

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de biologie et écologie végétale

قسم النبات بيولوجيا و الايكولوجيا

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** biotechnologie et génomique végétale

**Spécialité :** *biotechnologie et génomique végétale*

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

## Caractérisation moléculaire des protéines du *Moringa oleifera*

---

Présenté par :BADIS Rania

Le 17/09/2023

BOUSEBOUA Imen

**Jury d'évaluation :**

**Présidente du jury :**

Mr. BENBELKACEM A.

Pr - INRA Constantine1.

**Encadrant :**

Mme. KACEM Nadia Sandra.

Dr- MCB- UFM Constantine1.

**Examinatrice :**

Mme. HAMMOUDA Dounia .

Pr - UFM Constantine1.

**Année universitaire : 2022 - 2023**

## **Caractérisation moléculaire des protéines du *Moringa oleifera***

### **Résumé :**

L'eau constitue un élément important dans la ration alimentaire de l'homme et dans les nombreuses activités dictées par les conditions de vie. Les graines de *Moringa oleifera* présentent un flocculant naturel très efficace pour le traitement de l'eau. Cette efficacité revient à la présence de protéines cationiques actives qui agissent en tant qu'agent adsorbant, coagulant et désinfectant. Dans cet étude, différents traitements ont été testés afin d'évaluer le potentiel germinatif du Moringa ; graines scarifiées, graines trempées dans de l'eau pendant 24h, 48h et 72h, en plus du témoin, afin de déterminer la manière la plus efficace pour faire germer et adapter cet arbre miracle à la région de Constantine. Les résultats ont montré que les graines qui n'ont subies aucun prétraitement ont germé les premières, contrairement aux travaux antérieurs. L'électrophorèse des protéines totales de *Moringa oleifera* a permis la caractérisation de 8 bandes au totales pour les graines et 5 autres pour les feuilles. Les graines contiennent plus de protéines que les feuilles, La quantification des protéines par le Nanodrop confirme ces résultats. Comparativement aux feuilles, les graines contiennent d'avantage de protéines de poids moléculaire élevé. Les protéines flocculantes ont pu être observées sur le gel SDS-PAGE. L'identification de ces protéines par spectrométrie de masse confirmerait d'avantage nos résultats.

**Mots clés :** *Moringa oleifera*, caractérisation moléculaire, SDS-PAGE, dépollution des eaux usées.

## **Molecular characterization of *Moringa oleifera* proteins**

### **Abstract:**

Water constitutes an important element in the human food ration and in the numerous activities dictated by living conditions. *Moringa oleifera* seeds meadows are a very effective natural flocculant for water treatment. This effectiveness comes from the presence of active cationic proteins which act as an adsorbent, coagulant and disinfectant agent. In this study, different treatments were tested in order to evaluate the germinative potential of *Moringa*; scarified seeds, seeds soaked in water for 24 hours, 48 hours and 72 hours, in addition to the control, in order to determine the most effective way to germinate and adapt this miracle tree to the Constantine region. The results showed that seeds that did not undergo any pretreatment germinated first, contrary to previous work. The electrophoresis of total proteins of *Moringa oleifera* allowed the characterization of 8 bands in total for the seeds and 5 others for the leaves. The seeds contain more proteins than the leaves. Protein quantification by the Nanodrop confirms these results. Compared to leaves, seeds contain higher molecular weight proteins. The flocculating proteins could be observed on the SDS-PAGE. The identification of these proteins by mass spectrometry would further confirm our results.

Key words: *Moringa oleifera*, molecular characterization, SDS-PAGE, wastewater remediation.

## التوصيف الجزيئي لبروتينات المورينغا أوليفيرا

### ملخص:

يشكل الماء عنصراً هاماً في غذاء الإنسان وفي الأنشطة العديدة التي تملئها الظروف المعيشية. تعتبر بذور المورينغا أوليفيرا من المواد الطبيعية الفعالة جداً لمعالجة المياه. تأتي هذه الفعالية من وجود البروتينات الكاتيونية النشطة التي تعمل كعامل ممتز ومخثر ومطهر. في هذه الدراسة، تم اختبار علاجات مختلفة من أجل تقييم القدرة الإنبائية للمورينجا؛ بذور مخدوشة، بذور منقوعة في الماء لمدة 24 ساعة، 48 ساعة و72 ساعة، بالإضافة إلى المكافحة، من أجل تحديد الطريقة الأكثر فعالية لإنبات وتطويح هذه الشجرة المعجزة لمنطقة قسنطينة. وأظهرت النتائج أن البذور التي لم تخضع لأي معاملة مسبقة إنبات أولاً، على عكس العمل السابق. سمح الرحلان الكهربائي للبروتينات الكلية لنبات المورينغا أوليفيرا بتوصيف 8 نطاقات إجمالاً للبذور و5 نطاقات أخرى للأوراق. تحتوي البذور على بروتينات أكثر من الأوراق، ويؤكد قياس كمية البروتين بواسطة Nanodrop هذه النتائج. بالمقارنة مع الأوراق، تحتوي البذور على المزيد من البروتينات ذات الوزن الجزيئي العالي. ويمكن ملاحظة البروتينات المتلبدة على هلام SDS-PAGE. إن تحديد هذه البروتينات عن طريق قياس الطيف الكتلي من شأنه أن يؤكد نتائجنا بشكل أكبر.

الكلمات المفتاحية: المورينغا أوليفيرا، التوصيف الجزيئي معالجة مياه الصرف الصحي، SDS-PAGE

## *Remerciement*



Nous remercierons avant tout **ALLAH** tout puissant, de nous avoir donné la force et la volonté de terminer ce Travail.

Nous tenons à remercier d'abord notre encadrant **Mme. KACEM Sandra Nadia** MCB pour avoir encadré et dirigé ce travail et pour sa gentillesse, sa patience et surtout ses judicieux conseils, nous ont permis de réaliser ce travail.

Je remercie Monsieur le Président **BENBELKACEM** et Madame l'examinatrice **HAMMOUDA Dounia**, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir examiner, corriger et juger avec attention mon travail.

A travers ce modeste travail, on tient à remercier l'ensemble des enseignants qui ont contribué de près ou de loin à notre formation, qu'ils retrouvent à travers ces lignes l'expression notre grande reconnaissance.

Nos remerciements vont également à tous qui ont participé de près ou de loin pour que nous arrivions à ce merveilleux instant.

**RANIA ET IMENE**



## DÉDICACE

Avant tout, je tiens à remercier mon **BON DIEU** qui m'a offert le courage et la volonté  
nécessaire  
pour affronter les différentes épreuves de la vie.

Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes qui m'ont soutenue durant sa réalisation :  
**A MES CHERS PARENTS** pour leur bonté par excellence, qui ont toujours été là pour moi, et  
qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance, de tendresse, d'amour et de  
force.

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, et le respect que j'ai toujours eu pour  
vous.

Mes frères **Mohammed Yacine** et **Ahmad Firas**,

Mes sœurs **Manel** et **Oumaima**,

À ma cousine **Hanane**,

À mes **grands-parents** et à ma regrettée grand-mère dont la perte a eu un grand impact sur ma  
vie,

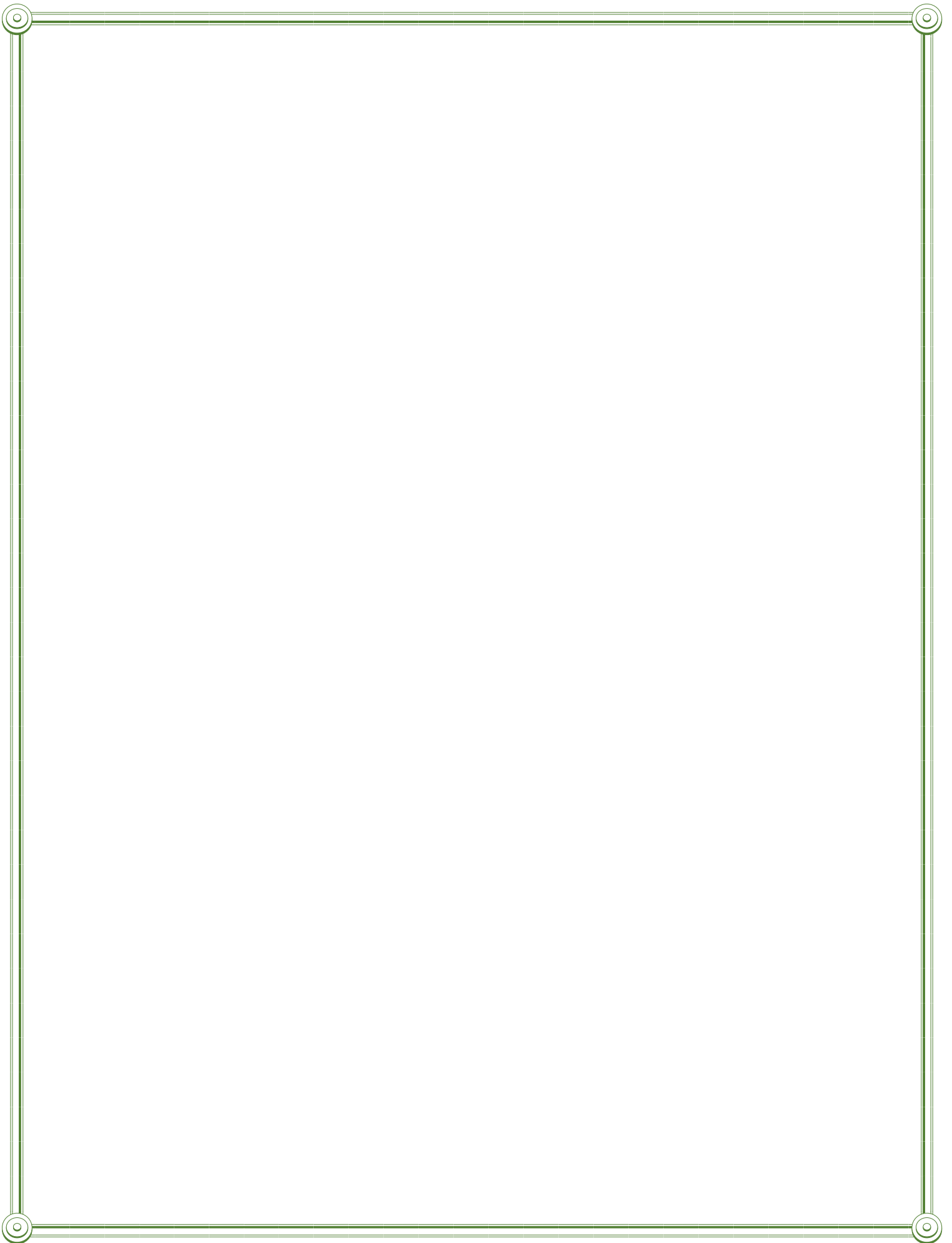
À mes amies **Loubna**, **Leila**, **Zineb**, **Besma** et **Nesrine**,

À toute ma famille « **BADIS** et **ALGMI** » et mes amis,

À ma binôme **Imen** à toute la promo de master biotechnologie et génomique végétales,

Avec tout mon amour et ma reconnaissance sincère,

**BADIS R.**





## DÉDICACE

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Je tiens à remercier **DIEU** pour toute l'énergie qu'il m'a donné durant ces cinq années

الحمد لله

**A MES PARENTS**, en témoignage de ma gratitude pour leur écoute, leur soutien et leurs encouragements dans les moments difficiles, sans vous rien n'aurait été possible, merci pour votre soutien et votre amour.

