

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

Université Frères Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département Biologie et Ecologie végétale

قسم بيولوجيا وعلم البيئة

مشروع نهائية الدراسة المعدّ بغرض إنشاء مؤسسة ناشئة أو الحصول على براءة اختراع

(طبقاً لأحكام المنشور رقم 001 المؤرّخ في 18 ماي 2023)

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biotechnologie

Spécialité : *Biotechnologie et génomique végétale*

N° d'ordre :

Lancement d'une start-up
Fabrication d'un complément alimentaire
« immune-Mori »

N° de série :

Présenté par : BOUMAH RAT Zoheir

Le 21/09/2023

Président : CHIBANI Salih (MCA Université Mentouri, Constantine 1).

Encadrant : HAMMOUDA Dounia (Prof. Université Mentouri, Constantine 1).

Examineur: MOURI Fouzia (MCB Université Mentouri, Constantine 1).

C.A.T.I : BENCHARIF – BETINA Soumeya (MCB, Mentouri, Constantine 1).

Incubateur : BOUCHEMAL Karima (MCB, Mentouri, Constantine 1)

Président CNPA: ERNIZ Elhamel

Année 2022 - 2023

REMERCIEMENT

Tout d'abord, je rends grâce au tout puissant qui m'a permis d'arriver au bout de mes efforts en me donnant la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

Au terme de la réalisation de mon mémoire, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma mon encadreur Pr. HAMMOUDA Dounia, Professeur à l'université Frère Mentouri Constantine 01, pour avoir accepté de diriger mon travail. Et, qui n'a jamais cessé d'être présente et de me guider sans relâche tout au long de mes recherches ; telle une muse inspirante vous avez nourri mon esprit. Mes plus vifs remerciements s'adressent également au : Dr. CHIBANI, Maître de conférences à l'Université Frères Mentouri Constantine 01, pour avoir bien voulu me faire l'honneur de présider le jury. Ainsi qu'au : Dr. MOURI Maître de conférences à l'Université des Frères Mentouri Constantine 01, pour avoir accepté d'examiner ce travail et d'être membre de ce jury. Je tiens tout aussi à exprimer ma profonde gratitude au Directeur du Laboratoire de recherche et développement saidal a Alger, pour Votre confiance en moi et décision de m'accueillir dans le laboratoire ont été sans égal pour mon développement personnel et professionnel. Je souhaite tous particulièrement, remercier tous les enseignants de la spécialité Biotechnologie et Génomique Végétale, spécialement Mr. Mahmoud TEMAGULTI et Mr. Kamel KELLOU. Veuillez trouver, dans ce travail, l'expression de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Enfin je souhaite exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui nous ont apporté leur aide et qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire.

DÉDICACES

À mes parents, Maman Farida et Papa Ali pour leur amour inconditionnel, leur soutien constant et leurs sacrifices pour que je puisse atteindre ce moment crucial de ma vie.

À mon amie Ines, dont la précieuse aide, les conseils avisés et la présence encourageante ont été des piliers essentiels tout au long de ce parcours académique.

À mes amis et collègues, dont le partage d'expérience, les discussions stimulantes et la camaraderie ont enrichi mon expérience éducative de manière inestimable.

Ensemble, nous avons grandi et appris.

Ce mémoire est dédié à tous ceux qui ont contribué à mon succès, et à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont été une part importante de ce voyage vers la réussite.

Zohier

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I. Revue bibliographique.....	4
I.1 Généralités sur l'espèce <i>Moringa Oleifera</i>.....	5
1.1 Historique.....	5
1.2 Ecologie et Répartition géographique.....	6
1.3 Classification systématique.....	7
1.4 Description botanique.....	7
1.4.1 L'arbre.....	8
1.4.2 Les feuilles.....	8
1.4.3 Les fleurs.....	8
1.4.4 Les fruits.....	8
1.4.5 Les graines.....	8
1.5 Intérêts d'utilisation.....	10
I.2 Les métabolites secondaires	12
2.1 Description et rôles.....	12
2.2 Les différents types de classes.....	13
2.2.1 composés phénoliques (Polyphénols).....	14
Les flavonoïdes.....	14
Les tannins.....	15
Les acides phénoliques.....	15
2.2.2 Les composés azotés	16
Les alcaloïdes.....	16
Les hétérosides.....	17
2.2.3 Les terpénoïdes (Les huiles essentielles).....	17

1.3 Les Compléments alimentaires.....	19
1.3.1 .Définition d'un complément alimentaire.....	19
1.3.2. Définition d'un nutriment	20
Chapitre II. Matériel et méthodes.....	22
II.1 Matériel végétal	23
II.2 Méthodes utilisées	23
II.2.1Préparation des poudres de plantes.....	24
II.2.2 Identification des principes actifs par HPLC.....	25
Chapitre III. Résultats et discussion.....	40
III.1 Formulation estimée du complément alimentaire.....	41
III.2 Qualité du Produit.....	42
III.2.1 Identification.....	43
III.2.2 Evaluation des activités biologiques.....	44
III.2.3 Analyse physico chimique.....	49
III.2.4 Analyses microbiologiques.....	51
III.2.5 Formulation et fabrication.....	52
III.2.6 Analyse de dangers.....	53
Conclusion et perspectives.....	55

Résumé

Annexes

Liste des Figures

Figure 1. Répartition topographiques de <i>Moringa oleifera</i> (Bhattacharya et al., 2019).....	12
Figure 2 : Les différents parties de la plante <i>Moringa Oleifera</i> (Anzano et al., 2021).....	15
Figure3 : Racines de <i>Moringa Oleifera</i> (Coffee Calvin Tinashe et al 2019).....	15
Figure 4: Identification des différentes parties morphologiques de l'arbre <i>Moringa oleifera</i> (Granellaa et al., 2021).....	17
Figure 5: Structure du noyau phenol.....	19
Figure6: Structure de base des flavonoïdes.....	20
Figure7: structure chimique de base des tanins hydrosolubles et condensés.....	21
Figure8: structure acide phénolique.....	21
Figure 9: Structure générale des alcaloïdes.....	22
Figure10 : structure chimique de base des terpènes.....	23
Figure 11 : Chromatogramme d'HPLC (Originale).....	45
Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes (Originale).....	47
Figure 13 : Pourcentage de piégeage du radical DPPH en fonction de concentration de l'acide ascorbique(Originale).....	48
Figure 14 : Pourcentage de piégeage du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique du brocoli(Originale).....	48
Figure 14 : Pourcentage de piégeage du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique (Originale).....	49

Figure 15 : Pourcentage de piégeage du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de l'armoise (Originale).....	49
Figure 16 : Pourcentage de piégeage du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de l'ortie (Originale).....	50
Figure 17 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction de la concentration de l'aspirine (Originale).....	51
Figure 18 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation deprotéines en fonction de la concentration de l'armoise (Originale).....	52
Figure 19 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction de la concentration du brocoli(Originale).....	52
Figure20 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction de la concentration de <i>Moringa</i> (Originale).....	53
Figure 21 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction de la concentration de l'ortie(Originale).....	53

Liste des tableaux

Tableau 1. Exigences écologiques idéales du <i>Moringa oleifera</i>	13
Tableau 2: Programme d'élution pour l'analyse qualitative des flavonoïdes.	30
Tableau 3 : proposition de formulation de <i>Moringa oleifera</i> avec d'autres plantes.....	44
Tableau 4 : Les résultats explicatifs du chromatogramme d'HPLC	45
Tableau 5 : Valeurs des concentrations inhibitrices à 50% (IC50) (Activité antioxydante) (Original).....	50
Tableau 6 : Valeurs des concentrations inhibitrices à 50% (IC50) (anti-inflammatoire) (Original).....	54
Tableau 7 : Sensibilité et CMI (mg/ml) des souches bactériennes testées aux extraits méthanoïques des deux espèces étudiées (Original).....	55
Tableau 8 : Résultats des analyses physico-chimiques de la poudre de <i>Moringa oleifera</i> . (Original).....	56
Tableau 9: Résultats d'analyses microbiologique de la matière première (Original).....	58
Tableau 10 : Résultats d'analyses microbiologique de produit final élaborer.....	59

Liste des abréviations

HACCP HAZARD Analysis critical control point

ISO 22000 système de management de la sécurité des denrées alimentaires dont la conformité à la norme peut être certifiée

Ph potentiel hydrogène

HPLC Chromatographie en phase liquide à haute performance

UV Ultraviolet

µm micromètre

µl microlitre

NaNO₂ nitrite de sodium

DPPH (2,2-diphényl 1-picrylhydrazyle) permet de mesurer l'efficacité de molécules antioxydantes.

CMI Concentration Minimale Inhibitrice

McFarland

Pe : Masse de la prise d'essai.

m₀ : masse de la capsule vide et couvercle.

m₁ : masse de la prise d'essai et capsule avec couvercle sortie d'étuve.

W : teneur en eau.

M : Matière sèche.

H₂SO₄ L'acide sulfurique

Résumé

Les compléments alimentaires sont des denrées alimentaires, dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments : Vitamines, Magnésium, Fer, Calcium

Les travaux effectués dans le cadre de cette étude consistent à la formulation et la fabrication d'un complément alimentaire à base de *Moringa oleifera*, dont son appellation « **Immune-Mori** », à partir des molécules bioactives de cette dernière au niveau moléculaire.

L'application de la norme 22000 permet de démontrer une aptitude à identifier et à maîtriser les dangers liés à la sécurité des compléments alimentaires, cette norme est liée à l'approche HACCP qui a pour objectif la prévention, l'élimination ou la réduction à un niveau acceptable de tout danger « biologique, chimique, et physique » au regard de la sécurité des produits, mais aussi à fournir en permanence des produits finis et sûrs.

Au cours de notre étude, plusieurs techniques d'analyses ont été réalisées : l'identification des principes actifs, l'évaluation des activités biologiques, dosage des flavonoïdes, analyses physico-chimiques, et analyses microbiologiques.

Les résultats obtenus de ces analyses confirment la présence des flavonoïdes dans les feuilles *Moringa oleifera* par une valeur de 12.547 mg EQ/g plus précisément les molécules bioactives acide chlorogénique et l'isoquercétine ; et assurent que la plante étudiée a des activités biologiques (activité antioxydant de 0.040 mg/ml., anti-inflammatoire 0,154/ml , et antibactérienne avec toutes les souches étudiées mise appart *l'Enterococcus faecalis* ATCC 29212 , *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 , et *Serratia marcescens*, qui sont résistante au *Moringa oleifera*) dans le but de stabiliser la formule.

Mots clés : *Moringa oleifera*, Technique HPLC, activités biologiques, analyses microbiologiques, complément alimentaire.

Abstract

Food supplements are foodstuffs, the purpose of which is to supplement the diet normal food and which constitute a concentrated source of nutrients: Vitamins, Magnesium, Iron, Calcium

The work carried out as part of this study consisted in showing the interest of food supplements based on *Moringa oleifera*, as well as the effect of the bioactive molecules of the latter at the molecular level.

