des composés phénoliques totaux (TPC)	53
5.1.1.5. Dosage des flavonoïdes totaux (TFC).....	54
5.1.1.6. Analyse statistique	54
5.1.2. Résultats et discussion	55
5.1.2.1. Optimisation de l'extraction des composés phénoliques totaux par une méthode à un seul facteur (Analyse mono-factorielle).....	55
5.1.2.1.1. Influence de la concentration d'éthanol.....	55
5.1.2.1.2. Influence de la puissance des micro-ondes	56
5.1.2.1.3. Influence du temps d'irradiation.....	56
5.1.2.1.4. Influence du rapport solvant/solide.....	57
5.1.2.2. Optimisation de l'extraction des polyphénols par la méthodologie de surface de réponse (RSM)	57
5.1.2.2.1. Modélisation et ajustement des modèles.....	57
5.1.2.2.2. Analyse des surfaces de réponse	60
5.1.2.2.3. Validation du modèle	62
5.1.2.3. Comparaison de la MAE avec les méthodes conventionnelles.....	63
5.2. Criblage UHPLC-QTOF/MS des composés bioactifs de l'extrait optimisé par MAE des feuilles de <i>Moringa oleifera</i>	65
5.2.1. Analyse LC-HRMS.....	65
5.2.2. Résultats et discussion	66
5.3. Conclusion du chapitre.....	73

Chapitre 6 : Evaluation des activités biologiques in vitro des substances bioactives des feuilles de <i>Moringa oleifera</i>.....	74
6.1. Matériel et Méthodes	75
6.1.1. Evaluation de l'activité antioxydante.....	75
6.1.1.1.1. Activité de piégeage du radical DPPH•	75
6.1.1.1.2. Activité de piégeage du radical ABTS+•	76
6.1.1.1.3. Pouvoir réducteur du fer ferrique (FRAP)	77
6.1.2. Evaluation de l'activité antibactérienne	77
6.1.2.1. Réisolation et recontrôle des bactéries (jeunes cultures)	77
6.1.2.2. Préparation de l'inoculum (standardisation de la concentration du germe cible)	78
6.1.2.2.1. Prélèvement des colonies	78
6.1.2.2.2. Préparation de la suspension bactérienne.....	78
6.1.2.2.3. Mesure de la densité optique.....	78
6.1.2.2.4. Standardisation de la concentration.....	78
6.1.2.2.5. Ajustement de la turbidité	78
6.1.2.3. Préparation des dilutions.....	79
6.1.2.4. Essai antibactérien (Aromatogramme).....	79
6.1.2.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	79
6.1.3. Evaluation de la cytotoxicité et l'activité anti-hémolytique	80
6.1.3.1. Préparation de la suspension d'érythrocytes	80
6.1.3.2. Test de cytotoxicité	81
6.1.3.3. Test anti-hémolytique	81

6.1.4.	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	82
6.1.5.	Evaluation de l'activité anti-diabétique (Dosage de l'activité inhibitrice de l' α -amylase)	83
6.1.6.	Analyses statistiques	84
6.2.	Résultats et discussion	84
6.2.1.	Evaluation de l'activité antioxydante.....	84
6.2.1.1.	Activité de piégeage du radical DPPH•	84
6.2.1.2.	Activité de piégeage contre le radical ABTS•+	85
6.2.1.3.	Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	87
6.2.2.	Evaluation de l'activité antibactérienne	89
6.2.2.1.	Résultats de l'aromatogramme.....	89
6.2.2.2.	Concentration minimale inhibitrice (CMI)	94
6.2.3.	Evaluation de la cytotoxicité et l'activité anti-hémolytique	95
6.2.3.1.	Evaluation de la cytoxicité.....	95
6.2.3.2.	Activité anti-hémolytique des extraits de <i>M. oleifera</i> contre l'hémolyse induite par l'AAPH sur les érythrocytes humains	97
6.2.4.	Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	99
6.2.5.	Evaluation de l'activité anti-diabétique (l'activité inhibitrice de l' α -amylase)	102
6.3.	Conclusion du chapitre.....	104
	Conclusion générale.....	105
	Perspectives.....	108
	Annexes.....	109
	Références bibliographiques.....	114