A ma sœur «**SARA** »et son mari **FATHI** (mon frère préféré), à mes frères «**NAOUFEL** et **YOUNES** » Rabi yahfadkom, à mon neveu que je considère comme mon fils « **YANISS NISSOU**»

A mon binôme **RANIA** pour et toute **sa famille**

Et bien sûr à ma sœur à qui ma mère n'a pas donné naissance mon amie **ASSMA** et son beau-fils **ANES**, merci pour vos encouragements

**BOUSEBOUA I,**



- Liste des abréviations et des acronymes
- Liste des figures
- Liste des tableaux

## INTRODUCTION 1

### Chapitre I : revue bibliographique

|  |    |
|--|----|
| 1. Origine et répartition géographique                                   | 3  |
| 2. Classification taxonomique et appellations du <i>Moringa oleifera</i> | 4  |
| 3. Description botanique du <i>Moringa oleifera</i>                      | 5  |
| 3.1. Arbre   | 5  |
| 3.2. Fleur   | 5  |
| 3.3. Graine  | 6  |
| 4. Ecologie du <i>Moringa oleifera</i>                                   | 7  |
| 5. Valeur nutritionnelle de la plante                                    | 8  |
| 6. Quelques propriétés et utilisations de la plante                      | 10 |
| 6.1. Fabrication du fromage  | 10 |
| 6.2. Propriétés antibactériennes   | 11 |
| 6.3. Propriété anti-inflammatoire et antalgiques                         | 11 |
| 6.4. Propriété anti fongiques  | 11 |
| 6.5. Activité antidiabétique   | 12 |
| 6.6. Traitement de cancers   | 12 |
| 6.7. Utilisation comme engrais biologique                                | 12 |
| 6.8. Utilisation industrielle de l'huile de moringa                      | 13 |
| 7. Traitements des eaux usées par la <i>Moringa oleifera</i>             | 15 |
| 7.1. Définition de la pollution des eaux                                 | 15 |
| 7.2. Méthodes conventionnelles des traitements des eaux usées            | 16 |
| 7.2.1. Traitements physique  | 17 |

## TABLE DE MATIERE

|   |    |
|---|----|
| 7.2.2. Traitement chimique                    | 17 |
| 7.2.3. Traitements biologiques                | 17 |
| 7.3. Traitement des eaux usées par le Moringa | 17 |
| 7.3.1. Agents coagulants                      | 18 |
| 7.3.2. Agent absorbant                        | 18 |
| 7.3.3. Agent désinfectant                     | 18 |

### Chapitre II : Matériel et Méthodes

|  |    |
|--|----|
| 1. Matériel végétatif                                    | 20 |
| 2. Méthodes  | 20 |
| 2.1. Teste germinatif                                    | 20 |
| 2.2. Extraction des protéines du <i>Moringa oleifera</i> | 21 |
| 2.2.1. PREMIER PROTOCOLE D'EXTRACTION (TCA/acétone)      | 21 |
| 2.2.2. DEUXIEME PROTOCOLE D'EXTRACTION                   | 24 |
| 2.3. Electrophorèse des protéines                        | 27 |
| 2.3.1. Principe de la technique SDS-PAGE                 | 27 |
| 2.3.2. Préparation des gels d'électrophorèse             | 27 |
| 2.3.3. La migration                                      | 28 |
| 2.3.4. Révélation des gels                               | 29 |
| 2.3.5. Traitement des résultats                          | 31 |

### Chapitre III : Résultats et discussion

|   |    |
|---|----|
| 1. Germination des graines de <i>Moringa oleifera</i> | 33 |
| 2. Analyse électrophorétique des protéines totales    | 35 |
| 2.1. Premier essai                                    | 35 |
| 2.2. Deuxième essai                                   | 35 |
| Conclusion  | 39 |

## TABLE DE MATIERE

**Références bibliographiques**

**42**

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>APS :</b>            | Persulfate d'ammonium.  |
| <b>BBP :</b>            | Bleu de bromophénol.  |
| <b>C.R.BT :</b>         | Centre de recherche en biotechnologie Constantine.                  |
| <b>DTT :</b>            | Dithiothréitol  |
| <b>EDTA :</b>           | Ethylenediaminetetraacetic acid.                                    |
| <b>GBBV :</b>           | Génétique, biochimie et biotechnologie végétale                     |
| <b>GL :</b>             | Glucosinolates  |
| <b>ITC :</b>            | Isothiocyanates   |
| <b>KDa :</b>            | Kilo Dalton.  |
| <b>MO :</b>             | <i>Moringa oleifera</i>   |
| <b>MO<sub>n</sub> :</b> | Nano-micelle de l'huile de graines de <i>Moringa oleifera</i>       |
| <b>PVP :</b>            | Polyvinylpyrrolidone  |
| <b>SDS-PAGE :</b>       | Sodium Dodécylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.           |
| <b>T % :</b>            | «Concentration totale » Acrylamide + Bisacrylamide (g)/Total x 100. |
| <b>TCA :</b>            | Acide trichloracétique.   |
| <b>TEMED :</b>          | Tétraméthyl-éthylène-diamine.                                       |
| <b>Tris :</b>           | Hydroxyméthyl-aminométhane.   |

# Liste des tableaux

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figure 1</b> : Zone de culture de <i>Moringa oleifera</i>  | <b>03</b> |
| <b>Figure 2</b> : <i>Moringa oleifera</i> , arbre en zone tropicale   | <b>05</b> |
| <b>Figure 3</b> : la fleur de <i>Moringa oleifera</i>   | <b>06</b> |
| <b>Figure 4</b> : Gousses immatures (A), gousses mûres (B)  | <b>06</b> |
| <b>Figure 5</b> : Graines de <i>Moringa oleifera</i>  | <b>07</b> |
| <b>Figure 6</b> : Valeur nutritionnelle de la poudre des feuilles de <i>M. oleifera</i>   | <b>10</b> |
| <b>Figure 7</b> : Les principales utilisations des différents organes de <i>M.</i>  | <b>14</b> |
| <b>Figure 8</b> : les étapes de traitements des eaux usées  | <b>15</b> |
| <b>Figure 9</b> : Eau d'étang non traitée (bouteille à gauche) et traitée avec les graines de <i>Moringa</i>  | <b>18</b> |
| <b>Figure10</b> : Graines de <i>Moringa oleifera</i>  | <b>20</b> |
| <b>Figure11</b> : Mise en place de l'essai de germination des graines de <i>Moringa oleifera</i> (laboratoire de Biochimie, Génétique et Biotechnologie Végétale de l'université Mentouri Constantine1).  | <b>21</b> |
| <b>Figure12</b> : Etapes d'extraction des protéines totale de <i>Moringa oleifera</i> (A : broyage des amandes de M.O dans l'azote liquide ; B : ajout du tampon d'extraction ; C : mettre les échantillons dans le vortex ; D : mettre les échantillons dans la centrifugeuse) | <b>23</b> |
| <b>Figure13</b> : Incubation des échantillons dans le thermomix   | <b>24</b> |
| <b>Figure14</b> : dosage des échantillons dans le nano drop   | <b>25</b> |
| <b>Figure15</b> : Schéma récapitulatif des étapes d'extraction des protéines  | <b>26</b> |
| <b>Figure16</b> : Etape d'électrophorèse des protéines SDS_PAGE (A : montage des plaques et préparation des gels ; B : chargement des gels ; C : migration des gels ; D : coloration des gels)  | <b>30</b> |
| <b>Figure17</b> : Germination des graines de <i>Moringa</i> après 1 mois de culture   | <b>35</b> |
| <b>Figure 18</b> : Dosage des protéines par Nanodrop  | <b>37</b> |
| <b>Figure 19</b> : SDS-PAGE des protéines totales de <i>Moringa oleifera</i> F : feuille, M : marqueur, G : graine  | <b>38</b> |

# Liste des tableaux

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tableau 1 :</b> Classification du <i>Moringa oleifera</i>   | <b>04</b> |
| <b>Tableau 2 :</b> les exigences écologiques de la plante <i>Moringa oleifera</i>                                      | <b>08</b> |
| <b>Tableau 3 :</b> valeurs nutritionnelles de <i>Moringa oleifera</i>  | <b>09</b> |
| <b>Tableau 4 :</b> Délai et taux de germination des graines de <i>Moringa oleifera</i> sous différents prétraitements. | <b>33</b> |

# **INTRODUCTION**

# INTRODUCTION

---

La pollution de l'eau pose un sérieux défi dans le monde actuel. Non seulement c'est une menace pour la santé humaine, mais également pour l'environnement. Les méthodes conventionnelles de dépollution de l'eau, comme le traitement chimique, ont des impacts négatifs sur l'environnement en raison de la production de produits chimiques toxiques et leur élimination.

Des alternatives naturelles aux coagulants et aux désinfectants actuellement utilisés ont été envisagées, y compris les plantes cultivées dont les Capparidaceae, les Papilionaceae et les Moringaceae forment une famille à part entière comprenant un genre (*Moringa*) avec 14 espèces dont *Moringa oleifera* (Hedji et al. 2014). Cet arbre tropical est largement reconnu pour ses propriétés purificatrices. Ses graines contiennent des protéines épuratrices spécifiques qui ont démontré une grande efficacité dans l'élimination des polluants présents dans les eaux usées, tels que les métaux lourds, les agents pathogènes et les composés organiques toxiques. La caractérisation moléculaire de ces protéines permet d'approfondir notre compréhension de leurs propriétés et de leurs mécanismes d'action, ouvrant la voie à des applications plus efficaces dans la dépollution des eaux usées.

La caractérisation moléculaire des protéines épuratrices de *Moringa oleifera* implique l'utilisation de techniques avancées d'analyse des protéines. Parmi ces techniques, la électrophorèse sur gel qui joue un rôle clé en permettant l'identification et la quantification des protéines épuratrices. Plusieurs études ont déjà exploré la caractérisation moléculaire des protéines épuratrices de *moringa oleifera* et ont fourni des informations cruciales sur leur structure, leur fonction et leurs mécanismes d'action dans la dépollution des eaux usées.

A ce jour deux composants protéiques principaux ont été signalé : la protéine floculante et antibactérienne (MO2.1) et la protéine antifongique (Mo-CBP3) qui est la seule protéine dont la structure cristalline est disponible (Moulin et al. 2019, Mazaoui S.2020).

A travers cette étude, nous essayons de contribuer à l'étude de quelques protéines coagulantes de *Moringa oleifera*. Ce mémoire s'articule autour de trois chapitres :

- ✚ Le **premier chapitre** abordera les caractéristiques générales de la plante et ses divers domaines d'application principalement dans le traitement des eaux usées.



# INTRODUCTION

---

- ✚ Le **deuxième chapitre** est consacré à la représentation du milieu physique d'étude, ainsi que les méthodes d'analyses utilisées au laboratoire.
- ✚ Le **troisième chapitre** concerne la présentation des résultats obtenus et la discussion.

***REVUE BIBLIOGRAPHIQUE***

### 1. Origine et répartition géographique :

*M. oleifera* trouve ses origines dans les régions d'Agra et d'Oudh, situées au nord-est de l'Inde, au sud de la chaîne de montagnes de l'Himalaya. Au cours du début du 20<sup>ème</sup> siècle, il a été introduit en Afrique de l'Est grâce aux importants échanges commerciaux et maritimes de l'époque (Foidl, 2001).

L'arbre est aujourd'hui cultivé dans plus de cinquante pays tropicaux et subtropicaux, répartis sur trois continents comme l'Afrique, l'Arabie, l'Asie du Sud-Est, les îles du Pacifique, et l'Amérique du Sud. Depuis son introduction dans ces pays, cette espèce a été intégrée aux traditions locales, notamment dans le domaine de la médecine traditionnelle et de l'alimentation (Figure1).