The application of the 22000 standard makes it possible to demonstrate an ability to identify and control the dangers related to the safety of food supplements, this standard is linked to the HACCP approach which aims to prevent, eliminate or reduce to an acceptable level any 'biological, chemical, and physical' product safety hazards, as well as to provide finished and safe products. During our study, several analytical techniques were carried out: identification of active ingredients, evaluation of biological activities, assay of flavonoids, physico-chemical analyses, and microbiological analyses.

The results obtained from these analyses confirm the presence of flavonoids in *Moringa oleifera* by a value of 12,547 mg EQ / g more precisely the bioactive molecule chlorogenic acid and isochlorogenic acid; and ensure that the plants studied have biological activities (antioxidant activity of 0.040 mg / ml., anti-inflammatory 0.154 / ml, and antibacterial with all strains studied put apart *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 , *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 , and *Serratia marcescens*, which are resistant to *moringa oleifera*) with the aim of stabilizing the formula.

Key words : *Moringa oleifera*, HPLC technique, biological activities, microbiological analyses, food supplement.

ملخص

المكملات الغذائية هي مغذيات ، والغرض منها هو تكملة النظام الغذائي العادي والتي تشكل مصدرا مركزا للعناصر الغذائية: الفيتامينات والمغنيسيوم والحديد والكالسيوم

يتكون العمل المنجز في إطار هذه الدراسة من صياغة وتصنيع مكمل غذائي يعتمد على المورينجا أوليفيرا ، من الجزيئات النشطة بيولوجيا للأخير على المستوى الجزيئي

إن تطبيق معيار 22000 يجعل من الممكن إثبات القدرة على تحديد ومراقبة المخاطر المتعلقة بسلامة المكملات الغذائية ، ويرتبط هذا المعيار بنهج تحليل المخاطر ونقاط المراقبة الحرجة الذي يهدف إلى منع أو إزالة أو تقليل أي خطر "بيولوجي وكيميائي وفيزيائي" إلى مستوى مقبول فيما يتعلق بسلامة المنتج . ولكن أيضا يجب توفيرها في دوام المنتجات النهائية والأمنة

خلال دراستنا ، تم إجراء العديد من تقنيات التحليل:

تحديد المكونات النشطة ، وتقييم الأنشطة البيولوجية فحص مركبات الفلافونويد والتحليلات الفيزيائية والكيميائية والتحليلات الميكروبيولوجية ،

تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها من هذه التحليلات وجود مركبات الفلافونويد في أوراق المورينجا أوليفيرا بقيمة 12.547 مجم مكافئ / جم بشكل أكثر دقة الجزيئات النشطة بيولوجيا حمض الكلوروجينيك والإيزوكيسيتين ؛ وتأكد من أن النبات المدروس له أنشطة بيولوجية (نشاط مضاد للأكسد من 0.040 ملغ / مل ، مضاد للالتهابات 0.154 / مل ، ومضاد للبكتيريا مع جميع السلالات المدروسة بصرف النظر عن المكورات المعوية البرازية 29212 ، السالمونيلا تيفيموريوم أتسك 14028 ، و سيراتيا مارسيسنس ، والتي هي مقاومة للمورينجا أوليفيرا) من أجل تحقيق الاستقرار في الصيغة

لكلمات المفتاحية: المورينغا أوليفيرا، تقنية، الأنشطة البيولوجية، التحليلات الميكروبيولوجية، المكملات الغذائية

Introduction



INTRODUCTION

Les plantes sont toujours considérées comme une source importante de médicaments et de compléments alimentaires dans le monde. Ces jours-ci, il a été rapporté par l'Organisation mondiale de la santé que plus de 80% des personnes utilisent encore la médecine traditionnelle. Ce type de médicament contient une proportion importante d'extraits de plantes et de leurs principes actifs. **(Wang et Wu, 2013)**. Actuellement, la **vie en bio** est devenue très tendance. Le but est de vivre le plus sainement possible en se tenant loin des produits susceptibles de nuire à la santé tels les produits chimiques, on cherche tous les moyens pour respecter cet objectif. Si les produits alimentaires ont déjà pris de l'avance depuis quelques années dans le monde du bio, on parle aussi de cosmétique bio et naturel. Un aperçu sur ce mode d'usage pour se faire belle pourra sans doute vous être utile **(Cemena 2019)**

L'espèce *Moringa Oléifera* est originaire des régions d'Agra et d'Oudh, au nord-est de l'Inde, au sud de la chaîne de montagne de Himalaya **(Meda, 2011)**. Ces feuilles ont une valeur thérapeutique à cause de leurs propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires.

Les compléments alimentaires sont des sources concentrées de nutriments, sous formes de vitamines et de sels minéraux, de substances à but nutritionnel ou physiologique, ou de plantes et de préparations de plantes qui ont pour but de pallier les carences du régime alimentaire régulier d'une personne (Directive 2002/46/CE , 2002).

Cependant leur marché est toujours un secteur en croissance, porté par l'engouement pour les compléments alimentaires naturels formulés à base de plantes, qui connaissent une forte hausse. Depuis maintenant près de 10 ans (Sophia,2015) ; La part de bio dans les compléments alimentaires enregistre une forte augmentation en parapharmacie et en pharmacie ; tant que les consommateurs souhaitent se tourner vers des solutions plus naturelles pour améliorer au quotidien leur niveau de bien-être et leur santé, ou pour soutenir une alimentation qu'ils jugent souvent déséquilibrée et appauvrie en nutriments.

Dans un cadre d'étude portant sur la formulation et la fabrication d'un complément alimentaire à base de *Moringa oleifera* suite à ses valeurs nutritionnelles avec comme objectifs :

- -Éprouver la valeur nutritive de cette plante miracle.
- -Assurer de la présence des molécules bioactives dans la poudre de *Moringa oleifera*.
- -Fabriquer un complément alimentaire sein et sur selon la norme ISO 22000.

- -Evaluer le marché des compléments alimentaires à base de plantes en Algérie.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons appris à faire l'application de la norme ISO 22000 et l'approche HACCP, ainsi, la réalisation d'une formulation de plantes, et à manipuler dans un laboratoire de microbiologie, de physico-chimie et la manipulation par chromatographie haute performance en phase liquide.

Ce projet sera amené à se poursuivre, mais dépendra principalement de certaines mesures nécessaires à mettre en place au niveau scientifique et réglementaire selon la norme ISO 22000 et approche HACCP.

Notre mémoire comporte trois chapitres. Dans le premier, nous rapportons des rappels bibliographiques. Dans le second chapitre, nous décrivons le matériel et les techniques utilisés. Les résultats obtenus sont rapportés et discutés dans le troisième chapitre. A la fin, une conclusion et perspectives sont présentées.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1 Généralités sur l'espèce

1.1 Historique

Moringa Oleifera est une espèce originaire des régions Sub Himalayennes d'Inde, du Pakistan, du Bangladesh et d'Afghanistan. Elle a été largement utilisée par les anciens Romains, les Grecs et les Egyptiens. Maintenant elle est largement distribuée un peu partout dans le monde, dans les régions tropicales du sud et central et d'Amérique, d'Afrique, d'Asie, le pacifique, et des îles des Caraïbes. Elle est introduite en Afrique au début des 20^{èmes} siècles (**Alhakmani et al., 2013**)

Moringa Oleifera L. C'est un arbre qui pousse largement dans de nombreux pays tropicaux et subtropicaux.. Il est connu sous le nom d'arbre à pilon basé sur l'apparence des gousses immatures, l'arbre à radis basé sur le goût des préparations de racines moulues et l'arbre à huile ben à partir des huiles dérivées des graines.[**idney J. Stohs*and Michael J. Hartman 2015**]

Toutes les parties de l'arbre *Moringa* (feuilles, graines, racines et fleurs) sont propres à la consommation humaine et animale. Les feuilles, riches en protéines, minéraux, β -carotène et composés antioxydants, sont utilisées non seulement pour l'alimentation humaine et animale mais aussi en médecine traditionnelle. Les graines, au contraire, ont suscité l'intérêt des scientifiques car les noyaux de graines de *M. oleifera* contiennent une quantité importante d'huile (jusqu'à 40 %) avec une composition en acides gras de haute qualité (acide oléique > 70 %) et, après raffinage, une résistance notable à la dégradation oxydative nt. [**J. Mol. Sci. 2016, 17(12), 2141**] . cette plante favorise un large éventail de fonctions biologiques, y compris les fonctions anti-inflammatoires, anticancéreuses, hépatoprotectrices et neuroprotectrices . De plus, plusieurs études ont révélé sa valeur thérapeutique notamment anti-diabétique, anti-rhumatoïde, anti-athérosclérotique, anti-stérile, analgésique et antidépresseur. [**Xianjuan Kou Justin M Drake 2018**]

1.2 Ecologie Répartition géographique de *Moringa oleifera*

Le *Moringa oleifera* a des caractéristiques adaptatives résilientes avec à un large éventail de conditions environnementales, mais de préférence certaines conditions sont un facteur important pour définir la teneur en éléments nutritifs et la force de la plante.



Figure 1. Répartition topographiques de *Moringa oleifera* (Bhattacharya et al., 2019).

Le moringa est cultivable croit en orange zone climatique, préférant certainement les régions plus chaudes, et maintenu dans cette gamme dans le cas des cultures importantes. Cependant, même dans les régions européennes avec des gelées très modérées, vous pouvez faire pousser *Moringa* extérieur tout au long de l'année. Cependant, il est important de protéger les racines avec paillage de paille ou des mesures similaires pour éviter le gel des racines. L'extérieur de l'ensemble de matrice si elle est exposée à un temps considérable à des températures égales ou inférieures à zéro degré centigrade, mais si la partie souterraine survit à l'usine de rivegeta avec ressort de force. **Foidl et al., 2001).**

Tableau 1. Exigences écologiques idéales du *Moringa oleifera*

Références	Paramètres	Optimal
Gopalakrishnan et al., (2016)	Climat	Tropicaux et subtropicaux
Gopalakrishnan et al., (2016)	Pluviométrie Nette	250 mm, avec un maximum d'environ 3 000 mm
Rathnayake et al., (2019)	Type de sol	Sols sableux ou limoneux
Rathnayake et al., (2019)	pH du sol	Légèrement acide à légèrement alcalin (pH 5-9)
Gopalakrishnan et al., (2016)	Température	Entre 25–35°C, mais l'arbre peut prendre jusqu'à 48 degrés à l'ombre et survivre à un léger gel

1.3 Classification

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. (APG, 2016)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobiophyta
Division	Magnoliophyta
Classe	Mangoliopsida
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Capparales
Famille	Moringaceae
Genre	<i>Moringa</i>
Espece	<i>Moringa oleifera</i>

1.4 Description botanique

L'arbre Est un arbre pérenne, à croissance rapide, qui peut atteindre 7 à 12 mètres de

hauteur (Figure N°2) et dont le tronc 20 à 40 cm de diamètre (**Kaur (2018)**). Le tronc est généralement droit, mais il est parfois très peu développé. En général, il atteint 1,5 à 2 mètres de haut avant de se ramifier, bien qu'il puisse parfois atteindre les 3 mètres. Les branches poussent de manière désorganisée et la canopée est en forme de parasol (**Amjad et al., 2015**).