Résumé

Moringa oleifera Lam., cultivé en Algérie, est une plante prometteuse pour ses bienfaits médicinaux et nutritionnels, constituant un aliment phytopharmaceutique et fonctionnel avec des applications dans le traitement des maladies chroniques et la promotion d'une alimentation durable. Ce travail a d'abord porté sur la caractérisation physicochimique de la poudre de feuilles séchées de *M. oleifera*, suivie de l'analyse de sa phytochimie par extraction assistée par micro-ondes (MAE) verte optimisée, en utilisant la méthodologie de surface de réponse et le plan de Box-Behnken pour maximiser la récupération des composés phénoliques totaux (TPC), comparé aux méthodes conventionnelles (ME, DE et IE). Une identification des composés bioactifs présents dans l'extrait optimisé a ensuite été réalisée par analyse LC-QTOF-HRMS. Enfin, une caractérisation biologique in vitro, incluant les activités antioxydante, antibactérienne, anti-hémolytique, ainsi que la non-toxicité et les effets anti-inflammatoires et antidiabétiques des différents extraits, a été réalisée.

L'analyse a montré une teneur nutritionnelle élevée en glucides (44,80 %), protéines (21,80 %), lipides (6,1 %), ainsi qu'un apport en minéraux et vitamines, positionnant les feuilles de *M. oleifera* comme une source de nutriments essentiels. Les conditions optimales pour MAE incluent une concentration en éthanol de 48,86 %, une puissance de micro-ondes de 626,53 W, et un temps de 99,48 s. Cette méthode a donné un rendement supérieur en TPC (58,45 mg GAE/g DW) par rapport aux méthodes classiques. Par UHPLC-QTOF/MS, 47 composés bioactifs, dont 40 phénoliques (16 acides phénoliques, 24 flavonoïdes), ont été identifiés, 11 étant rapportés pour la première fois dans les feuilles de *M. oleifera*.

Les tests biologiques indiquent que les extraits de feuilles de *M. oleifera* (MAE, ME, DE et IE) ont exercés de fortes activités biologiques in vitro, notamment l'extrait optimisé MAE, qui démontre une activité antiradicalaire et une activité réductrice élevée, avec des valeurs IC₅₀ de $0,294 \pm 0,004$ mg/mL pour la méthode DPPH, $0,425 \pm 0,005$ mg/mL pour la méthode ABTS et $20,85 \pm 0,5$ mg EAA/g pour la méthode du FRAP. L'activité antibactérienne de l'extrait optimisée est significative contre les souches bactériennes Gram+ et Gram-, avec un effet maximal sur *Escherichia coli* (ATCC 25922), donnant un diamètre d'inhibition de $32,25 \pm 0,25$ mm et une CMI $< 0,125$ mg/mL. En revanche, une activité moindre est observée contre le SARM, avec un diamètre d'inhibition de $8,50 \pm 0,50$ mm et une CMI > 50 mg/mL. Les extraits de *M. oleifera* se révèlent pratiquement non toxiques même à des concentrations élevées (2 mg/mL). L'étude de l'activité anti-hémolytique a montré une meilleure résistance des globules rouges au stress oxydatif induit par l'AAPH en présence des extraits, avec un effet protecteur important sur l'intégrité cellulaire, supérieur à celui des Trolox et de la vitamine C, et offrant une protection comprise entre $80,11 \pm 0,16$ % et $90,19 \pm 1,06$ %. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a montré une inhibition significative de la dénaturation des protéines (BSA) par les extraits, l'extrait optimisé ayant un effet inhibiteur maximal de 92,01 % à 500 µg/mL avec une valeur d'IC₅₀ de $102,271 \pm 0,46$ µg/mL. L'étude de l'activité anti-diabétique a mis en évidence un effet significatif des extraits sur l'activité de l'α-amylase, l'extrait optimisé présentant une forte inhibition cette enzyme à 500 µg/mL, avec un pourcentage d'inhibition de $73,83 \pm 0,40$ % et une valeur d'IC₅₀ de $170,46 \pm 1,05$ µg/mL. La richesse des feuilles de *M. oleifera* en composés phénoliques, notamment en flavonoïdes pourrait être à l'origine des propriétés biologiques observées.

Cette étude soutient ainsi le potentiel de *M. oleifera* pour une utilisation alimentaire et médicinale, en faisant un candidat prometteur pour les industries agroalimentaires et pharmaceutiques

Mots clés : feuilles de *Moringa oleifera*, caractérisation physicochimique, optimisation, extraction assistée par micro-ondes, composés phénoliques, UHPLC-QTOF/MS, caractérisation biologique.