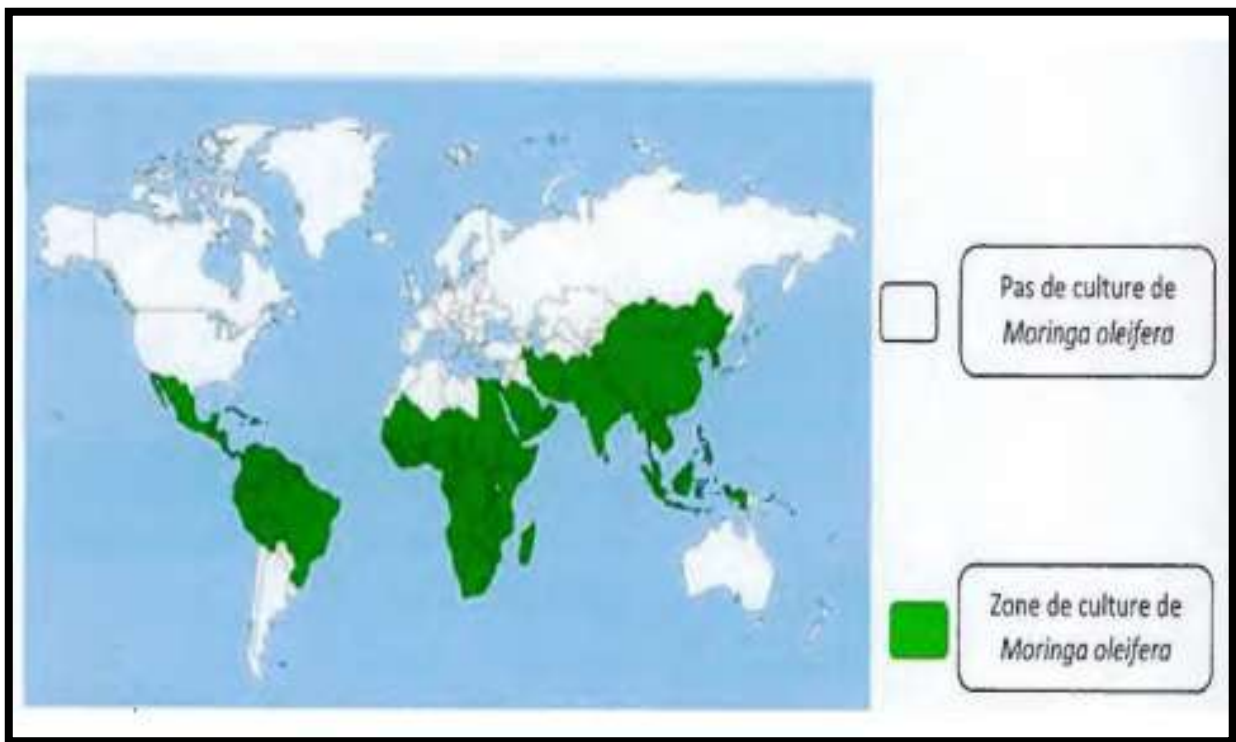


Figure 1: Zone de culture de *Moringa oleifera* (Rongead, 2014)

## 2. Classification taxonomique et appellations du *Moringa oleifera*

La *Moringa oleifera* est une espèce appartenant au genre *Moringa*, situé dans la famille des Moringaceae. Cette famille compte plus de 80 espèces réparties dans environ 13 genres.

Le genre *Moringa* comprend pour sa part 13 espèces, dont la *Moringa oleifera* est la plus répandue et la plus cultivée.

**Tableau 1 : Classification du *Moringa oleifera* (Laleye et al, 2015)**

| Règne              | Végétal                  |
|--------------------|--------------------------|
| Embranchement      | Spermaphytes             |
| Sous-embranchement | Angiospermes             |
| Classe             | Dicotylédones            |
| Sous-Classe        | Dillenida                |
| Ordre              | Capparidales             |
| Famille            | Moringaceae              |
| Genre              | <i>Moringa</i>           |
| Espèce             | <i>Moringa Oleifera.</i> |

*Moringa oleifera* est connue sous les noms d'arbre de ben ou d'arbre miracle en raison des nombreuses utilisations médicinales et nutritionnelles que l'on peut en faire. C'est un arbre qui est connu sous diverses appellations. En Afrique francophone, par exemple, le nom le plus général est nébéday que l'on retrouve plus ou moins déformé dans l'expression anglaise « Never die » qui veut dire ne meurt jamais. En Inde, il est appelé Drumstick pour rappeler la forme du fruit qui ressemble à une baguette (Pousset, 1999). Au Burkina Faso, le nom varie en fonction des ethnies, il est appelé « Arzantiiga » en moré, « Arzina yiri » en dioula, « Obgnukuon » en dagara. Toutes ces appellations tendent à montrer les qualités nutritionnelles miraculeuses de l'arbre.

### 3. Description botanique du *Moringa oleifera*

#### 3.1. Arbre :

*Moringa* est un arbre pérenne, à croissance rapide, qui peut atteindre 7 à 12 mètres de hauteur (Derdour, 2019).



**Figure 2 :** *Moringa oleifera*, arbre en zone tropicale (Cutler, 2016)

#### 3.2. Fleur :

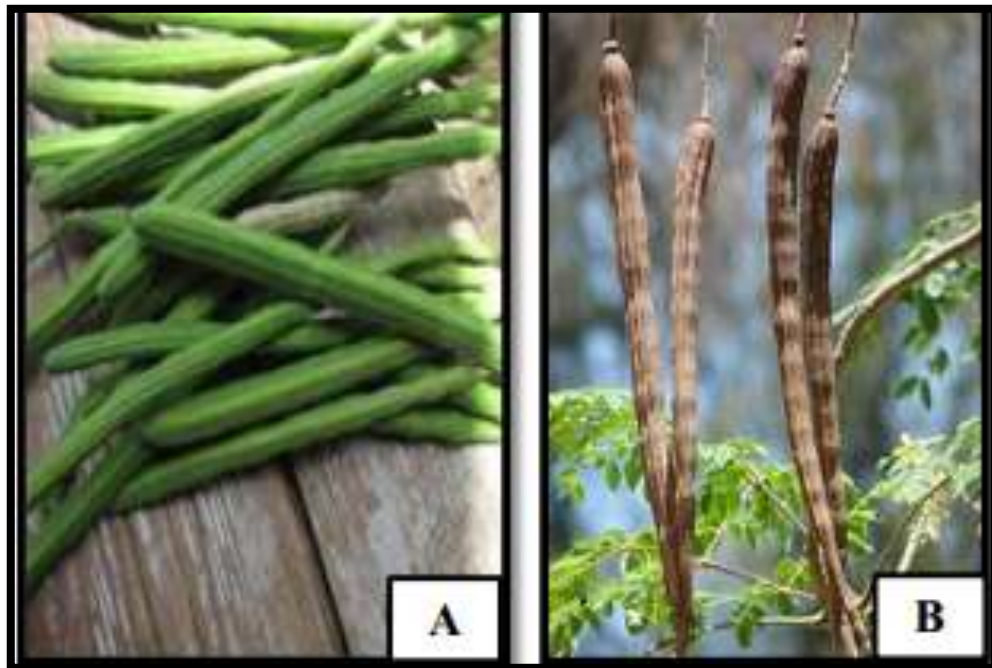
La fleur de *Moringa oleifera* est de couleur blanche et a une forme tubulaire avec cinq pétales. Elle se présente en grappes pendantes et dégage un parfum agréable. Les fleurs sont riches en pollen et attirent les abeilles et autres insectes pour la pollinisation. (Fuglie, 2001)



**Figure 3 :** la fleur de *Moringa oleifera* (Cutler, 2016)

### 3.3.Graine :

Le fruit de *Moringa oleifera* est une gousse de forme allongée et cylindrique, qui peut mesurer jusqu'à 45 cm de longueur. Les gousses contiennent des graines de forme ovale, mesurant environ 1 cm de longueur.



**Figure 4 :** Gousses immatures (A), gousses mûres (B) (Anwar *et al*, 2007 ; Bourai et Guelmani–Ziani 2015).

La graine du *Moringa oleifera* est de forme ovale et mesure environ 1 cm de longueur. Elle est de couleur brun clair et a une surface lisse. La graine est entourée d'une fine couche d'enveloppe qui peut être retirée facilement. Les graines sont riches en protéines, en vitamines et en minéraux et ont plusieurs utilisations, notamment pour produire de l'huile comestible, des compléments alimentaires et des traitements médicaux (Anwar, 2007)



**Figure 5 :** Graines de *Moringa oleifera* (Cutler, 2016).

#### **4. Ecologie du *Moringa oleifera***

Le *Moringa oleifera* présente une importante valeur écologique en raison de sa capacité à s'adapter à différents climats et sols, ainsi que de sa résilience face aux conditions environnementales défavorables. Il est considéré comme une plante à croissance rapide et à haut rendement, nécessitant moins d'eau que d'autres cultures. De plus, le *Moringa oleifera* est reconnu pour sa capacité à fixer l'azote atmosphérique dans le sol, ce qui améliore la fertilité et réduit la dépendance aux engrais chimiques. En raison de son système racinaire profond, il contribue également à la stabilisation des sols et à la prévention de l'érosion. Ces caractéristiques font du *Moringa oleifera* une plante prometteuse pour la restauration des sols dégradés et la conservation des ressources naturelles (Marcu et al, 2012).

**Tableau 2** : les exigences écologiques de la plante *Moringa oleifera* (Fuglie, 2001)

| FACTEUR  | EXIGENCE  |
|----------|---|
| CLIMAT   | Tropical à subtropical, températures moyennes de 25-35°C, précipitations annuelles de 600-1200 mm                       |
| SOL      | Bien drainé, fertile, pH de 6,0-9,0   |
| LUMIERE  | Plein soleil à mi-ombre   |
| PH       | Le Moringa tolère une grande plage de pH (de 5 à 9), et pousse assez bien dans les milieux alcalins jusqu'à un pH de 9. |
| EAU      | Besoins en eau modérés, tolérance à la sécheresse   |
| HUMIDITE | Tolérance à l'humidité élevée   |

### 5. Valeur nutritionnelle de la plante :

*M. oleifera* se caractérise par une forte teneur en nutriments, en antioxydants et en composés phytochimiques (**Tableau 3**) et en particulier en  $\beta$ -carotène, le fer et les facteurs antinutritionnels. Les feuilles de *M. oleifera* sont un légume de bonne qualité nutritionnelle et sont l'un des meilleurs légumes tropicaux (**Yang et al, 2008**).

Un grand nombre de rapports sur les qualités nutritionnelles de Moringa existent maintenant à la fois dans le domaine scientifique et la littérature populaire. Ses feuilles contiennent plus de vitamine A que les carottes, plus de calcium que le lait, plus de fer que les épinards, plus de vitamine C que les oranges et plus de potassium que les bananes (**Figure6**). La qualité des protéines de Moringa rivalise avec celle du lait et des œufs. En fait, les propriétés nutritionnelles de cette plante sont maintenant bien connues et il semble de ne pas douter que les bénéfices substantiels pour la santé soient réalisés (**Fuglie, 1999**).



**Tableau 3** : valeurs nutritionnelle de la plante *M. oleifera* (Données pour 100 g des feuilles séchées **Broin, 2005**).

| <b>Minéraux (mg)</b> |       | <b>Acides aminés (mg)</b> |       |
|----------------------|-------|---------------------------|-------|
| Calcium              | 2100  | Arginines                 | 1600  |
| Cuivre               | 1     | Histidines                | 530   |
| Fer                  | 27    | Leucines                  | 2050  |
| Potassium            | 1300  | Lysines                   | 1200  |
| Magnésium            | 405   | Méthionines               | 370   |
| Phosphore            | 310   | Phénylalanines            | 1400  |
| Manganèse            | 8     | Thréonine                 | 1080  |
| Sélénium             | 2,6   | Tryptophane               | 580   |
| Zinc                 | 2,6   | Valine                    | 1400  |
| Molybdène            | 0,5   | Isoleucine                | 1140  |
| Sodium               | 100   | <b>Vitamines</b>          |       |
| <b>Acides gras</b>   |       | Vitamine A (mg)           | 14300 |
| C16:0                | 530   | Vitamine B (mg)           | 850   |
| C18:0                | 70    | Vitamines B1 (mg)         | 264   |
| C18:1                | 60    | Vitamines B2 (mg)         | 205   |
| C18:2                | 170   | Vitamines C (mg)          | 220   |
| C18:3                | 11400 | Vitamines E (mg)          | 130   |



**Figure 6 :** Valeur nutritionnelle de la poudre des feuilles de *M. oleifera* (Fuglie, 2002)

## 6. Quelques propriétés et utilisations de la plante

### 6.1. Fabrication du fromage

L'utilisation potentielle de *Moringa oleifera* comme agent de coagulation de différents types de lait (lait entier, écrémé et lait de soja) a été étudiée par **Sánchez-Muñoz et al, (2017)**.

L'extrait de graines de *Moringa oleifera* a montré une forte activité de coagulation du lait ; cet extrait de graines est composé de substances protéiques, il génère une activité de coagulation du lait appropriée pour la fabrication du fromage, il peut être utilisé comme source potentielle d'un substitut de présure, puisque cet extrait de la graine a démontré une forte activité de coagulation du lait sur les laits entiers, écrémés et de soja. Cette étude a conclu que l'extrait de graines de *Moringa oleifera* peut être utilisé avec succès pour la fabrication du fromage avec des avantages nutritionnels (**Sánchez-Muñoz 2017**).