1.4.2 Les feuilles

Les feuilles se développent principalement dans la partie terminale des branches. Elles mesurent 20 à 70 cm de long (Figure N°2), sont recouvertes d'un duvet gris lorsqu'elles sont jeunes, ont un long pétiole avec 8 à 10 paires de pennes composées chacune de deux paires de folioles opposés, plus un à l'apex, ovales ou en forme d'ellipse, et mesurant 1 à 2 cm de long (**Koul et chaze, 2015**).

1.4.3 Les fleurs

Elles mesurent 2,5cm de large et se présentent sous forme de panicules axillaires et tombantes de 10 à 25cm (Figure 2). Elles sont généralement abondantes et dégagent une odeur agréable. Elles sont blanches ou de couleur crème, avec des points jaunes à la base. Les sépales, au nombre de cinq, sont symétriques et lancéolés. Les cinq pétales sont minces et spatulés, symétriques à l'exception du pétale inférieur, et entourent cinq étamines. **Boukandoul,S.,Casal,S.&Zaidi,F.(2019)**

1.4.4 Les fruits

Les fruits forment des gousses à trois lobes, mesurant 20 à 60 cm de long, qui pendent des branches (Figure N°2). Lorsqu'ils sont secs, ils s'ouvrent en trois parties. Chaque gousse contient entre 12 et 35 graines. Les graines sont rondes, avec une coque marron semi perméable (**Amjad et al., 2015**).

4.3 Les graines Sont globulaires, à trois angles, elles ont un diamètre de 10 à 12 mm, avec une coque marron semi-perméable légèrement boisée (Figure N°6). La coque présente trois ailes latérales blanches qui s'étendent de la base au sommet à 120 degrés

d'intervalle, sont de 2 à 2,5 cm de long, de 0,4 à 0,7 cm de large (Anzano et al., 2021)



Figure 2 : Les différents parties de plante Moringa Oleifera (Anzano et al., 2021)



Figure3 : Racines de Moringa Oleifera (Coffee Calvin Tinashe et al 2019)

1.5 Intérêts d'utilisation de *Moringa Oleifera*

Moringa oleifera est considéré comme un arbre polyvalent ; il a de nombreuses applications agricoles, médicinales, et surtout industrielles y compris l'alimentation animale et la fabrication des compléments alimentaires

. *Moringa oleifera* a plusieurs utilisations en raison de sa composition. La poudre de graines est utilisée pour purifier l'eau, éliminant une grande quantité de matières en suspension dans les rivières et les eaux troubles, ce qui en fait un coagulant naturel pour le traitement de l'eau. L'huile des graines peut être utilisée comme engrais dans les plantations pour favoriser la croissance d'autres espèces ; il est également utilisé pour les cosmétiques tels que les savons et les parfums , et même pour la production de biodiesel utiles pour accélérer la cicatrisation de la peau et pour ralentir le vieillissement de la peau et l'apparition de rides . **Paula García Milla, 2021**

Le moringa est une plante antioxydante particulièrement puissante. Elle contient des polyphénols et des flavonoïdes, qui sont des composés antioxydants . Les extraits de *Moringa oleifera* peuvent être utilisés pour produire de la zéatine efficace pour le développement des plantes, augmentant ainsi les rendements des cultures . En plus de ces applications, *Moringa oleifera* a été utilisé dans l'alimentation, par exemple au Mexique comme ingrédient pour remplacer partiellement la farine de poisson dans l'alimentation du tilapia, en raison de sa teneur en protéines et en glucides.(2)

Une masse de rapports existent dans la littérature sur les valeurs nutritionnelles du Moringa. Le contenu nutritionnel comprend la vitamine A, qui offre une protection contre les maladies de la peau, les maladies des yeux, les affections gastro-intestinales, les affections cardiaques et de nombreux autres problèmes de santé ; la vitamine C, qui renforce l'immunité lors de différentes affections, notamment la grippe et le rhume ; Ca, qui renforce les dents et les os et prévient l'ostéoporose et K, qui est essentiel au

bon fonctionnement du cerveau et des protéines, les éléments constitutifs des cellules de notre corps. **Sunbal Khalil 2015**).

Les feuilles de Moringa contenaient la variété d'acides aminés essentiels qui sont des sous-unités de protéines. Les feuilles pourraient être une chance pour les personnes pauvres et incapables d'obtenir la composante protéique de leur alimentation à partir de la viande. Moringa contient de l'histidine et de l'argénine. Les acides aminés sont importants, en particulier pour les nourrissons incapables de produire suffisamment de protéines pour leurs besoins de croissance, **Taise Raquel Bechlin a c, Divair Christ 2021**).

Certaines caractéristiques de *M. oleifera* sont liées à l'alimentation animale ; croissance rapide, résistance à diverses conditions climatiques et pédologiques, et principalement la valeur nutritionnelle contribuent à l'utilisation dans l'alimentation animale, étant avantageux pour les bovins . Une étude récente a montré que l'utilisation d'extraits de feuilles améliorerait le statut microbien chez les bovins rumen. **Mohamed Ahmed Hassan 2021**

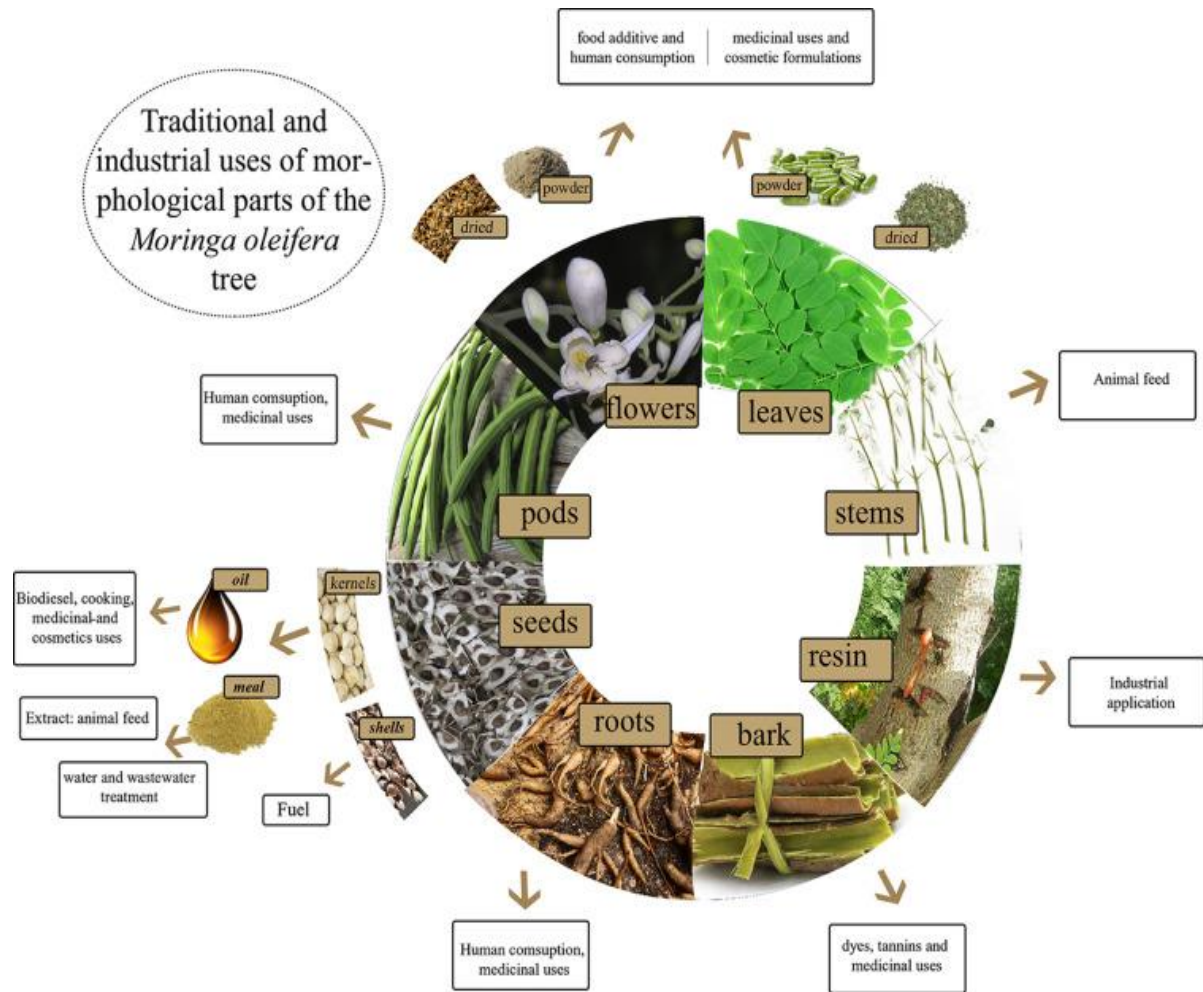


Figure 4: Identification des différentes parties morphologiques de l'arbre *Moringa oleifera* et description de ses usages traditionnels et industriels (Granellaa et al., 2021)

I.2 Les métabolites secondaires

2.1 Description et rôles

Le métabolisme secondaire est défini comme l'ensemble des voies permettant la synthèse de petites molécules, non essentielles mais pouvant procurer un avantage sélectif dans certaines conditions. Ces molécules sont appelées métabolites secondaires. Les métabolites secondaires sont historiquement plus spécifiques aux plantes, bactéries et champignons.

Les métabolites secondaires sont présents dans toutes les plantes supérieures Ils sont synthétisés à partir des précurseurs originaires du métabolisme primaire (**Charles et Benbrook, 2005**).

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions extérieures. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante. mais ils jouent un rôle majeure dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. (**Levasseur-Garcia et al., 2013**)

2.2 Les différents types de classes

2.2.1 Les composés phénoliques (Polyphénols)

Les « polyphénols » ou « composés phénoliques » sont des métabolites secondaires d'un poids moléculaire élevé, largement distribués dans le règne végétal. Ils sont des molécules aromatiques constituées d'un groupement phényle (C6) et d'un hydroxyle (-OH).

Ils sont caractérisés, comme l'indique le nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes. Les composés phénoliques végétaux sont généralement impliqués dans la défense contre le rayonnement ultraviolet ou d'agression par des agents pathogènes, parasites et prédateurs, ainsi que de contribuer aux couleurs de plantes. **Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. (2011)**.