Abstract

Moringa oleifera Lam., cultivated in Algeria, is a promising plant for its medicinal and nutritional benefits, serving as a phytopharmaceutical and functional food with applications in chronic disease management and the promotion of sustainable nutrition. This study initially focused on the physicochemical characterization of dried *M. oleifera* leaf powder, followed by an analysis of its phytochemical composition through optimized green microwave-assisted extraction (MAE), using response surface methodology and the Box-Behnken design to maximize the recovery of total phenolic compounds (TPC), in comparison with conventional methods (ME, DE, and IE). Bioactive compounds present in the optimized extract were then identified through LC-QTOF-HRMS analysis. Finally, an in vitro biological characterization was conducted, including antioxidant, antibacterial, and anti-hemolytic activities, as well as assessments of non-toxicity and anti-inflammatory and antidiabetic effects of the various extracts.

The analysis showed a high nutritional content in carbohydrates (44.80%), proteins (21.80%), lipids (6.1%), as well as minerals and vitamins, positioning *M. oleifera* leaves as a source of essential nutrients. Optimal conditions for MAE include an ethanol concentration of 48.86%, microwave power of 626.53 W, and a duration of 99.48 s. This method yielded a higher TPC (58.45 mg GAE/g DW) compared to conventional methods. Using UHPLC-QTOF/MS, 47 bioactive compounds were identified, including 40 phenolic compounds (16 phenolic acids, 24 flavonoids), with 11 being reported for the first time in *M. oleifera* leaves.

Biological tests indicate that *M. oleifera* leaf extracts (MAE, ME, DE, and IE) exhibit strong in vitro biological activities, notably the optimized MAE extract, which demonstrates high free radical scavenging and reducing activities, with IC₅₀ values of 0.294 ± 0.004 mg/mL for the DPPH method, 0.425 ± 0.005 mg/mL for the ABTS method, and 20.85 ± 0.5 mg EAA/g for the FRAP method. The antibacterial activity of the optimized extract is significant against both Gram+ and Gram- bacterial strains, with maximum effect on *Escherichia coli* (ATCC 25922), showing an inhibition diameter of 32.25 ± 0.25 mm and MIC < 0.125 mg/mL. Conversely, lower activity was observed against MRSA, with an inhibition diameter of 8.50 ± 0.50 mm and MIC > 50 mg/mL. *M. oleifera* extracts are practically non-toxic even at high concentrations (2 mg/mL). The anti-hemolytic study showed improved red blood cell resistance to oxidative stress induced by AAPH in the presence of extracts, with significant protective effects on cellular integrity, superior to those of Trolox and vitamin C, offering protection ranging from $80.11 \pm 0.16\%$ to $90.19 \pm 1.06\%$. The anti-inflammatory activity evaluation showed a significant inhibition of protein (BSA) denaturation by the extracts, with the optimized extract demonstrating maximum inhibition of 92.01% at 500 μ g/mL and an IC₅₀ of 102.271 ± 0.46 μ g/mL. The antidiabetic study revealed a significant effect of the extracts on α -amylase activity, with the optimized extract showing strong inhibition of this enzyme at 500 μ g/mL, with an inhibition rate of $73.83 \pm 0.40\%$ and an IC₅₀ of 170.46 ± 1.05 μ g/mL. The abundance of phenolic compounds, particularly flavonoids, in *M. oleifera* leaves could underlie the observed biological properties.

This study thus supports the potential of *M. oleifera* for both dietary and medicinal uses, positioning it as a promising candidate for the food and pharmaceutical industries.

Keywords: *Moringa oleifera* leaves, Physicochemical characterization, optimization, microwave-assisted extraction, phenolic compounds, UHPLC-QTOF/MS, biological characterization.

ملخص

مورينغا أوليفيرا لام ، المزروعة في الجزائر ، هي نبتة واعدة بفوائدها الطبية والتغذوية، حيث تُعتبر مستحضرات صيدلانية نباتية ومواد غذائية وظيفية مع تطبيقات في معالجة الأمراض المزمنة وتعزيز تغذية مستدامة. تم التركيز في هذا العمل أولاً على التوصيف الفيزيوكيميائي لمسحوق أوراق المورينغا المجففة، تليها تحليل تركيبها النباتي من خلال الاستخراج بمساعدة الميكروويف (MAE) باستخدام منهجية سطح الاستجابة وتصميم بوكس-بهنكن Box-Behnken لتعظيم استعادة المركبات الفينولية الكلية (TPC) مقارنة بطرق الاستخراج التقليدية (ME، DE، IE). ثم تم تحديد المركبات الحيوية النشطة الموجودة في المستخلص المحسن بواسطة تحليل (UHPLC-QTOF/MS) وأخيراً، التوصيف البيولوجي في المختبر، بما في ذلك الأنشطة المضادة للأوكسدة، والمضادة للبكتيريا والمضادة للهيموليز، فضلاً عن عدم السمية وآثارها المضادة للالتهابات والسكري لمختلف مستخلصات المورينغا .