### 6.2. Propriétés antibactériennes :

Les graines de *Moringa oleifera* peuvent fournir une thérapie alternative pour les maladies causées par des bactéries multi résistantes. Une étude réalisée par **Albuquerque et al, (2017)**, visait à évaluer la bio activité *in vitro* des extraits de graines de *Moringa oleifera* contre des vibrions isolés de la crevette marine *Litopenaeus vannamei*. Les bactéries du genre *Vibrio* sont omniprésentes dans le milieu marin et font partie du microbiote des invertébrés marins. Certaines espèces sont reconnues comme des pathogènes humains présentant un profil antimicrobien virulent et multi résistant, souvent associés à des maladies telles que le choléra et la gastro-entérite aiguë. Les extraits de graines de *Moringa oleifera* sont bioactifs contre 92% des souches.

### 6.3. Propriété anti-inflammatoire et antalgiques

Les graines de *Moringa* ont été décrites comme possédant des propriétés anti-inflammatoires, les composés photochimiques dérivés des graines associés à ces bios activités comprennent les glucosinolates (GL), glucosinolates (GL), nitriles, carbamates et thiocarbamates. Les GLs stockés dans les graines, subissent une conversion enzymatique par l'enzyme myrosinase (une  $\beta$ -thioglycosidase), formant des ITC, ces ITC sont connus pour leurs effets anti-inflammatoires (**Jaja-Chimedza et al, 2017**)

### 6.4. Propriété anti fongiques :

La *Moringa oleifera*-Chiting Bending Protein 3(Mo-CBP3), est une protéine produite par les graines de *Moringa oleifera* qui se lie à la chitine et inhibe la germination et la croissance mycélienne de champignons phytopathogènes. Cette protéine est hautement thermostable et résistante aux changements de pH, et peut donc être utile dans le développement de nouveaux médicaments antifongiques (**Freire et al, 2015**). Une autre *Moringa oleifera*-Chiting Bending Protein supplémentaire, appelée Mo-CBP2, qui présente une activité antifongique contre les espèces de *Candida*, par sa capacité à augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire et à induire la production endogène d'espèces réactives de l'oxygène chez *Candida albicans* (**Neto et al, 2017**).

### 6.5. Activité antidiabétique

Une étude réalisée par **Al-Malki et El Rabey (2015)**, visait à tester l'effet améliorateur de poudre de graines de Moringa sur le diabète de type I et le traitement de la néphropathie diabétique de rats mâles diabétiques induits par la streptozotocine.

Le traitement des rats diabétiques avec 50 ou 100 mg de poudre de Moringa par kg de poids corporel a amélioré les niveaux de tous les paramètres approchant les valeurs témoins négatives et a rétabli l'histologie normale du rein et du pancréas par rapport au groupe témoin diabétique positif qui a montré une augmentation du peroxyde de lipide et de l'IL-6. Ce groupe a révélé également que les immunoglobulines (IgA, IgG), la glycémie à jeun et l'hémoglobine glycosylée (HbA1c) ont également augmenté à la suite du diabète chez les rats. En outre, les fonctions rénales et les niveaux de potassium et de sodium ont été augmentés en signe de néphropathie diabétique. L'analyse de l'urine a également montré une glycosurie et une augmentation des taux de potassium, de sodium, de créatinine, d'acide urique et d'albumine. Les tissus du rein et du pancréas présentaient également une altération pathologique par rapport au groupe témoin négatif et le groupe traité par la poudre des graines de Moringa.

### 6.6. Traitement de cancers

Une étude réalisée par **Abd-Rabou et al, (2016)**, visait à explorer les impacts anticancéreux de la nano-micelle de l'huile de graine de *Moringa oleifera* en étudiant si elle favorise la mort cellulaire médiée par l'apoptose mitochondriale sur différentes lignées cellulaires cancéreuses in vitro. L'étude a montré que la nano-micelle de l'huile de graines de *Moringa oleifera* (MOn) a déclenché la cytotoxicité du cancer colorectal par un dysfonctionnement et l'apoptose mitochondriale, tout en épargnant les cellules normales avec un effet cytotoxique minime. Cette étude a conclu que la nano-micelle de l'huile de graines de *Moringa oleifera* (MOn) peut fournir une nouvelle approche thérapeutique pour les cancers colorectaux et mammaires via l'apoptose mitochondriale, tout en épargnant les cellules normales.

### 6.7. Utilisation comme engrais biologique

Une étude portant sur l'utilisation et la bio-décomposition du tourteau de *Moringa oleifera* comme engrais biologique a été effectuée par **Emmanuel et al, (2011)** sur une ferme de maïs pendant trois saisons de culture, Cette étude a montré que les engrais organiques dérivés de la graine de *Moringa Oleifera* peuvent augmenter l'aération du sol et la richesse des invertébrés

indigènes, des arthropodes bénéfiques, des vers de terre, symbiotes et microbes et jouent un rôle important pour la fertilisation du sol en améliorant significativement les éléments nutritifs de celui-ci et conduit à une amélioration de la croissance des plantes dans un court laps de temps, en comparaison avec l'utilisation des matières organiques provenant des déjections animales et du compost végétal qui nécessitent de longues périodes de décomposition.

### **6.8. Utilisation industrielle de l'huile de moringa**

Les graines de *Moringa oleifera* sont du type oléagineuse elles renferment 42% d'huile dont le profil d'acides gras comporte 70% d'acide oléique proche de l'huile d'olive 72%. La teneur en acides gras saturés et insaturés est respectivement de 13% et 82% et celle en acides gras libres varie de 0,5 à 3% (**Foidl et al, 2001**).

L'huile est utilisée comme lubrifiant dans la machinerie fine, comme l'horlogerie, pour sa faible tendance à se détériorer et devenir rance et collante. Elle est également utilisable comme huile de cuisine. Grâce à sa capacité à absorber et à retenir les substances volatiles, elle est également intéressante dans l'industrie des parfums pour stabiliser les senteurs. La teneur en acides gras libres varie de 0,5 à 3%. L'huile des graines de Moringa contient environ 13% d'acides gras saturés et 82% d'acides gras insaturés (**Foidl et al, 2001**).

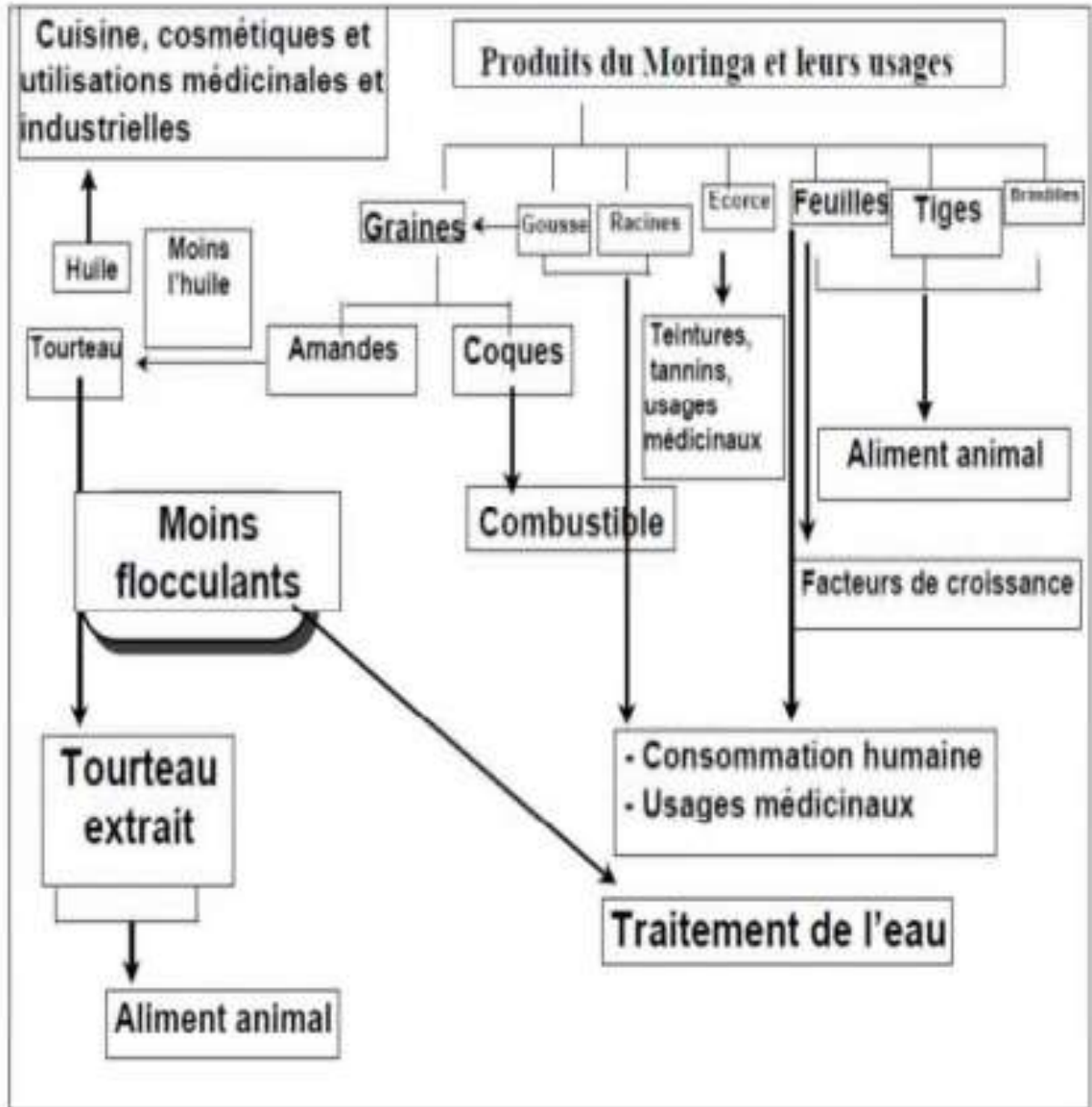


Figure 7 : Les principales utilisations des différents organes de *M. oleifera* (Foidl et al, 2001).

## 7. Traitements des eaux usées par la *Moringa oleifera*

### 7.1. Définition de la pollution des eaux

La pollution de l'eau se réfère à toute altération chimique, physique ou biologique qui perturbe un écosystème aquatique. Elle se manifeste par la présence de corps étrangers tels que des micro-organismes, des produits chimiques ou des déchets industriels, qui contaminent l'eau. Ces altérations peuvent résulter de déversements, d'écoulements, de rejets ou de dépôts directs ou indirects de substances de diverses natures. En général, la pollution de l'eau peut entraîner une détérioration de ses caractéristiques chimiques, biologiques ou bactériologiques (Manceur, 2016).

### 7.2. Méthodes conventionnelles des traitements des eaux usées

Le traitement des eaux usées est l'ensemble des procédés visant à dépolluer l'eau usée avant son retour dans le milieu naturel ou sa réutilisation. Il comporte plusieurs étapes (figure 9).

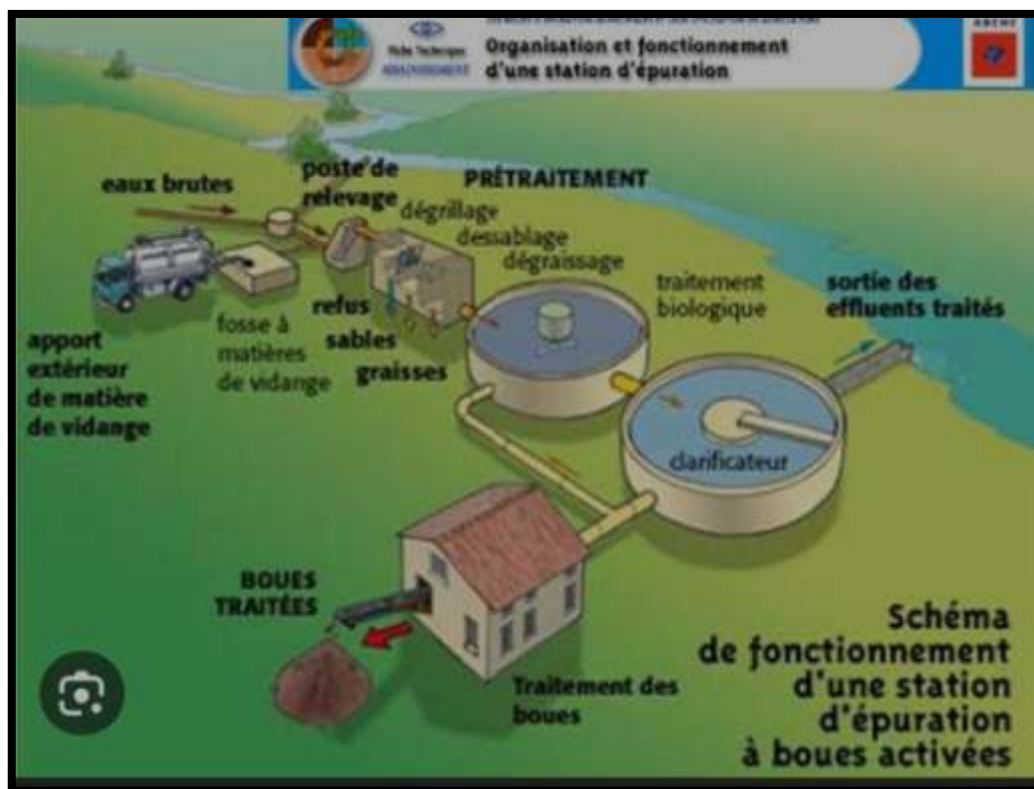


Figure 8 : les étapes de traitements des eaux usées (Cottard, 2007).