On peut nommer dans cette famille les acides phénoliques les flavonoïdes et les tanins (et lignines). La plupart de ces composés phénoliques dérivent d'acides aminés aromatiques: la tyrosine et la phénylalanine. **Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi S., Gontier, E. (2001)**.

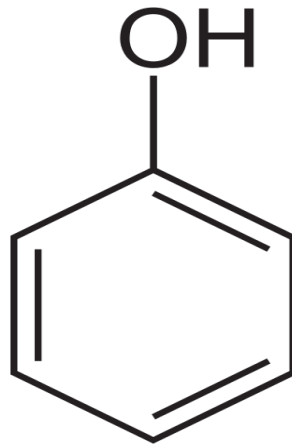


Figure 5: Structure du noyau phenol

Les flavonoïdes

Les flavonoïdes des plantes partageant tous une même structure de base à 15 atomes formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones (C6-C3-C6). Les flavonoïdes sont responsables de la couleur variée des fleurs et des fruits et représentent une source importante d'antioxydants dans notre alimentation. Ils forment une grande sous-classe des polyphénols (plus de 6000 flavonoïdes à été décrits). .. **Giovani. (2004).**

De Ils sont dotés de propriétés antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire et modulatrice de système immunitaire. **Andrews JM, (2001).**

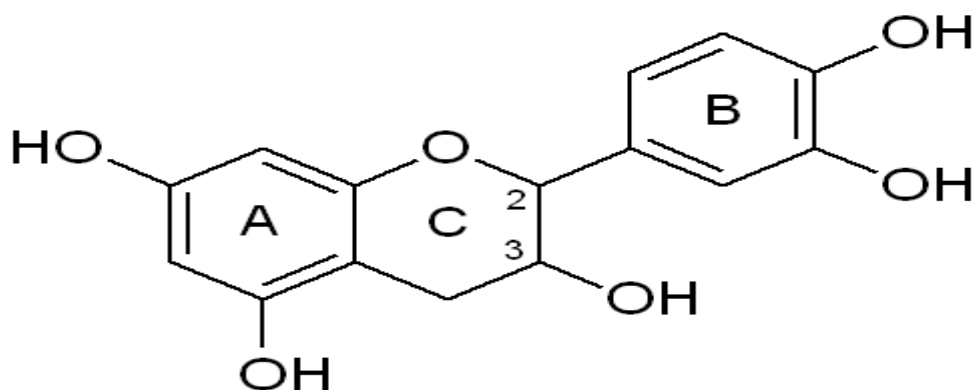


Figure 6: Structure de base des flavonoïdes

Les tannins

Les tannins sont des polyphénols polaires du poids moléculaires compris entre 500 et 3000 Da. Ils sont caractérisés par leur capacité antioxydante et leur propriété thérapeutique. **Bruneton J. (2008).**

Les tannins sont subdivisés en deux classes différentes, largement distribuées chez les végétaux supérieurs: Tannins hydrolysables et Tannins condensés ou non hydrolysables. Sur le plan chimique, ils sont constitués soit de polyol (glucose le plus souvent) des acides phénoliques soit d'oligomères ou polymères de flavanoides. **Alzoreky, N.S. (2009).**

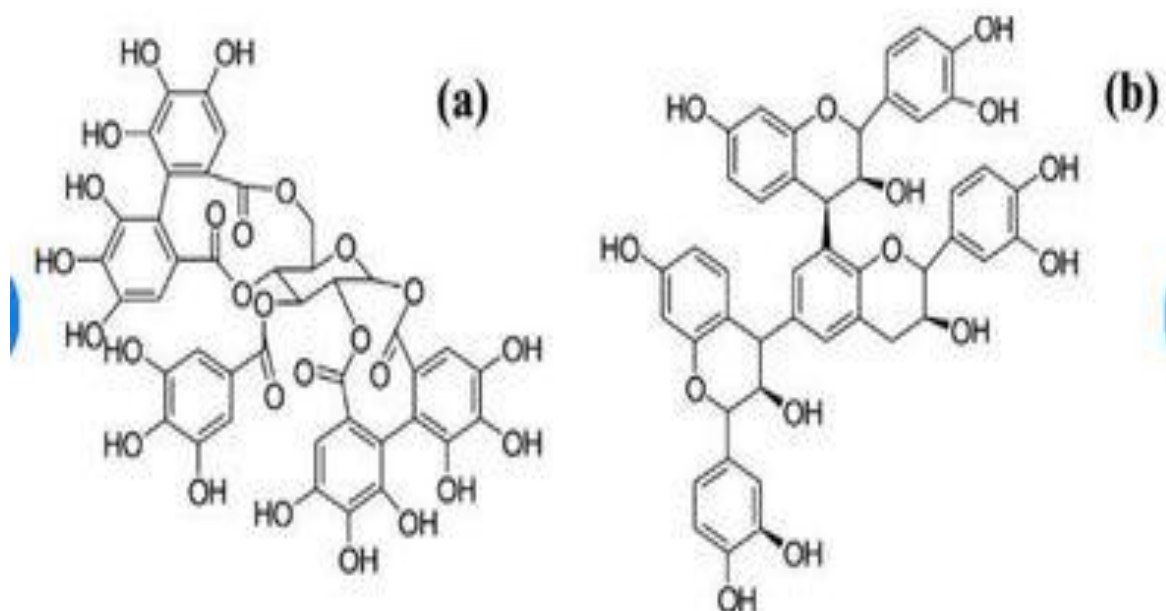


Figure7: structure chimique de base des tanins hydrosolubles et condensés.

Les acides phénoliques

Un acide phénolique ou acide-phénol est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Les acides phénoliques sont des composés qui ont des propriétés antioxydantes.

Ils peuvent contribuer à prévenir l'apparition de plusieurs maladies (cancers, maladies cardiovasculaires et maladies liées au vieillissement) en neutralisant les radicaux libres de l'organisme. **Laguerre, M (2007).**

+

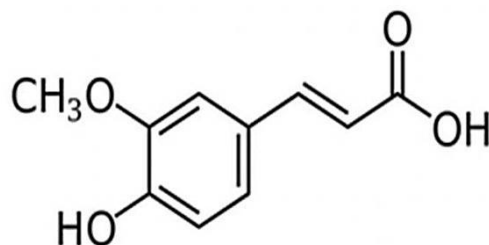


Figure8: structure acide phénolique

2.2.2 Les composés azotés

Les alcaloïdes

Substance organique, basique (goût amer), azotée, généralement hétérocyclique, d'origine végétale (rarement animale), douée de propriétés physiologiques remarquables (toxiques ou thérapeutiques), telle que la morphine, la nicotine, la cocaïne et la quinine. **Mangambu M.. (2014).**

Il en existe environ 12 000 répertoriés à ce jour; les principaux précurseurs sont des acides aminés simples comme la tyrosine (Tyr), le tryptophane (Trp), l'arginine (Arg) ou la lysine (Lys). Ils sont stockés dans les cellules végétales au niveau des vacuoles. **Muniz M.N. (2006).**

. Ils possèdent de nombreuses propriétés pour la plante jouant un rôle de défense et sont également utilisés en médecine et pharmacie. Le principal rôle des alcaloïdes est de défendre la plante contre les mammifères et les insectes. **Ali-Dellile L., (2013).**

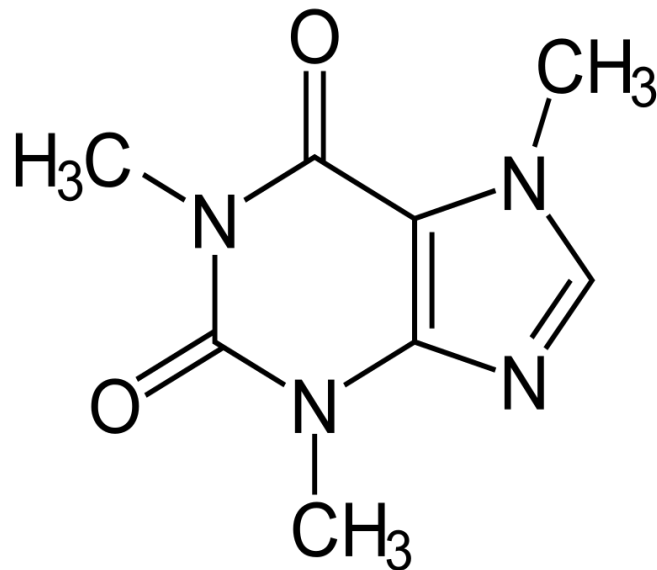


Figure 9: Structure générale des alcaloïdes

Les terpénoïdes (Les terpènes)

Les terpénoïdes sont des molécules à nombre de carbones multiple de 5, et dont le précurseur est l'isoprène. Ce sont des lipides synthétisés à partir de l'acétyl-CoA, ce sont donc des molécules hydrophobes. Il existe 20 000 molécules connues avec comme motif commun cette base isoprène. Les terpénoïdes sont stockés dans les vacuoles au niveau des épines, des racines ou encore des feuilles (**Rouessac, F ; et Rouessac, A. 2004**).

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures, produits par de nombreuses plantes, en particulier les conifères. Ce sont des composants majeurs de la résine et de l'essence végétale. Les terpénoïdes sont également utilisés au développement de la plante (certains terpénoïdes stimulent la croissance des feuilles) (**Klaas, C. A., Wagner 2002**).

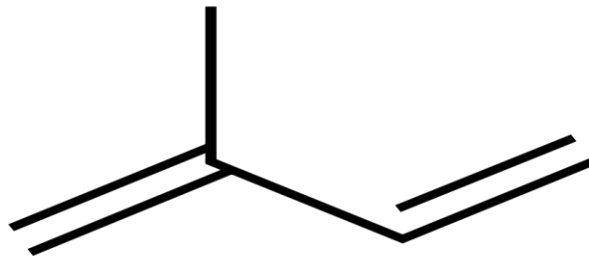


Figure10 : structure chimique de base des terpènes.

2.2.3 Les terpénoïdes (Les huiles essentielles)

Les Huiles essentielles sont des molécules aromatiques, volatiles qui dégagent des odeurs caractéristiques et on trouve ces molécules dans les organes sécréteurs (Iserin et al. 2001).

1.3 Les Compléments alimentaires

1.3.1 Définition d'un complément alimentaire

A mesure d'un mode de vie particulier de certaine population dont leur régime alimentaire n'est pas vraiment équilibré (femmes enceintes, personnes âgées, sportifs, personnes à maladies chronique ...), il est nécessaire qu'il soit complété par des apports en vitamines, minéraux et autres nutriments par les compléments alimentaires dans la plupart des cas donnent des résultats satisfaisants (Valette, 2015).

Contrairement aux idées reçues, les compléments alimentaires ne sont en aucun cas des médicaments. En effet, ils n'ont pas le pouvoir de traiter ni de prévenir d'éventuelles maladies. Ils ne disposent pas de vertu thérapeutique. Par contre, ils peuvent interférer sur des pathologies causées par des carences alimentaires (Valette, 2015).