أظهر التحليل محتوى غذائي مرتفع من الكربوهيدرات (44,80%) والبروتينات (21,80%)، والدهون (6,1%) بالإضافة إلى المعادن والفيتامينات ، مما يضع أوراق مورينغا أوليفيرا كمصدر للعناصر الغذائية الأساسية. تشمل الظروف المثلى لهذه الطريقة (MAE)، عن تركيز إيثانول قدره 48,86% وقوة ميكروويف 626,53 واط ، ومدة 99,48 ثانية . وقد أظهرت MAE إنتاجية أعلى TPC (58,45 mg GAE/g DW) مقارنة بالطرق التقليدية . بواسطة تحليل UHPLC-QTOF/MS تم تحديد 47 مركباً حيوياً نشطاً، منها 40 مركباً فينولياً (16 حمضاً فينولياً، و24 فلافونويداً) ، تم الاكتشاف عن 11 منها للمرة الأولى في أوراق مورينغا أوليفيرا .

تشير الاختبارات البيولوجية إلى أن المستخلصات من أوراق مورينغا أوليفيرا أنشطة بيولوجية قوية في المختبر، خاصةً المستخلص المحسن ، الذي يظهر نشاطاً مضاداً للجذور الحرة ونشاطاً مختزلاً عالياً، مع قيم IC_{50} ($0,004 \pm 0,294$ مل/مغ) DPPH لطريقة ، و $0,005 \pm 0,425$ مل/مغ لطريقة ABTS ، و $0,5 \pm 20,85$ مل/مغ EAA / غ لطريقة FRAP . كانت فعالية المستخلص المحسن مضادة للبكتيريا ملحوظة ضد السلالات البكتيرية Gram+ و Gram- مع تأثير أقصى على *Escherichia coli* (25922) ، مما أعطى قطر تثبيط قدره $32,25 \pm 0,25$ مم وقيمة CMI $> 0,125$ مل/مغ. لوحظت فعالية أقل ضد SARM مع قطر تثبيط قدره $8,50 \pm 0,50$ مم وقيمة CMI < 50 مل/مغ. تكشف مستخلصات مورينغا أوليفيرا عن كونها غير سامة عملياً حتى عند تركيزات عالية (2 مل/مغ) . أظهرت دراسة النشاط المضاد للهيموليز مقاومة أفضل لكريات الدم الحمراء ضد الإجهاد التأكسدي الناتج عن AAPH، في وجود المستخلصات فهي وافي مهم على السلامة الخلوية يتفوق على تلك الخاصة بي Trolox و Vitamine C ، حيث توفر حماية تتراوح بين $80,11 \pm 0,16\%$ و $90,19 \pm 1,06\%$. وقد أظهرت تقييمات النشاط المضاد للالتهابات تثبيطاً ملحوظاً لتخريب البروتينات بواسطة (BSA) للمستخلصات حيث كان للمستخلص المحسن تأثير مثبط أقصى ، بلغ عند 500 ميكروغرام / مل نسبة $92,01\%$ مع قيمة IC_{50} تبلغ $102,271 \pm 0,46$ ميكروغرام / مل. سلطت دراسة النشاط المضاد للسكري الضوء على تأثير كبير للمستخلصات على نشاط α -amylase حيث قدم المستخلص المحسن تثبيطاً قوياً لهذا الإنزيم عند 500 ميكروغرام / مل ، مع نسبة تثبيط قدرها $73,83 \pm 0,40\%$ و IC_{50} تبلغ $170,46 \pm 1,05$ ميكروغرام / مل. يمكن أن يكون غنى أوراق مورينغا أوليفيرا بالمركبات الفينولية، وخاصة مركبات الفلافونويد، مصدر الخصائص البيولوجية التي لوحظت.

تدعم هذه الدراسة بالتالي إمكانية استخدام مورينغا أوليفيرا في المجالات الغذائية والطبية، مما يجعلها مرشحاً واعداً لصناعات الأغذية والأدوية.

الكلمات المفتاحية: أوراق مورينغا أوليفيرا، الجودة الغذائية، التحسين، استخراج مساعد بالميكروويف، المركبات الفينولية ، UHPLC-QTOF/MS ، الأنشطة البيولوجية