### 7.2.1 Traitements physique :

Les traitements physiques sont nombreux par la filtration, la décantation, la coagulation, et la floculation.

- **Filtration** : Il existe deux types de filtration distincts dans le processus de purification de l'eau :

**a- Filtration de surface** : Elle se caractérise par l'utilisation d'un réseau poreux dont la taille des mailles est inférieure à celle des particules à retenir. Cela permet aux particules de s'accumuler à la surface du matériau filtrant, formant ainsi une couche de déchets (Manceur, 2016).

**b. Filtration en profondeur** : Ce type de filtration repose sur des phénomènes physiques plus subtils. Dans ce cas, la taille des mailles du matériau poreux est plus grande que celle des particules à retenir. Cependant, grâce à des mécanismes internes spécifiques, les particules parviennent à être piégées et retenues à l'intérieur du matériau filtrant, entraînant ainsi son encrassement interne (Manceur, 2016).

- **La décantation** : La décantation est un principe utilisé pour éliminer les particules en suspension dans l'eau en exploitant le phénomène de gravité. La vitesse de décantation dépend de la vitesse de chute des particules, qui est influencée par plusieurs paramètres tels que leur taille et leur diversité. L'accélération de ce processus peut être réalisée par centrifugation, où une force centrifuge est appliquée pour accélérer la sédimentation des particules (Manceur, 2016).
- **La coagulation** : Le principe de la coagulation et de la floculation consiste à neutraliser les charges électriques des particules en suspension dans l'eau, ce qui maintient leur état colloïdal. Cela est réalisé en ajoutant des sels minéraux cationiques ou des poly-électrolytes organiques. En neutralisant les charges, les particules perdent leur répulsion électrostatique et commencent à s'attirer mutuellement. Ce processus entraîne la formation de floccs, où les particules agrégées se regroupent. Par la suite, ces floccs peuvent être séparés de l'eau par décantation, où ils se déposent au fond du récipient de traitement (Manceur, 2016).



### 7.2.2 Traitement chimique :

Les traitements chimiques ont pour objectifs de transformer certains produits réputés polluants en d'autres produits moins polluants, ou encore en d'autres produits tout aussi polluants mais d'élimination plus facile. Il existe beaucoup de procédés chimiques, parmi les plus utilisés on distingue :

- 1- **La neutralisation** : C'est l'ajustement du pH à la neutralité. Ceci peut se faire par addition de substances acides ou basiques, ainsi que par un mélange effluent acide-effluent alcalin dans la mesure où ce type de mélange ne provoque pas de réaction secondaire nuisibles (Manceur, 2016).
- 2- **L'oxydoréduction** : Les réactions d'oxydoréduction sont intéressantes dans la mesure où elles permettent la formation de composés non toxiques ou facilement séparables sous forme de gaz de précipitation (Manceur, 2016).

**Exemple** : par oxydation des cyanures en cyanates et même en CO<sub>2</sub>.

### 7.2.3 Traitements biologiques :

La lutte biologique est essentiellement utilisée pour le traitement des eaux usées d'origine organique, en particulier le traitement de la pollution urbaine (Manceur, 2016).

Le traitement est basé sur la croissance des microorganismes (notamment les bactéries) aux dépens des matières organiques biodégradables. Les bactéries utilisées exigent un apport permanent d'oxygène. Les eaux à épurer ruissellent sur un matériau poreux qui sert de support aux bactéries, il se forme ainsi un film de bactérie au niveau duquel s'opère l'assimilation des substances indésirables contenues dans l'eau (Manceur, 2016).

## 7.3. Traitement des eaux usées par le Moringa

Une littérature scientifique a révélé l'énorme utilité des extraits de graines de *Moringa oleifera* pour le traitement des eaux, en tant que adsorbant, coagulant et désinfectant (Frah et Bouzad 2018).

### 7.3.1. Agents coagulants

Il a été prouvé que *Moringa oleifera* est le meilleur coagulant naturel encore découvert, qui peut en effet, remplacer les flocculants minéraux, tels que le sulfate d'alumine, qui est

largement utilisé dans le monde entier (Vilaseca et al, 2014), une propriété qui permet de traiter l'eau de boisson, les eaux usées et les effluents d'usines (Aruna et Srilatha 2012).

### 7.3.2. Agent absorbant

Parmi les polluants chimiques, les métaux lourds sont considérés comme les plus dangereux en raison de leur toxicité pour l'homme (Nand et al, 2012). Des études ont démontré que les graines de *Moringa oleifera* peuvent être utilisées pour réduire les concentrations de métaux tels que le fer, le cuivre, le zinc, l'aluminium, le plomb et le magnésium dans les eaux brutes (Jacques et al, 2007).

Selon les recherches menées par Nand et al, (2012), les graines de Moringa utilisent un mécanisme de coagulation électrostatique pour éliminer les métaux lourds. Ce mécanisme implique l'adsorption et la neutralisation des protéines chargées positivement présentes dans les graines de Moringa. Ces protéines attirent les impuretés chargées négativement dans l'eau, formant ainsi des floccs qui peuvent être ensuite éliminés.

### 7.3.3. Agent désinfectant

La poudre du graine de *Moringa oleifera* a montré une forte activité antibactérienne contre les souches bactériennes telles que : Staphylococcus, coliformes et *Escherichia coli* (Ngandjui 2019) et aussi contre les champignons et les cyanobactéries (Frah et Bouzad 2018).



**Figure 9** : Eau d'étang non traitée (bouteille à gauche) et traitée avec les graines de Moringa (Fahey, 2005)



# **MATERIEL ET METHODES**

## 1. Matériel végétatif

Les graines de *Moringa oleifera* proviennent du sud d'Algérie, wilaya de Touggourt, elles ont été récoltées au mois de novembre 2022 (**Figure.10**)



**Figure 10** : Graines de *Moringa oleifera*

## 2. Méthodes

### 2.1 Teste germinatif

La première partie de ce travail a été réalisée au niveau du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV) (Université des Frères Mentouri Constantine1).

Ce travail consiste à déterminer la méthode de prétraitement la plus efficace pour l'amélioration du potentiel germinatif des graines de *Moringa oleifera* et étudier la possibilité d'adaptation de cette plante dans la région de Constantine.

Les graines de *Moringa oleifera* ont été soumises à six types de prétraitements différents :

- **Le premier groupe** : le contrôle.
- **Le deuxième groupe** : graines scarifiées pré-germées au froid pendant 48 heures,
- **Le troisième groupe** : graines scarifiées pré-germées à température ambiante,

- **Le quatrième groupe** : graines pré-germées au froid pendant 24 heures
- **Le cinquième groupe** : graines pré-germées au froid pendant 48 heures
- **Le sixième groupe** : graines pré-germées au froid pendant 72 heures



**Figure 11** : Mise en place de l'essai de germination des graines de *Moringa oleifera* (laboratoire de Biochimie, Génétique et Biotechnologie Végétale de l'université Mentouri Constantine1).

## 2.2. Extraction des protéines du *Moringa oleifera*

La deuxième partie de ce travail, a été réalisée au niveau du Centre de Recherche de Biotechnologie (CRBT) (Ali Mendjli Constantine) et consiste à mettre au point un protocole d'extraction des protéines du *Moringa oleifera* à partir des feuilles et des graines ; nous avons adopté deux protocoles différents.

**2.2.1 PREMIER PROTOCOLE D'EXTRACTION (TCA/acétone)**

Les protéines ont été extraites à partir des graines comme suit :

- Broyer 10 graines dans de l'azote liquide dans un mortier et un pilon pré-refroidis pour obtenir une poudre fine.
- Remettre en suspension dans 10 ml de TCA froid (10 %) dans de l'acétone avec 0,07 % de DTT et transférer dans des tubes de 2 ml.
- Vortexer soigneusement pendant 30 secondes,
- Mettre à -20 °C pendant 30 à 60 min
- Centrifuger 5 minutes à 10 000 g (4 °C), jeter le surnageant.
- Laver 2 fois avec de l'acétone froide
- Centrifuger à 10 000 g pendant 3 min à 4 °C, jeter le surnageant.
- Sécher le pellet (à température ambiante ou sous vide) et poursuivre ou conserver à -80 °C



**Figure 12** : Etapes d'extraction des protéines totale de *Moringa oleifera* (**A** : broyage des amandes de M.O dans l'azote liquide ; **B** : ajout du tampon d'extraction ; **C** : mettre les échantillons dans le vortex ; **D** : mettre les échantillons dans la centrifugeuse)



### Solubilisation des protéines

Resolubiliser le culot dans 200  $\mu$ l de tampon (NaCl 150 mM, Tris 10 mM, Triton X-100 1%), cette étape doit être effectué pendant 1h à 8°C dans un thermo mixeur à 700rpm.



**Figure13:** Incubation des échantillons dans le thermomixe.

### 2.2.2 DEUXIEME PROTOCOLE D'EXTRACTION

Nous avons tenté ce protocole sur les graines et les feuilles de Moringa comme décrit ci-dessous :

- Broyer 2g de matériel végétal dans de l'azote liquide
- Dans chacune des poudres en ajoute le tampon NaCl 0,1 M pH =8 à 1g
- Agiter pendant 30 min par un mixeur
- Centrifuger pendant 30 min à 4C°
- Récupérer le surnageant dans des tubes de 2ml puis on dose par Nano drope
- Mettre les tubes dans un bain-Marie pendant 10 min.
- Lancer l'électrophorèse par sds page