La directive N°2002/46/CE permet d'établir une définition complète et commune des compléments alimentaires au niveau Européen. D'après cette directive, « les compléments alimentaires, et les denrées alimentaires ont pour but de compléter le régime alimentaire normal qui constituent une source concentrée de nutriments ou d'autres substances ayant un effet nutritionnel ou physiologique seul ou combiné, commercialisés sous forme de doses, à savoir les formes de présentation telles que les gélules, les pastilles, les comprimés, les pilules et autres formes similaires, ainsi que les sachets de poudre, les ampoules de liquide, les flacons munis d'un compte-gouttes et les autres formes analogues de préparations liquides ou en poudre destinées à être prises en unités mesurées de faible quantité» (Directive 2002/46/CE , 2002).

Les comportements relatifs à la santé et à l'alimentation peuvent varier d'un pays à l'autre, il est donc important de mener des études nationales sur la consommation de compléments alimentaires.

Traditionnellement, en Algérie les compléments alimentaires à base de plantes sont bien connus sur le plan commercialisation et utilisation , mais inconnus sur le plan

scientifique. Ces produits bénéficient d'une forte confiance concernant leur sécurité d'utilisation et leur consommation sans risque ; une étude a montré que 63 % de la population enquêtée consommant les compléments alimentaires se plaignaient de symptômes cardiovasculaires et 30% d'allergies cutanées. Ceci va permettre d'une part, d'évaluer les risques qui sont mal connus par la population et d'autre part de vérifier la conformité de ces produits à la réglementation car les compléments alimentaires ne sont pas tous des produits inoffensifs, leur mésusage peut conduire à des effets indésirables et des intoxications graves (**Chermat et al., 2018**). C'est pourquoi l'intégration de normes ISO 2200 sont obligatoire afin de mieux cerner ce problème et prendre de nouvelles dispositions réglementaires et analyser ces produits avant leur commercialisation.

Le décret du 20 mars 2006 précise que des ingrédients ne peuvent être employés dans la fabrication des compléments alimentaires « que s'ils conduisent à la fabrication de produits sûrs, non préjudiciables à la santé des consommateurs, comme cela est établi par des données scientifiques généralement acceptées ». Seuls peuvent être utilisés pour la fabrication des compléments alimentaires les nutriments, les substances à but nutritionnel ou physiologique, les plantes et les préparations de plantes, ainsi que les autres ingrédients dont l'utilisation en alimentation humaine est traditionnelle ou reconnue comme telle, les additifs alimentaires, les arômes et les auxiliaires technologiques (Rapport de l'académie nationale de pharmacie , 2018).

1.3.2 Définition d'un nutriment

Il est connu que les nutriments sont les vitamines et les minéraux qui constituent une famille essentielle et une des plus consommée des compléments alimentaires. Les vitamines ne sont pas synthétisées par notre organisme (à l'exception de la vitamine D), on les retrouve dans notre alimentation. Les industriels les extraient donc à partir d'aliments et les concentrent sous différentes formes pharmaceutiques (comprimés, gélules, solutions buvables...). Les vitamines utilisées dans la fabrication des compléments alimentaires sont : les vitamines A, D, E, K, B1, B2, B6, B12 et C, la Niacine, l'acide pantothénique, l'acide folique et la biotine. La commercialisation des

vitamines en tant que compléments alimentaires est très encadrée par les autorités : l'arrêté du 9 mai 2006 (Caro *et al.*, 2010)

Les quantités minimales et maximales, de vitamines et de minéraux présents dans les compléments alimentaires, sont fixées en fonction de :

- La portion journalière recommandée.
- La recommandation du fabricant.
- Les limites supérieures de sécurité selon le groupe de consommateurs.
- Les quantités maximales et minimales sont arrêtées selon la procédure de la Décision 1999/468/CE (Decision 1999/468/CE, 1999).

Les nutriments pouvant être aussi définis comme les additifs, les arômes et les auxiliaires technologiques dont l'emploi est autorisé dans l'alimentation humaine et dans les conditions prévues dans la réglementation (Precepta, 2007).

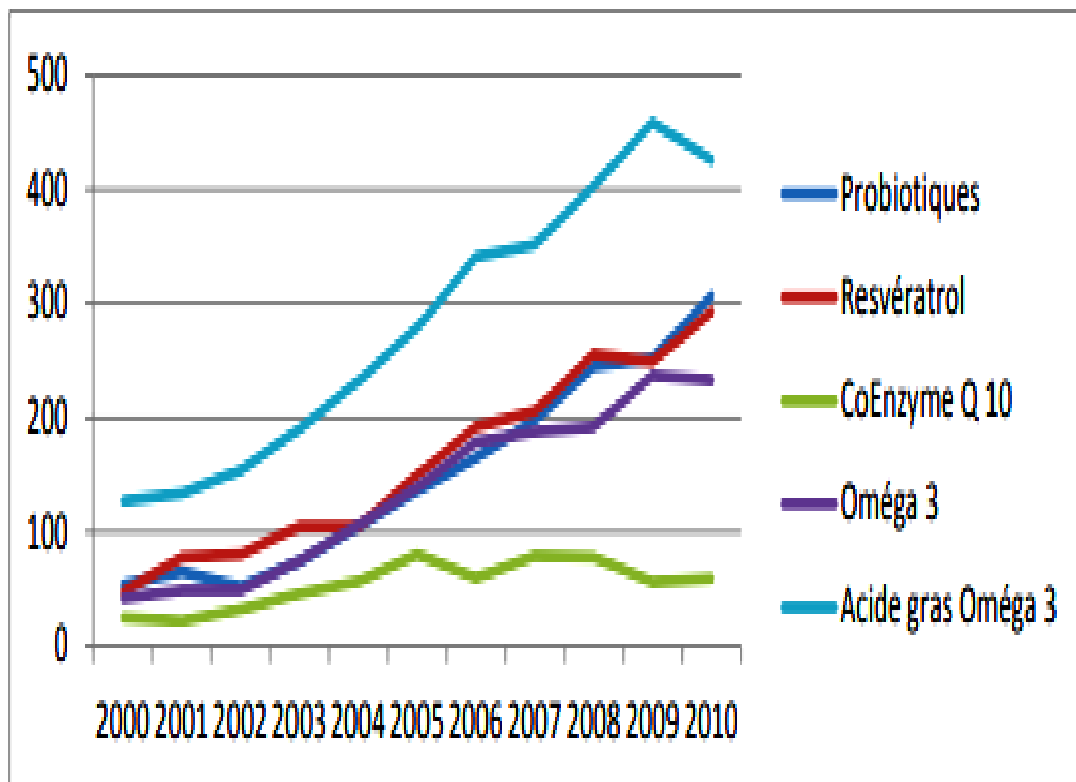


Figure 10 : Nombre d'articles scientifiques par terme et par année de 2000 à 2010 (Mylle, 2012)

|

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II Matériel et méthodes

II.1 Matériel végétal

Le matériel végétal est le premier maillon essentiel de la chaîne de la production agricole qui conduit vers un circuit commercial. Dans le domaine consacré au complément alimentaire dans notre étude nous avons utilisé les **feuilles** de la plante *Moringua olifeira*

II.2 Méthodes utilisées

II.2.1 Préparation des poudres de plantes

La transformation des feuilles de plantes en poudre consiste en différentes étapes qui sont l'effeuillage, lavage, égouttage, séchage, broyage et enfin le tamisage:

Deuxième Séchage

Les feuilles de Moringa importés nécessitent un séchage naturel/ traditionnelle dans une pièce bien sombre et fraîche qui n'es pas humide et qui doit être protégée des insectes, rongeurs et de la poussière, puis les feuilles sèches obtenues sont mises dans des sacs à tissus de 10 kg à 100 kg. Si l'humidité est élevée, le séchage électronique est exigé par la norme ISO à l'aide d'un déshydrateur alimentaire qui est un appareil électrique qui chauffe et fait circuler de l'air dans une cage fermée, où l'on place les feuilles sur des plateaux. L'air chaud chauffe ainsi les feuilles pour que l'eau qu'ils contiennent s'évapore ; la perte de l'eau et de son humidité permet d'augmenter la durée de conservation de cette dernière, la Moringa nécessite 1h30 à 2h à 65°C ; l'*Artemesia annua* nécessite 12h à 35°C ; pour l'ortie 24h à 65°C, ainsi que pour le brocoli et pour la pervenche.

- **Broyage**

Les feuilles sont broyées par un broyeur (Annexe I.5-I.6) qui est un moulin à grain électronique contenant deux lames de six pages : couteau à poudre, couteau rotatif, couteau à dépoussiérer, écrasement de la lame en acier inoxydable, aucune compression, bonne pulvérisation avec une lame amovible et nettoyable. La poudre

des plantes utilisées est réalisée par une pulvérisation de 10 secondes répéter de 3 à 5 fois.

- **Tamisage**

Il faut tamiser la poudre de feuilles si nécessaire avec un tamis (Annexe I.3-I.4) de laboratoire ou tamiseuse qui est généralement requis afin d'assurer une action uniforme pour avoir une poudre bien homogène

- **Conditionnement de la poudre**

Une fois la poudre est bien tamisée on doit la mettre dans des sacs est les sous-vidés de cette manière que l'aire ne se diffuse pas dans le sac (Annexe I.15-I.16-I.17-I.18).



I.10.Feuilles de Moringa Oleifera à broyer



I.11.Obtention de la poudre de Moringa Oleifera

II.2.2 Identification des principes actifs par HPLC

Extraction des flavonoïdes

Préparation de l'éthanol à 80%

Pour 800 ml de l'éthanol à 80%, nous avons besoin de 640 ml de l'éthanol à 100% (Annexe II.1) et 160 ml de l'eau distillé par l'utilisation des étuves graduées (Annexe II.2) puis mélanger les deux préparations pour l'obtention de l'éthanol a 80%.

Préparation de l'Extrait éthanolique

Peser 150g de la poudre de feuilles de la plante (Annexe II.3), puis transferer la poudre dans un erlenmeyer (Annexe II.4), suivie par l'ajoute de 800ml de l'éthanol à 80% déjà préparer (Annexe II.5), mélanger bien et laisser agir pour 48h.

Après 48h, filtrer l'extrait obtenue (Annexe II.7-II.8), on met l'extrait obtenue dans un flacon étiqueté et on le garde dans le réfrigérateur (Annexe II.9).puis on passe à l'étape de l'évaporationde l'extrait obtenue par l'évaporateur rotatif.

Analyse Qualitative des flavonoïdes

La séparation des flavonoïdes a été réalisée par un système HPLC Shimadzu avec un détecteur UV, une colonne chromatographique C18 (4,6 X 25 mm, 5 µm).