**Figure 14:** dosage des échantillons dans le nano drop

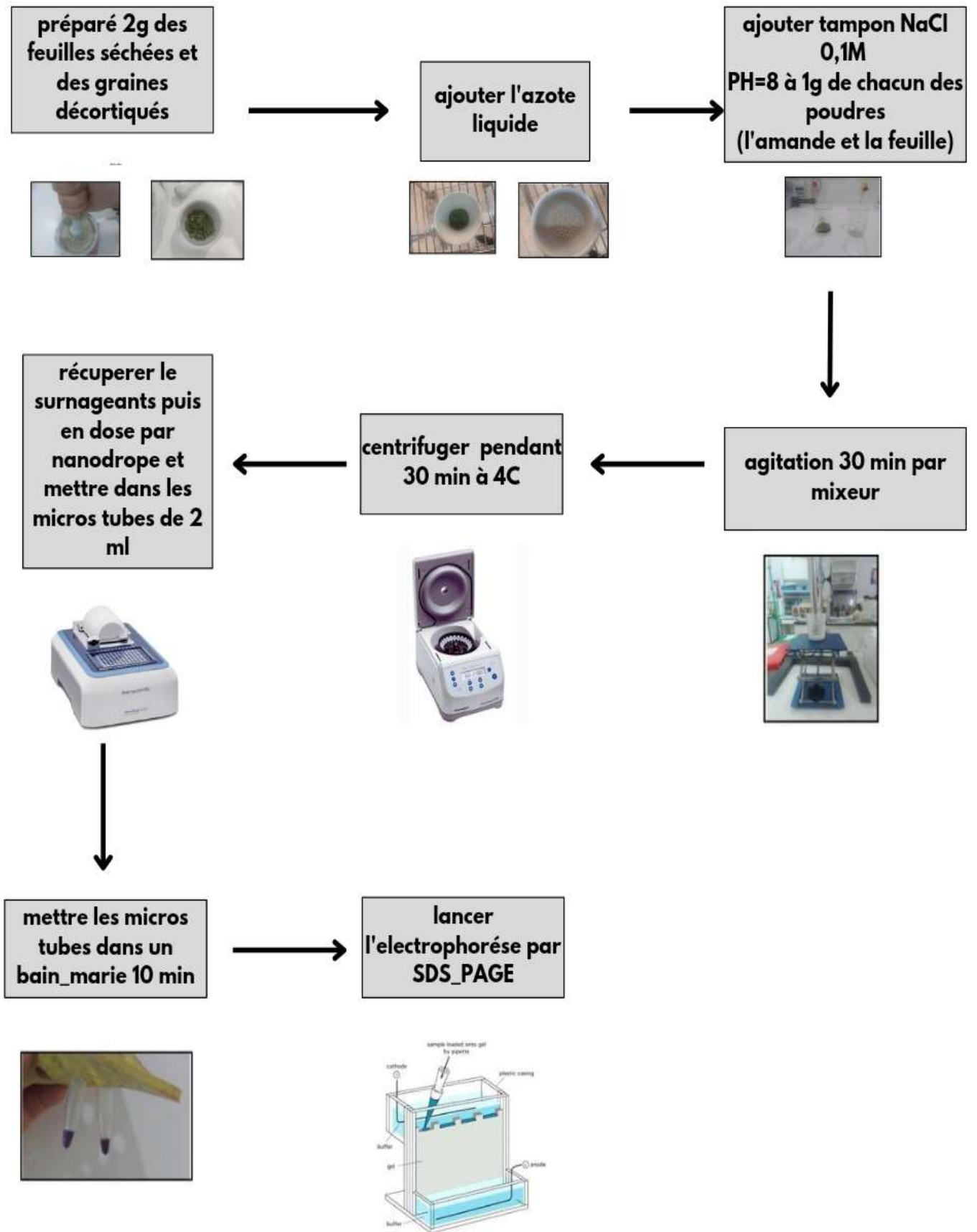


Figure15 : Schéma récapitulatif des étapes d'extraction des protéines.

## 2.3. Electrophorèse des protéines

### 2.3.1 Principe de la technique SDS-PAGE

Les protéines sont des molécules qui ont un rôle dans la structure et la fonction de la cellule, on peut les isoler, les analyser et les étudier. La séparation des protéines présente dans notre étude est faite à l'aide d'un gel SDS-PAGE permettant une séparation des protéines dans le gel selon leur poids moléculaire. La technique électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de SDS est réalisée selon la méthode de **Laemmli, (1970)**.

Une variante de cette technique consiste à utiliser du SDS (Sodium Dodécylsulfate) qui est un détergent anionique fort. Il a la propriété de défaire la structure spatiale en se fixant sur les protéines et de les charger de la même façon permettant ainsi de les séparer uniquement en fonction de leur masse moléculaire. Il donne la charge négative aux protéines (aux chaînes de polypeptides) qui permet la migration des protéines vers l'anode (**Dicko, 2006**).

Avant de procéder à la dénaturation des protéines avec du SDS, on utilise un agent réducteur, le  $\beta$ -mercaptoéthanol qui réduit les ponts désulfuriques des protéines, les rendant ainsi sous forme monomérique. Le  $\beta$ -mercaptoéthanol coupe et casse les liaisons et les ponts désulfuriques (on peut le remplacer par le DTT). L'acétone fait descendre les protéines au bas et solubilise les molécules organiques comme les acides gras ;...etc. Cette technique permet de déterminer le poids moléculaire des sous unités formant une protéine, et de se rendre compte du degré de purification atteint à chaque étape (**Annexe. 02**) (**Jangpromma et al, 2007**).

### 2.3.2 Préparation des gels d'électrophorèse

Dans la méthode de séparation par **SDS-PAGE** deux gels sont préparés :

Un gel de **séparation** qui permet de fractionner les différentes protéines et les sous-unités protéiques selon leurs poids moléculaires et un gel de **concentration** permettant de retenir les impuretés et de tasser les protéines.

#### ❖ Le gel de séparation (running gel) :

La concentration finale d'acrylamide qui a été choisie est de 15 % .Ce gel est constitué d'Acrylamide Bis 30% (p/v), de Tris Hcl à pH=8.8, de SDS à 10 % (p/v) et d'eau distillée.

La réaction de polyacrylamide est catalysée par l'ammonium persulfate (APS) à 10 % (p/v) et le TEMED (**Annexe.01**)

On prépare le gel en respectant les mesures et en travaillant en continuité. La polymérisation de ces constituants est catalysée par (APS) et le TEMED, qui sont ajoutés en derniers. On applique le remplissage du gel par une seringue en plaquant sa queue contre la paroi de la première plaque, et on verse doucement le gel afin d'éviter la formation des bulles d'air, on s'arrête au niveau marqué (4cm), ce niveau sera rempli par le gel de concentration.

On applique une fine couche de butanol tout au long du gel, à l'aide d'une seringue, le butanol aplatira le gel et fera une barrière contre l'air pour accélérer la polymérisation qui prendra 30 à 45 min, et éliminera les bulles d'air à la surface. Quand le gel se polymérise, on verse le butanol et on rince 3 fois à l'eau distillée.

#### ❖ Le gel de concentration (stacking gel) :

La concentration finale d'acrylamide choisie est de 4 %, ce gel et le gel de séparation, ont une même constitution avec pour seule différence le niveau du Tris HCl qui a un pH de 6,8. Le gel est déposé sur le gel de séparation, les peignes doivent être bien centrés entre les plaques et sans créer de bulles. Le gel prend effet après 45 à 60 minutes, les peignes sont retirés soigneusement pour ne pas détériorer les puits. Enfin, le tampon est versé dans les puits et on fait les dépôts (**Annexe.03**)

### 2.3.3 La migration

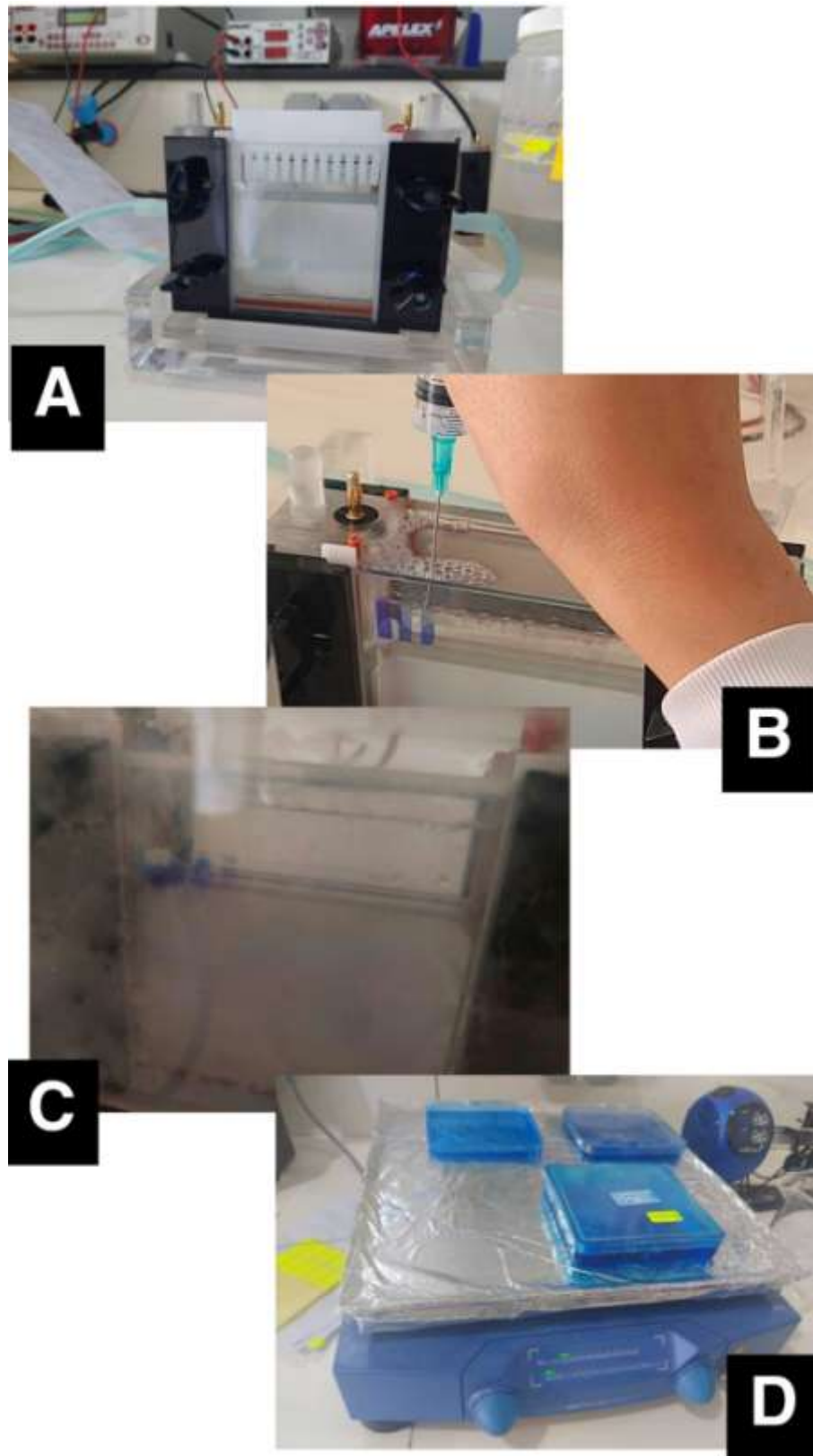
Après le dépôt des différents échantillons, la cuve d'électrophorèse (bac inférieure) est remplie avec un volume suffisant de tampon de migration, composé de glycine, de Tris et de SDS (**Annexe.01**).

Ensuite, le bac supérieur situé entre les deux plaques (bien serré contre les joints pour éviter les fuites) est rempli lui aussi avec le même tampon jusqu'à ce que les faces supérieures des gels soient immergées. Cette dernière placée dans la cuve d'électrophorèse pour que les faces inférieures des gels plongent dans le tampon. Enfin, la cuve est fermée et reliée à un générateur qui va assurer le passage du courant électrique. La migration doit être réglée sous une tension déterminée à 200 V et une intensité déterminée à 60mA (**Figure.16**)

### 2.3.4 Révélation des gels

Après la sortie du front de migration, le gel de concentration est éliminé, les gels sont démoulés et mis dans le bac contenant une solution de coloration (**annexe.01**) qui contient un fixateur de protéines, le TCA (acide trichloracétique) à 60 % et un colorant, le bleu de coomassie R250 et de l'eau distillée.

Les gels sont ensuite décolorés par plusieurs rinçages à l'eau distillée dans un mélange de méthanol et d'acide acétique (**solution de décoloration ; annexe.01**) qui doivent être maintenus en agitation pendant 45min pour éviter le dépôt du colorant.



**Figure16** : Etape d'électrophorèse des protéines SDS\_PAGE (A : montage des plaques et préparation des gels ; B : chargement des gels ; C : migration des gels ; D : coloration des gels)

### 2.3.5 Traitement des résultats

Le gel d'électrophorèse obtenu a été photographié par un système d'imagerie « Biorad : model Gel Doc™ XR+» au niveau de laboratoire de biologie moléculaire de CRBt.

Son analyse est réalisée à l'aide du logiciel spécifique qui permet une bonne visualisation et une distinction des bandes ainsi que le calcul de leur poids moléculaires en fonction du marqueur de taille.



## **RESULTATS ET DISCUSSION**

### 1. Germination des graines de *Moringa oleifera* :

Les résultats de cet essai sont présentés dans ci-dessous ; **le tableau 04** illustre les délais de levée et le taux de germination par traitement.

**Tableau 04** : Délai et taux de germination des graines de *Moringa oleifera* sous différents prétraitements.

| Délai de germination (jours) | Mode de traitement des graines    |                  |                           |                           |                           |
|------------------------------|-----------------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                              | Taux de germination des graines % |                  |                           |                           |                           |
|                              | <i>Témoins</i>                    | <i>Scarifiée</i> | <i>Pré_trempées (72h)</i> | <i>Pré_trempées (48h)</i> | <i>Pré_trempées (24h)</i> |
| <i>10J</i>                   | 0%                                | 0%               | 0%                        | 0%                        | 0%                        |
| <i>20J</i>                   | 35%                               | 0%               | 5%                        | 25%                       | 26,7%                     |
| <i>25J</i>                   | 63%                               | 0%               | 10,3%                     | 31%                       | 51,6%                     |
| <i>28J</i>                   | 91.2%                             | 2.5%             | 13.3%                     | 43.4%                     | 86.7%                     |

D'après les résultats enregistrés sur le **tableau 04**, nous constatons que les graines n'ont commencé à être disponibles qu'à partir du **20<sup>ème</sup> jour**. Les graines témoins ont enregistré le pourcentage le plus élevé ; estimé à 35%, suivies des graines pré-trempées 24h et 48h. Aucune germination n'a été enregistrée pour les graines scarifiées, nous avons remarqué aussi un faible taux de germination pour le pré-trempage pendant 72heures.

Après 25jours, les graines continuent à germer en maintenant le même ordre.

Au bout de 28 jours de culture, la plus part des graines contrôle ont germé (91,2%), suivies des graines pré-trempées pendant 24h (86,7%), en troisième position vient le traitement de 48h qui enregistre un taux moyen de 43,4%. Les graines scarifiées restent en dernière position, avec un taux relativement faible de 2.5%.

Nos résultats se contredisent avec les travaux de **Derdour, (2019)** et **Njehoya et al. (2014)**, où la scarification des graines a donné les taux de germination les plus élevés. Ceci peut être en rapport avec l'origine des graines, de leur mode de conservation ou de leur qualité.



**Figure 17 :** Germination des graines de Moringa après 1 mois de culture

## 2. Analyse électrophorétique des protéines totales

### 2.1 Premier essai

Les résultats obtenus avec le premier protocole étaient négatifs. Ce résultat pourrait être en rapport avec le fait que nous avons extrait les protéines de la graine entière, avec la coque, et par manque de temps et de produit nous n'avons pas pu reproduire l'expérience.

### 2.2- Deuxième essai :

La figure 20 illustre le profil électrophorétique de différentes protéines contenues dans les feuilles et les graines de MO dans des conditions réductrices.

Pour les graines nous observons sept bandes importantes 13, 14, 19, 21, 22, 24 et 33 kDa et une bande légère 28 kDa, alors que pour les feuilles cinq bandes au total ont pu être identifiées, parmi elles 3 sont bien apparentes 12, 28 et 55 kDa et 2 autres légères 22, 30 kDa.

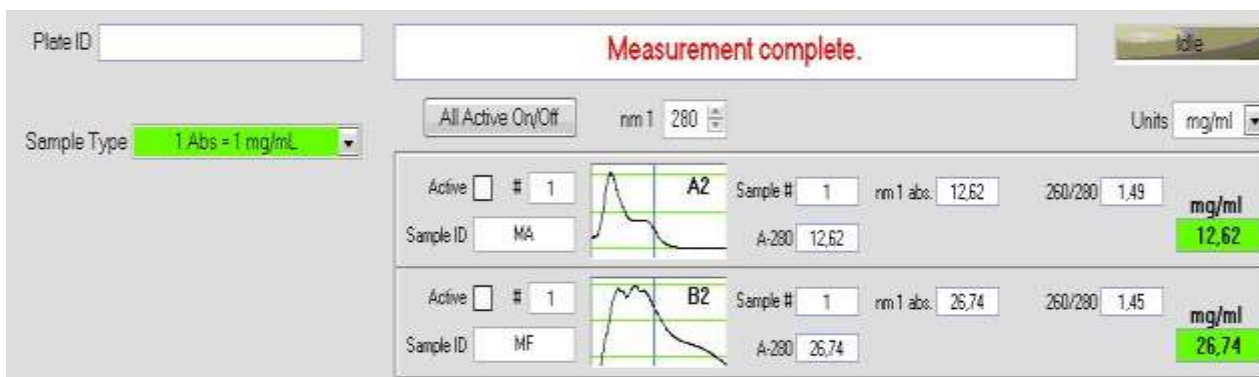
Nos résultats sont en accord avec les travaux de **Cattan et al, (2021)**, les mêmes peptides 19 et 21 kDa ont été retrouvés sur leur profil électrophorétique.

Le protocole d'extraction que nous avons utilisé semble fiable car il nous a permis de visualiser un bon nombre de bandes. Dans la farine de feuilles de *Moringa oleifera*, **Honghui et al, (2020)** ont trouvé une seule bande bien apparente de 55 kDa, qui est commune avec nos résultats.

Comparativement aux graines ; l'intensité des bandes observées chez les feuilles a été considérablement réduite, nous avons remarqué aussi que les échantillons de graines contenaient davantage de protéines de poids moléculaire élevé. Un profil similaire a été obtenu avec les travaux de **Cattan et al, (2021)**.

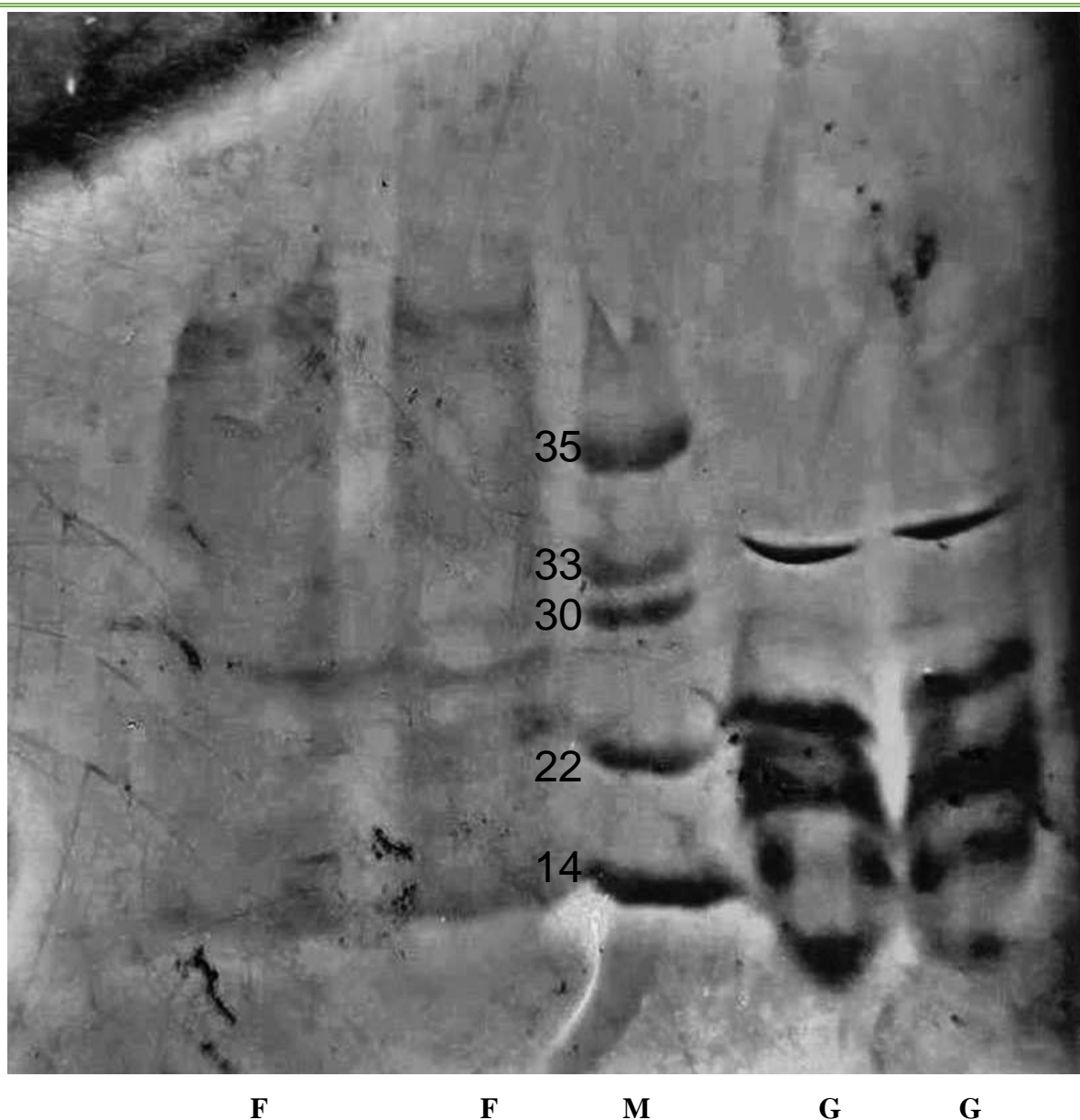
La quantification des protéines par le Nanodrop a fourni des informations précieuses sur la teneur en protéines des échantillons de Moringa. L'absorbance à 280 nm est spécifique aux protéines en raison de la présence d'acides aminés aromatiques, principalement du tryptophane et tyrosine. En mesurant l'absorbance à cette longueur d'onde, nous avons pu estimer la concentration en protéines dans les échantillons.

Les résultats, représentés dans la figure 19 indiquent une concentration protéique de 12.62 mg/ml pour les feuilles et de 26.74 mg/ml pour les graines. La concentration en protéines plus élevée observée chez les graines est cohérente avec les bandes plus denses observées dans l'analyse SDS-PAGE, indiquant une teneur en protéines plus élevée dans cet échantillon.



**Figure 18 :** Dosage des protéines par Nanodrop

Nos résultats concordent parfaitement avec les travaux de **Cattan et al, (2021)** qui ont démontré que tourteaux de graines (RS) contenaient plus de protéines (45,8 %) que les feuilles (RL) (27,4 %).



**Figure 19** : SDS-PAGE des protéines totales de *Moringa oleifera*, *F* : feuille, M : marqueur, G : graine

Dans notre travail, on s'intéresse de plus près aux protéines une **protéine** dont les propriétés **floculantes** permettent de clarifier l'eau, il s'agit de la protéine MO2.1 aussi appelé **MOCP** (*Moringa oleifera* cationic protein) (Saini et al. 2016 ; Moulin et al. 2019, Mazzaoui, 2019), c'est un homodimère de 13kDa avec des sous unités d'environ 6,5kDa. En effet, la détermination de la masse moléculaire des protéines coagulantes par tamisage moléculaire a montré un poids de 6,5 kDa dans des conditions réductrices et de 13 kDa en conditions non réductrices (Ndabigengesere et al. 1995).

Ces peptides sont bien apparents sur le profil électrophorétique. Une identification par spectrométrie de masse de ces peptides confirmerait d'avantage nos résultats.

# **CONCLUSION**



L'objectif de ce travail été d'évaluer le potentiel germinatif et d'adaptation du *Moringa oleifera* dans la région de Constantine ainsi que d'établir un protocole d'extraction des Protéines afin de contribuer à l'étude des protéines coagulantes du *Moringa oleifera*.

Les résultats de la première partie de notre travail ont montré que les toutes premières germinations ont été enregistrées chez les graines qui n'ont subies aucun prétraitement. Ceci peut être en rapport avec l'origine des graines, de leur mode de conservation ou de leur qualité.

L'extraction des protéines est une étape cruciale dans l'électrophorèse, car elle peut avoir un impact significatif sur la quantité et la qualité de la détection de la protéine. La deuxième partie de la présente étude est une comparaison entre 2 protocoles d'extraction des protéines visant à déterminer la méthode la plus appropriée pour extraire les protéines totales des graines et des feuilles de *Moringa oleifera*.

Les coagulants naturels, connues pour leur efficacité à éliminer la turbidité et la couleur de l'eau. Dans notre étude, les coagulants du *M. oleifera* ont été déterminés en établissant la teneur en protéines dans les solutions extraites et le poids moléculaire correspondant. Ces résultats suggèrent que le protocole suivi devrait avoir de bonne application dans des études protéomiques pour le *Moringa*.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

# A

**A.Lounnas**, Mémoire de Magister, Amélioration des procédés de la station Hamadu de Skikda, Université du 20 Aout 1955 Skikda, 2009, p : 120

**Abd-Rabou A. A, Zoheir K. M, Kishta M. S, Shalby A. B, & Ezzo M. I** (2016) Nano-micelle of *Moringa oleifera* seed oil triggers mitochondrial cancer cell apoptosis. Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP 17:4929-4933.

**Albuquerque Costa R, Sousa O. V. D, Hofer E, Mafezoli J, Barbosa F. G, & Vieira R** (2017) Thiocarbamates from *Moringa oleifera* Seeds Bioactive against Virulent and Multidrug-Resistant Vibrio Species. BioMed research international.1-6 p.