La température de la colonne était maintenue à 45 °C. La phase mobile est composée d'un solvant (A) : un mélange d'eau (80 %), acétonitrile (19 %), et acide formique (1 %), et d'un solvant (B) : un mélange d'acétonitrile (59 %), méthanol (40 %) et acide formique (1 %).

L'élution était réalisée selon le programme suivant, (Tableau 2):

Tableau 2: Programme d'élution pour l'analyse qualitative des flavonoïdes

Temps	Solvant B, %(v/v)
0	0
0-5	5
5-15	15
15-20	20
20-40	60
40-45	100
45-50	0

Le débit était de 1 ml/min, le volume d'injection était de 10 µl et la détection s'est faite à une longueur d'onde de 350 nm. La concentration de la solution injectée était de 5 mg/ml pour l'extrait méthanolique et de 1 mg/10 ml de standard pur dans du méthanol.

II.1.2. Dosage des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode adaptée par Zhishen (Zhishen et *al.*, 1999).

➤ Principe

Le dosage est basé sur la formation de complexes entre les flavonoïdes et le trichlorure d'aluminium. Les complexes produits, de couleur jaune, absorbent dans le visible à 510nm.

➤ Mode opératoire

500µL des extraits bruts sont mélangés avec 2mL d'eau distillée, et additionnés de 150µL de nitrite de sodium (NaNO₂) à 5%. Après 5min d'incubation, 100µL de trichlorure d'aluminium à 10% est rajouté au mélange. Après une nouvelle incubation de 6min, ajouter 1mL de carbonate de sodium 1M. Le mélange est complètement agité afin d'homogénéiser le contenu et l'absorbance de la solution est déterminée à 510nm contre un blanc. Une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle dans les mêmes

conditions opératoires en utilisant la quercétine comme contrôle positif.

La teneur en flavonoïdes totaux est exprimée en milligramme (mg) équivalent de quercétine par gramme de matière végétale sèche (mg EQ/g MS).

II.2.2 Evaluation des activités biologiques

Activité anti-oxydante

L'activité antioxydante a été évaluée par la méthode de piégeage du radical diphénylpicrylhydrazyl (DPPH), selon les recommandations de Boulila et *al.*, 2015.

➤ Principe

La méthode au diphenyle-picryl-hydrazyl (DPPH) est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable (DPPH) en présence d'un antioxydant, donneur d'hydrogène (AH), ce qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire, le DPPH-H. La réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, initialement violet foncé sous sa forme libre, devient jaune pâle après transfert d'électrons par des composés antioxydants.

Cette réduction qui se traduit par une diminution de l'absorbance de la solution de DPPH• est suivie par spectrophotométrie à 515nm par rapport à un standard, l'acide ascorbique.

➤ Mode opératoire

2mL d'une solution méthanolique de DPPH, préparée à 0,04gr/l, sont ajoutés à 1mL de chacune des dilutions de l'extrait méthanolique et de l'acide ascorbique. Après 60 min d'incubation à l'abri de la lumière, les absorbances sont lues à 515nm. Les courbes exprimant le pourcentage de piégeage du DPPH en fonction de la concentration, en mg/mL, de l'extrait méthanolique et celle de l'acide ascorbique sont tracées.

Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée par la méthode de dénaturation des protéines, selon les recommandations d'Alhakmani (Alhakmani et *al.*, 2013).

➤ **Mode opératoire**

Le mélange réactionnel est constitué de 2ml d'extrait méthanolique de l'espèce étudiée à différentes concentrations (100-500µg/ml) et 2,8ml d'eau distillée ajustée à pH= 6,4 (tampon PBS), auquel est ajouté 2ml d'albumine d'œuf. Le tout est incubé à 37°C pendant 15 minutes. La même expérience est répétée avec l'acide acétylsalicylique, utilisé comme standard. La dénaturation est induite en mettant le mélange réactionnel dans un bain-marie chauffé à 72°C pendant 10 minutes. Après refroidissement, l'absorbance est mesurée à 660nm en utilisant l'eau distillée comme blanc.

Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été évaluée en deux étapes :

- La sensibilité des souches bactériennes aux différents extraits a été recherchée par la méthode de diffusion sur disques.
- La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été réalisée par la méthode des micro-dilutions.

➤ **Mode opératoire**

▪ **Test de sensibilité**

Des suspensions bactériennes ont été préparées dans une solution physiologique à partir de colonies jeunes (18-24H), en ajustant la turbidité à 0,5 McFarland. À l'aide d'un écouvillon stérile, les bactéries en suspension ont étéensemencées sur une surface gélosée sèche (gélose Mueller- Hinton liquéfiée, coulée et refroidie dans des boites de Pétri). Des disques stériles de papier (6 mm de diamètre) ont ensuite été placés puis imprégnés de 10µL d'extrait méthanolique. Les boites ont été incubées à 37°C pendant 24H.

La souche est considérée comme résistante pour un diamètre inférieur à 8mm, modérément sensible entre 8 et 14mm, sensible pour un diamètre d'inhibition entre 14

et 20mm et très sensibles si le diamètre est supérieur à 20mm.

Détermination de la concentration minimale inhibitrice des extraits

Des suspensions bactériennes des cellules bactériennes jeunes ont été préparées dans des tubes stériles, contenant de l'eau physiologique à une valeur de 0,5 McFarland. Ces derniers, doivent être utilisés dans les 30min suivantes pour éviter le changement du nombre de cellules bactériennes. Dans les puits des plaques de micro-tubes, on mélange 50µl des différentes dilutions des extraits méthanoliques, préparées dans le DMSO, avec 100µl de Mueller Hinton liquide (MH liquide + rouge de phénol 20mg/ml et du glucose 20g/ml).

On ajoute dans chaque puits, 50µl de chaque suspension bactérienne. Pour vérifier que les résultats de sensibilité sont exacts, il faut inclure un témoin positif et un autre négatif pour chaque souche. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24H.

II.2.3 Analyse physico chimique

- Teneur de la matière sèche et humidité – NA 1213 (étuvage) -

➤ Principe

La connaissance de l'extrait sec du produit est très importante dans la mesure où elle peut expliquer le comportement de la matière et son interaction avec le milieu externe. La détermination de la matière sèche est basée sur la perte d'eau suite à une dessiccation.

➤ Mode opératoire

On sèche les capsules avec leurs couvercles dans l'étuve pendant 30 minutes à 105°C puis les refroidir dans un dessiccateur (Annexe III.2).

On met 2g d'échantillon dans les capsules puis les étuvés à 105°C jusqu'à poids constant. Formule et calcule :

M : Matière sèche.

$$M_{\text{sèche}} = [(m_1 - m_0) / P_e] \times 100$$

Pe : Masse de la prise d'essai.

m0 : masse de la capsule vide et couvercle.

m1 : masse de la prise d'essai et capsule avec couvercle sortie d'étuve.

W : teneur en eau.

$$W = 100 - M_{\text{sèche}}$$

- Détermination des cendres brutes -NA 650 (calcination)-

➤ Mode opératoire

Chauffer les capsules dans le four pendant 30 minutes à 550°C, puis on pèse.

Mettre 2g de l'échantillon dans les capsules refroidi puis incinérer dans le four à 550°C jusqu'à poids constant (Annexe III.4).

➤ **Formule et calcul**

C : cendre.

$$C = (m_2 - m_0) \times 100 / m_1$$

m0 : poids de la capsule vide.

m1 : poids de la prise d'essai.

m2 : poids de la prise d'essai après four.

☐ **Teneur en matière grasse – Extraction au Soxhlet-**

➤ **Réactifs**

Ether de pétrole température d'ébullition entre 60°C et 80°C.

➤ **Mode opératoire**

☐ **Extraction** : on met 2g d'échantillon dans un volume d'éther de pétrole, on le laisse pendant quelques heures ou une nuit.

☐ **Distillation** : Distillation l'éther de pétrole à l'aide d'un rota vapeur.

☐ **Etuvage** : étuvé le ballon avec son résidu pendant 1 heure, puis peser à chaque fois jusqu'à poids constant (Annexe III.7).

➤ **Formule et calcul**

MG : Matière grasse exprimé en

%.

$$MG = (m - m_0) / P_e \times 100$$

m : masse du ballon avec

résidu. **m0** : masse du ballon

vide.

Pe : masse de la prise d'essai.

• **Teneur en protéine brute – méthode de Kjeldahl –**

➤ **Réactifs**

- ❖ Sulfate de potassium
- ❖ Sulfate de cuivre II penta Hydrate.
- ❖ Acide sulfurique pure.
- ❖ Solution de NaOH 40% (m/V).
- ❖ Solution de NaOH : 0.1mol/L.
- ❖ Solution de H₂SO₄ : 0.1mol/L.

➤ **Mode opératoire**

Minéralisation :

1g d'échantillon + 15g de sulfate de potassium + 1g sulfate de cuivre+ 25ml H₂SO₄ chauffer, après apparition de couleur verte compter 2 heures, et on ajoute 50ml eau.

Distillation :

L'ajout de 100 ml de NaOH 40% , puis distillé complètement.

Tirage :

Plonger l'extrémité de réfrigérant dans 25ml de H₂SO₄ + rouge de méthyl. Titré avec le NaOH: 0.1N
Virage du rose au jaune

➤ **Formule et**

calculeP : protéine exprimée

$$P = [(v-v_0) \times C \times 0.014 \times 100 \times 6.25] / m$$

en %

v₀ : volume de l'essai à blanc.

v : volume titré.

C : concentration du NaOH :0.1 mol/L.

m : prise d'essai.

- **Détermination du pH - Afnor, 1986-**

- **Principe**

Détermination en unité pH de la différence de potentiel existant entre deux (02) électrodes plongées dans le produit à analysées.

- **Mode opératoire**

On plonger l'électrode dans le produit (poudre de feuille du *M.oleifera* et en notant la valeur enregistrée bien sur après étalonnage du pH-mètre avec l'utilisation des solutions tampons(Annexe III.1).

- **Expression des résultats**

La valeur du pH prise en considération correspond à la moyenne arithmétique des différentes valeurs enregistrées.

NB : Avant chaque nouvelle mesure, on rince soigneusement l'électrode avec l'eau distillée et sécher à l'aide de papier joseph ou papier filtre.

- **Glucides**

$$100 - (\text{humidité} + \text{protéine} + \text{matière grasse} + \text{minéraux})$$

Extraits secs

- **Valeurs énergétiques**

Kcal : la somme (matière grasse×9 + protéine×4 +

glucides×4) Kj : la somme (matière grasse×37 +

protéine×17 + glucides×17)

- **Sel (Nacl)**

- **Mode opératoire**

Peser 2g dans 50ml notre indicateur est le dichromate de potassium puis titrer avec le nitrate d'argent 0.1N (Annexe III.8).

On remarque le virage des couleurs vers le rouge brique

□ **Formule et calcul**

(V de la chute × la concentration de AgNO₃ × la masse molaire du sel (NaCl) 5.85) / (la prise d'essais)

• **Teneur en fibre (cellulose)**

□ **Réactifs**

Solution de H₂SO₄ : 0.13 mol/l.