**Al-Malki A. L , & El Rabey H. A** (2015) The antidiabetic effect of low doses of *Moringa oleifera* Lam. seeds on streptozotocin induced diabetes and diabetic nephropathy in male rats. BioMed research international.1-13p.

**Anwar F Latif S, Ashraf M & Gilani A. H** (2007) *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 21: 17-25.

**Anwar F Latif S, Ashraf M & Gilani A. H** (2007) *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 21: 17-25.

**Aruna M & Srilatha N** (2012) Water clarification using *Moringa oleifera* Lam. seed as a natural coagulant. Current Biotica 5:472-486.

## B

**Bourai E. k, &Guelmani –Ziani F** (2015) Activité antioxydante d'extraits de graines d'intérêt nutritionnel et médicinal : *Moringa oleifera*. Mémoire de Master en sciences alimentaires. Université A. MIRA – Béjaia.6p.

**Broin M (2005)**. Nutritional composition of *Moriga oleifera* leaves. Centre Technique de Coopération Agricole et rurale (CTA) – ACP-UE. 5 p.

## C

**Cattan Ya'ara, Devashree Patil, Yiftach Vaknin, Giora Rytwo, Catriona Lakemond, Ofir Benjamin,(2021)**,Characterization of *Moringa oleifera* leaf and seed protein extract functionality in emulsion model system, Innovative Food Science & Emerging Technologies,Volume 75,2022,102903,ISSN 1466-8564,<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102903>.

**Cutler, W. (2016, decamber 13)**. *flickr*. Récupéré sur flickr: <https://www.flickr.com/photos/wlcutler>

## D

**Derdour R (2019)** Essai de production de *Moringa oleifera* pour une éventuelle contribution à l'étude des potentialités de la graine dans l'épuration des eaux usées de la région de Constantine. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri. Constantine. 108p

**Dicko M. H., (2006)**. Travaux pratique biochimie structurale et enzymologie. Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles. Univèrsité.Ouagadougou.P :62-69.

## E

**Emmanuel S. A, Emmanuel B. S, Zaku S. G, & Thomas S. A** (2011) Biodiversity and agricultural productivity enhancement in Nigeria: application of processed *Moringa oleifera* seeds for improved organic farming. Biol. J. N. Am 2: 867-871.

## F

**Foidl N, Makkar H, & Becker K** (2001) Potentiel de *Moringa oleifera* en agriculture et dans l'industrie. Potentiel de développement des produits de Moringa. Dar es-Salaam, Tanzanie, du 29 octobre au 2 Novembre 2001.1-20 p.

**Foidl, N., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2001).** THE POTENTIAL OF MORINGA OLEIFERA FOR AGRICULTURAL AND INDUSTRIAL USES.

**Frah H, & Bouzad, H** (2018) Evaluation de l'effet antibactérien et antiparasitaire des graines de *Moringa oleifera* dans le domaine de traitement des eaux usées. Mémoire de Magister en Microbiologie appliquée. Université Djilali Bounaama Khemis Miliana 3: 27-29.

**Fuglie L** (2001). Le Moringa : une arme dans la lutte contre la malnutrition. Church World Service, Bureau Régional de l'Afrique de l'Ouest. Disponible sur : <http://www.moringanews.org>. Consulté le 25/05/2019.

**Fuglie L. J, & Sreeja K. V** (2001) Cultivation of Moringa. The Miracle Tree 2:123-128.

**Fuglie, L. J. (1999).** The Miracle Tree: Moringa oleifera: Natural Nutrition for the Tropics. Church World Service, Dakar. 68 pp.; revised in 2001 and published as The Miracle Tree: The Multiple Attributes of Moringa, 172 pp.

## J

**Jaja-Chimedza A, Graf B. L, Simmler C, Kim Y, Kuhn P, Pauli G. F, & Raskin I (2017)** Biochemical characterization and anti-inflammatory properties of an isothiocyanate-enriched *Moringa (Moringa oleifera)* seed extract. PloS one, 12:1-21.

**Jangpromma N., Kitthaisong S., Daduang S., Jaisil P. &Thammasirirak S.,( 2007).** 18 KDa protein accumulation in sugarcane leaves under drought stress conditions.Kmitl.Sci. Tech. J.7: P27- 44

## L

**Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

**Laleye OAF, Ahissou H, Olounlade AP, Azando EVB, & Laleye A (2015)** Etude bibliographies de trios plantes antidiabétiques de la Flore béninoise : *Khaya senegalensis* (Desr) A. Juss (Meliaceae), *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) et *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae). International Journal of Biological and Chemical Sciences 9:2682-2700.

**Laleye OAF, Ahissou H, Olounlade AP, Azando EVB, & Laleye A (2015)** Etude bibliographique de trois plantes antidiabétiques de la flore béninoise : *Khaya senegalensis* (Desr) A. Juss (Meliaceae), *Momordica charantia* Linn (Cucurbitaceae) et *Moringa oleifera* Lam (Moringaceae). International Journal of Biological and Chemical Sciences 9 :2682-2700.

## M

**Manceur Y, et Djaballah S (2016)** Analyse microbiologique de l'eau distribuée dans la ville de Tébessa. Mémoire de Master. Université Labri Tébessi. Tébessa. 75p

**Moulin M, Mossou E, Signor L, Kieffer-Jaquinod S, Kwaambwa HM, Nermark F, Gutfreund P, Mitchell EP, Haertlein M, Forsyth VT, & Rennie AR (2019)** Towards a molecular understanding of the water purification properties of Moringa seed proteins. Journal of colloid and interface science 554: 296-304.

## N

**Nand V, Maata M, Koshy K, & Sotheeswaran S (2012)** Water purification using *Moringa oleifera* and other locally available seeds in Fiji for heavy metal removal. International Journal of Applied 2 :1258-129.

**Ndabigengesere A, Narasiah KS, & Talbot BG (1995)** Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. Water research 29:703-710

**Neto J. X , Pereira M. L, Oliveira J. T, Rocha-Bezerra L. C, Lopes T. D, Costa H. P, & Monteiro-Moreira A. C. O (2017)** A Chitin-binding protein purified from *Moringa oleifera* seeds presents anticandidal activity by increasing cell membrane permeability and reactive oxygen species production. Frontiers in Microbiology 8 : 980-985.

**Ngandjui Tchangoue YA, Djumyom Wafo GV, Wanda C, Soh Kengne E, Kengne IM, & Kouam Fogue S (2019)** Use of *Moringa oleifera* seed extracts to polish effluents from natural systems treating faecal sludge. Environmental technology 40:2018-2026.

**Njehoya C. A, Bourou S, Awono P. K, & Bouba H (2014).** Évaluation du potentiel de germination de *Moringa oleifera* dans la zone soudano-guinéenne du Cameroun. Journal of Applied Biosciences 74 : 6141-6148.



## P

**Pousset J., 1999,** le **Moringa oleifera** est une plante miracle. Disponible sur <http://www.Essentialdrugs.org>. Consulté le 26/09/2013. Rajangam J., Azahakia ...86 pages

## R

**Rongead, (2014).** Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses.p3

## S

**Saini R. K, Sivanesan I, & Keum Y. S (2016)** Phytochemicals of *Moringa oleifera*: a review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. 3 Biotech 6:203

**Sánchez-Muñoz MA, Valdez-Solana MA, Avitia-Domínguez C, Ramírez-Baca P, Candelas-Cadillo MG, Aguilera-Ortíz M, Meza-Velázquez JA, Téllez-Valencia A, & Sierra-Campos E (2017)** Utility of milk coagulant enzyme of *Moringa oleifera* seed in cheese production from soy and skim milks. Foods 6: 62.

**Shi, H., Su, B., Chen, X., & Pian, R. (2020).** Solid state fermentation of *Moringa oleifera* leaf meal by mixed strains for the protein enrichment and the improvement of nutritional value. *PeerJ*, 8, e10358.

## V

**Vilaseca M, López-Grimau V, & Gutiérrez-Bouzán C (2014)** Valorization of waste obtained from oil extraction in *Moringa oleifera* seeds: coagulation of reactive dyes in textile effluents. Materials 7: 6569-6584

## Y

**Yang R. Y, Chang L. C, Hsu J. C, Weng B. B, Palada M. C, Chadha M. L, & Levasseur V**  
(2006) Nutritional and functional properties of Moringa leaves–From germplasm, to plant, to food, to health. Moringa leaves: Strategies, standards and markets for a better impact on nutrition in Africa. 1-9p.

# **ANNEXE**

**ANNEXE 1 : dosage des solutions*****Tampon de charge***

- tris Hcl (0,5M , PH=6,8) 1,25 ml
- SDS10 2ml
- glycol 20 5ml
- B-mercapto 0,5 ml
- Bleu de bromophénol 1ml
- eau distillé 10ml

***Tampon de coloration***

- éthanol 250ml (abssolu)
- acide acétique 40ml
- bleu de coomassie G250 1,5 g
- eau distillée qsp 1000 ml

***Gel de séparation 15 (10ml)***

- H2O 2,3
- 30 Acrylamide mix 5
- 1,5 M tris (ph 8,8) 2,5
- 10 SDS 0,1
- 10 APS 0,1
- TEMED 0,002

***Tampon de migration***

- 3g tris
- 14,4g glycine
- 5ml SDS 10
- PH= 8,2\_8,4
- completer jusqu'à 1L par l'eau distillée

***Tampon de décoloration***

- 250 ml éthanol
- 70ml acide acétique
- complet jusqu'à 1 L avec l'eau distillée

***Stucking solution (5ml)***

- H2O 3,4
- 30 acrylamide 0,83
- 1 M tris (PH 6,8) 0,63
- 10 SDS 0,05
- 10 APS 0,05
- TEMED 0,005

**ANNEXE 2 : Solution et tampon utilisés pour SDS-PAGE**

***Solution d'acrylamide : bis acrylamide T=30% C=2.67%***

Acrylamide 30g

N, N'méthylènebisacrylamide 0.8g

Eau distillée 100ml

***Solution APS (Ammonium Persulfate) à 10%***

APS 1g

Eau distillée 10ml

***Solution stock de SDS (Sodium dodécyl sulfate) à 10%***

SDS 10g

Eau distillée 100ml

***Tampon d'électrophorèse 10XpH 8.3***

Tris base 30.30g

Glycine 144.10g

SDS 10g

H<sub>2</sub>O 1L

## caractérisation moléculaire des protéines de *moringa oleifera*

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie et écologie végétale  
*spécialité Biotechnologie et génomique végétale*

### résumé

L'eau constitue un élément important dans la ration alimentaire de l'homme et dans les nombreuses activités dictées par les conditions de vie. Les graines de *Moringa oleifera* présentent un flocculant naturel très efficace pour le traitement de l'eau. Cette efficacité revient à la présence de protéines cationiques actives qui agissent en tant qu'agent adsorbant, coagulant et désinfectant. Dans cet étude, différents traitements ont été testés afin d'évaluer les potentiel germinatif du *Moringa* ; graines scarifiées, graines trempées dans de l'eau pendant 24h, 48h et 72h, en plus du témoin, afin de déterminer la manière la plus efficace pour faire germer et adapter cet arbre miracle à la région de Constantine. Les résultats ont montré que les graines qui n'ont subies aucun prétraitement ont germé les premières, contrairement aux travaux antérieurs. L'électrophorèse des protéines totales de *Moringa oleifera* a permis la caractérisation de 8 bandes au totales pour les graines et 5 autres pour les feuilles. Les graines contiennent plus de protéines que les feuilles, La quantification des protéines par le Nanodrop confirme ces résultats. Comparativement aux feuilles, les graines contiennent d'avantage de protéines de poids moléculaire élevé. Les protéines flocculantes ont pu être observées sur le gel SDS-PAGE. L'identification de ces protéines par spectrométrie de masse confirmerait d'avantage nos résultats.

Mots-clefs : *Moringa oleifera*, caractérisation moléculaire, SDS-PAGE, dépollution des eaux usées

### Laboratoires de recherche :

Laboratoire de génétique biochimie et biotechnologie végétale. (Université Frères Mentouri, Constantine 1).  
Centre de recherche en biotechnologie Constantine (CRBT)

Encadreur : KACEM Sandra Nadia (Dr - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examinatrice : HAMMOUDA Dounia (Pr- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Président : BENBELKACEM Abdelkader (Pr- Université Frères Mentouri, Constantine 1)