Solution de NaOH: 0.23 mol/l.

□ **Mode opératoire**

-Peser le creuset vide. Noter la masse.

-Digestion acide : Bouillir 2g d'échantillon dans 150ml H₂SO₄ : 0.13mol/l pendant 30 mn puis filtrer et laver avec l'eau chaude 3 fois.

-Digestion basique : Bouillir le résidu filtré dans 150ml NaOH : 0.23mol/l pendant 30 min , filtrer et laver avec l'eau chaude 3 fois.

-Etuve : Euvé le résidu filtré de la digestion pendant 1 heure à 130°C, puis peser.

-Incinération : Mettre dans le four à 550°C pendant 1 heure, puis peser.

□ **Formule et calcul**

C : cellulose exprimée en %

$$C = (b - c) / m \times 100$$

b : prise d'essai en g

c : perte de masse à l'étuve.

m : perte de masse à la calcination.

• **Calcium**

Incinération de la prise d'essai dans un four à moufle à 550°C puis traitement des cendres obtenues par l'acide chlorhydrique 6N, filtration sur papier filtre.

Précipitation du calcium sous forme d'oxalate de calcium par l'oxalate d'ammonium (pH de précipitation 4.4-4.6), dissolution du précipité par l'acide sulfurique et titrage de l'acide oxalique formé par le permanganate de potassium (0.1 mol/l).

La teneur en calcium exprimée en grammes par 100 grammes d'échantillon, est égale :

$$\frac{2,004 \times V1 \times CV}{m \times V2}$$

V1 : volume en ml de la solution de permanganate de

potassium V : volume en ml de la fiole jaugée (250ml)

V2 : volume en ml de la partie aliquote

m : est la masse de la prise d'essai de l'échantillon.

La spectroscopie de flamme est une technique analytique utilisée pour la détermination qualitative et quantitative d'un élément dans un échantillon.

Les radiations émises par une lampe à cathode creuse réalisée avec l'élément à doser, traversent une flamme air-acétylène dans laquelle on pulvérise la solution de l'échantillon à analyser. Les éléments dissociés de leurs composés chimiques et à l'état fondamental absorbent les radiations provenant de la lampe à cathode creuse, d'où abaissement de l'intensité de la lumière reçue par le photomultiplicateur.

L'absorbance est proportionnel à la concentration des atomes libres dans la flamme, donnée par la loi de Lambert Beer :

$$\text{Absorbance} \propto \log \frac{I_0}{I_1} \propto K \cdot C \cdot L$$

I_0 : intensité du rayonnement incident émis par la source

lumineuse I_1 : intensité du rayonnement émis (quantité non absorbée)

K : constante (peut être déterminée expérimentalement) **C** : concentration de l'échantillon

L : longueur du trajet

optique En pratique :

Pour la détermination des concentrations des échantillons la loi de Lambert Beer est simplifiée à : $A = f(c)$

A : absorbance de

C : concentration de l'échantillon.

Minéralisation par voie sèche de l'échantillon et voie humide des minéraux et Oligo-éléments .

- **Métaux lourds :**

Incinération de la prise d'essai dans un four à moufle à 550°C puis traitement des cendres obtenues par l'acide chlorhydrique 6N, filtration sur papier filtre.

Analyses	Longueur d'ondes
magnésium	285.2 nm gamme d'étalon : 0,1-0,4 mg/l
Potassium	766.5 nm gamme d'étalon : 0,4-1,5 mg/l
Sodium	589 nm gamme d'étalon : 0,4-1,5 mg/l
Fer	248.3 nm gamme d'étalon : 2-9 mg/l
Plomb	217 nm gamme d'étalon : 2.5-20 mg/l
Cadmium	228.8 nm gamme d'étalon : 0.2-1.8 mg/l
Chrome	357.9 nm gamme d'étalon : 2-15 mg/l
Mercure	253.7 nm gamme d'étalon : 20-100 mg/l

II.2.4 Analyses microbiologiques

- **Détermination des coliformes**

Les coliformes ont été déterminés selon la méthode ISO 4832. La recherche repose sur l'utilisation du Nombre le Plus Probable (NPP). Le Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant (BLBVB ; OxoidCM 31) a été utilisé comme milieu d'incubation et l'ensemencement a été réalisé dans la masse de la gélose à raison de 1 ml des dilutions 10-1 et 10-2. L'incubation a été faite à 30 °C ± 1 °C dans une étuve de marque Memmert pendant 24 à 48 heures.

□ **Détermination des levures et des moisissures**

Les moisissures ont été déterminées selon la méthode ISO 7957. Le milieu de culture utilisé est la gélose glucosée à l'oxytétracycline et l'ensemencement a été fait à raison de 0,1 ml de la suspension- mère en surface de la gélose et étalée. L'incubation a été faite à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ dans une étuve de marque Memmert pendant 5 jours et la lecture a été faite tous les jours. Les levures, colonies muqueuses et brillantes ont été reprises et réisolées sur la gélose Sabouraud, puis soumises à une identification complète à l'aide de la galerie ID 32 C. Quant aux moisissures elles ont été identifiées après purification et culture en couche à l'aide des clés.

□ **Détermination des spores de Clostridium sulfito-réducteurs**

Elles ont été recherchées selon la norme ISO 7954. Cinq millilitres du milieu Bacto-SulfiteAgar et 1 ml de la suspensionmère ont été pasteurisés à 80 °C dans un autoclave de marque Bosch pendant 10 mn. Les colonies caractéristiques de Clostridium sont de couleur noire (formation du sulfure de fer) et restent le long ou au fond du tube.

□ **Détermination des Salmonella sp**

La méthode utilisée est celle de la norme ISO 6579. Elle a consisté à ajouter à la PFMo de l'EPT. Ainsi, le mélange obtenu a été considéré comme le pré-enrichissement qui a été incubé à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ dans une étuve de marque Memmert pendant 24 h. Ensuite, un millilitre du mélange pré-enrichi a été incubé dans 9 ml de Rapaport-Vassiladis et incubé à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ dans une étuve de marque Memmert pendant 24 h. Le mélange ainsi obtenu a été incubé à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 24 h sur la gélose HEKTOEN. Les colonies suspectes (incolores ou incolores centre noir) ont été isolées à nouveau sur la gélose KLIGER (Hajna). L'identification a été réalisée à l'aide de la Xylose Lysine Décarboxylase (XLD) et de la gélose Triple Sugar Iron (TSI). Le test de l'uréase a été fait pour confirmer les Salmonella, sachant que Salmonella est uréase négative.

□ **Détermination de Staphylococcus aureus**

Ces bactéries ont été dénombrées selon la norme NF EN ISO 6888-1 (1999). 0,1 ml de la suspension mère a été étalé sur la gélose Baird-Parker (BP OXOID CM0275) supplémenté avec 50 ml d'émulsion de jaune d'œuf dans 1000 ml de milieu de culture. L'incubation a été faite à 37

°C ± 1 °C pendant 24 h. *S. aureus* donne des colonies noires, brillantes, convexes, de 1,5 mm de diamètre, entourées d'un halo clair (protéolyse) de 2 mm à 5 mm.

II.2.5 L'analyse des dangers

Nous avons réalisé une analyse des dangers pour déterminer quels sont les dangers à maîtriser, le degré de maîtrise requis pour garantir la sécurité des aliments ainsi que les combinaisons de mesure de maîtrise correspondantes requises et la détermination des niveaux acceptable et en fin d'établir un plan de surveillance convenable.

Cette étape se caractérise par l'identification :

De la nature des dangers : physique, chimique ou biologique.

- Le niveau de risque de chaque danger.
- Les différentes causes de ces dangers et les mesures préventives afin de les bien contrôler.
- L'évaluation de ces dangers, se fait suite à la détermination de l'indice de criticité selon la formule suivante et le tableau en (Annexe 2 ; 3) :

$$\text{Criticité} = \text{Gravité} \times \text{Fréquence d'apparition}$$

La détermination des (PRP PRPO) ou (CCP) dépend de cette criticité (Annexe 4) :

- **PRP** : Programme Pré requis ou les dangers peuvent être réglés avec une bonne hygiène
- **PRPo** : Programme Pré requis Opérationnelle : C'est une étape de la chaîne alimentaire où il est possible de mettre en place une mesure de maîtrise.
- **CCP** : Point Critique de Contrôle : C'est une étape de la chaîne alimentaire où il est nécessaire de mettre en place une mesure de maîtrise avec une limite critique dans ce cas le produit va être annulé

Chapitre III

Résultats et discussion

III Résultats et discussion

III.1 Formulation estimée du complément alimentaire

L'ensemble des informations listées dans le cahier des charges, ainsi que les recherches réalisées permettent alors de rédiger une formule théorique qui détaille les informations qualitatives et quantitatives du futur produit qui est notre complément alimentaire (tableau 3).

Tableau 3 : proposition de formulation de *Moringa oleifera* avec d'autres plantes

Formulation	Indication	Contre-indication	Principe actif
Moringa oleifera	Anti-apoptotique Anti-inflammatoire Anti-diabète Antianémique	Le consommer le soir peut provoquer des Troubles de sommeil Lors des premières prises elle peut provoquer de la diarrhée	Flavonoïdes :Quercétine kaempférol
	Anti-inflammatoire Activité antioxydante	Les rares contre-indication : nausées, diarrhées, allergies Chez l'homme, des troubles de l'érection sont possibles. Déconseiller aux femmes enceintes ou qui allaitent	Flavonoïdes :Quercétine kaempférol

III.2 Qualité du Produit

III. 2.1 Identification des Principes actifs

L'identification des flavonoïdes et molécules bioactives « **quercétine et kaempferol** » du *Moringa oleifera* a été effectuée par l'HPLC. Les résultats obtenus sont présentés, dans la figure (11)

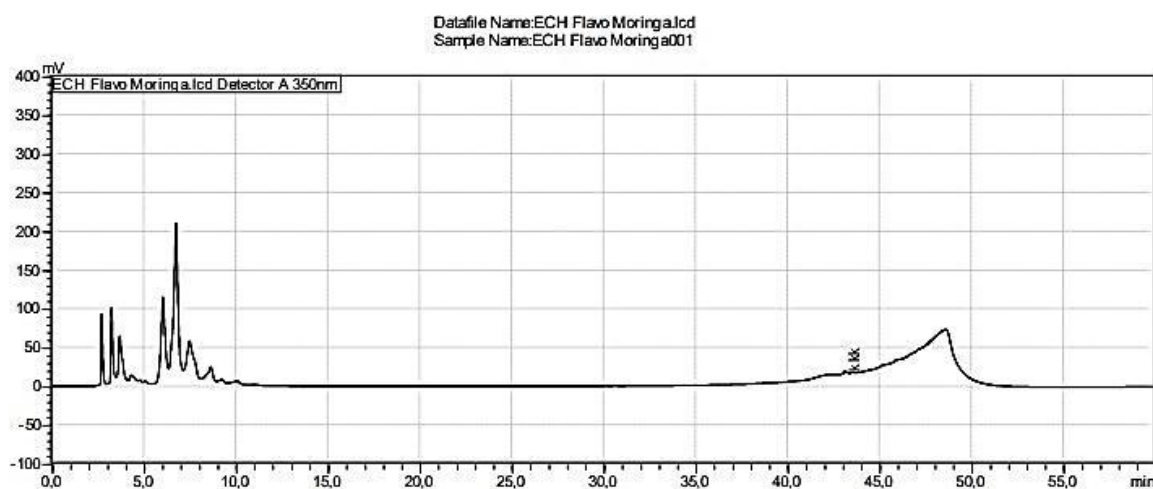


Figure 11 : Chromatogramme d'HPLC

Tableau 4 : Les résultats explicatifs du chromatogramme d'HPLC (Originale)

T_R (min)	T_R standard (min)	Identification
2,720	/	Non identifié
3,260	3.338	Acide chlorogénique
3,704	/	Non identifié
6,046	5.885	Isoquercétine
6,757	/	Non identifié
7,497	/	Non identifié

Les résultats obtenus par l'analyse qualitative d'HPLC qui sont présentés dans le tableau V peuvent confirmer la présence des molécules bioactives acide chlorogénique et l'isoquercétine.

Cette dernière est une dérivée de la quercétine dans le *Moringa oleifera* auquel le TR 6.046 min est proche du TR standard 5.885 min.

L'étude de Margareth et *al.*, (2015) consiste à identifier qualitativement les molécules bioactives l'isoquercétine et le Kaempferol, ainsi, l'acide chlorogénique (Margareth et *al.*, 2015), il a identifié les flavonoïdes dans le *Moringa oleifera* et quantitativement en valeur de :

- Acide chlorogénique (79.31 mg/g)
- Quercétine (137.81 mg/g)
- Isoquercitrine (75.65 mg/g)
- Kaempferol (106.75 mg/g)

Ces résultats Margareth et *al.*, (2015) montrent la présence de la molécule bioactive kaempferol dans les feuilles de *Moringa oleifera*, dans notre cas on n'a pas pu identifier cette molécule en raison de manque de l'étalon (kaempferol) (Margareth et *al.*, 2015).

III.2.2 Dosage des Flavonoïdes

Les taux des flavonoïdes d'extrait de *moringa* sont calculés à partir de la courbe d'étalonnage, tracée en utilisant la quercétine comme standard (Figure 22). Il est exprimé en terme de mg EQ/gr MS (Tableau VI). Les résultats de dosage des flavonoïdes effectués sur la *moringa* sont présentés ci-après :

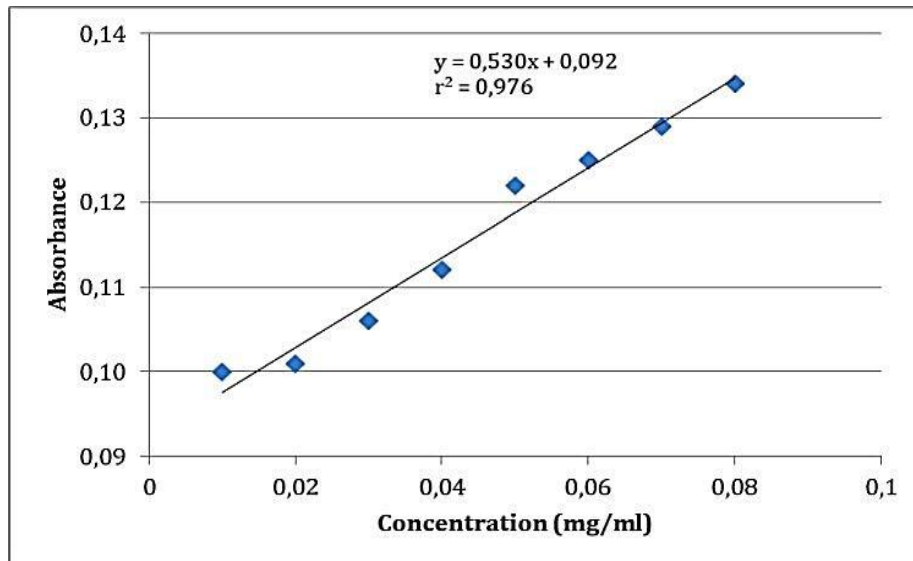


Figure 12 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes

D'après les résultats obtenus, on déduit que le *Moringa oleifera* présente un taux plus élevé de teneurs en flavonoïdes qui enregistrent 12.547 mg EQ/g .

Nos résultats rejoignent les résultats de Fachriyah et *al.*, (2020) qui montrent que l'extrait de *Moringa oleifera* Indonésien représente 10.77 mg EQ/gr des flavonoïdes qui ont enregistré un teneur élevé par rapport aux autres plantes (Fachriyah et *al.*, 2020).

III.2.3 Evaluation des activités biologiques

Nous avons évalué les activités biologiques (antioxydante, antiinflammatoire et antibactérienne) afin de valoriser les effets nutritionnels de *moringa oleifera*. Les résultats obtenus sont les suivants :

- **Activité anti-oxydante**

L'activité antioxydante de *Moringa* a été évaluée par le test de DPPH. La courbes de piégeage antioxydantes tracées en utilisant l'acide ascorbique (Figure 13) et la méthode de piégeage du radical DPPH comme étalon en fonction de la concentration de l'extrait de la plante **Figure 14** , et sont exprimés en mg/ml (Tableau 5).

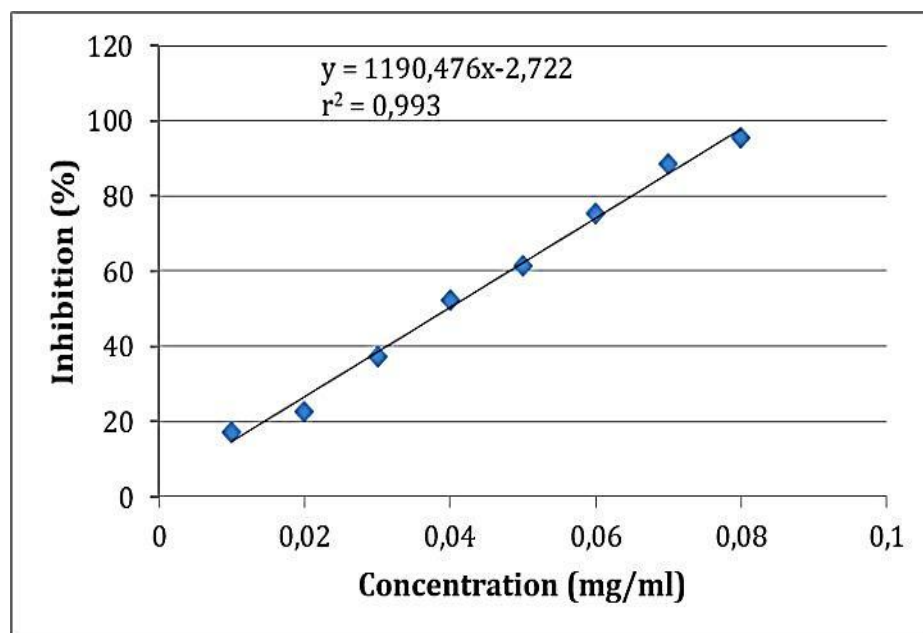


Figure 13 : Pourcentage de piégeage du radical DPPH en fonction de la concentration de l'acide ascorbique(Originale)

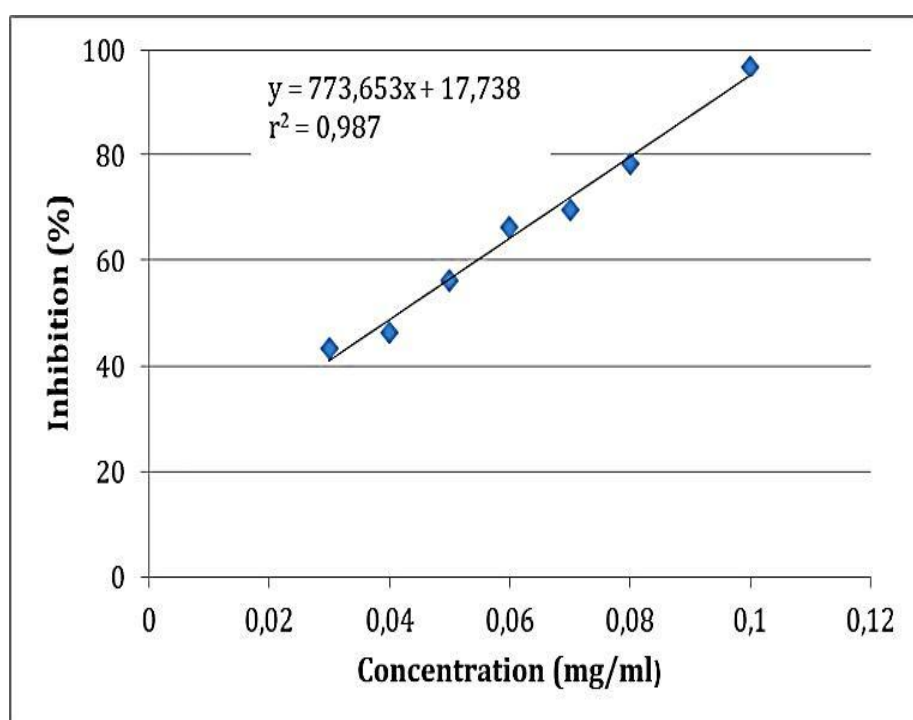


Figure 14 : Pourcentage de piégeage du radical DPPH en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique du moringa(Originale)

Tableau 5 : Valeurs des concentrations inhibitrices à 50% (IC50) (Activité anti-oxydante) (Original)

Espèce	Acide ascorbique	<i>Moringa oleifera</i>
IC 50 (mg /ml)	0 ,040	0,042

Les résultats d'activité antioxydante de la plante étudiée montrent que, le *moringa* présentent une valeur proche et élevées par rapport aux la plante standard utilisé (Acide ascorbique) qui enregistre une valeur de 0.040 mg/ml.

Nos résultats rejoignent ceux d'Argolo et *al.*, (2012). Le Moringa présente une activité anti-oxydant, avec une valeur de 0.06mg/ml (Argolo et *al.*, 2012).

- **Activité anti-inflammatoire**

La *Moringa oleifera* constitue une source potentielle de **molécules bioactives** qui empêche la dénaturation des protéines tissulaires. L'aspirine est utilisée comme standard (Figure 17). Les résultats de l'activité anti-inflammatoire de cette plante sont représenté dans les figures et le tableau.6

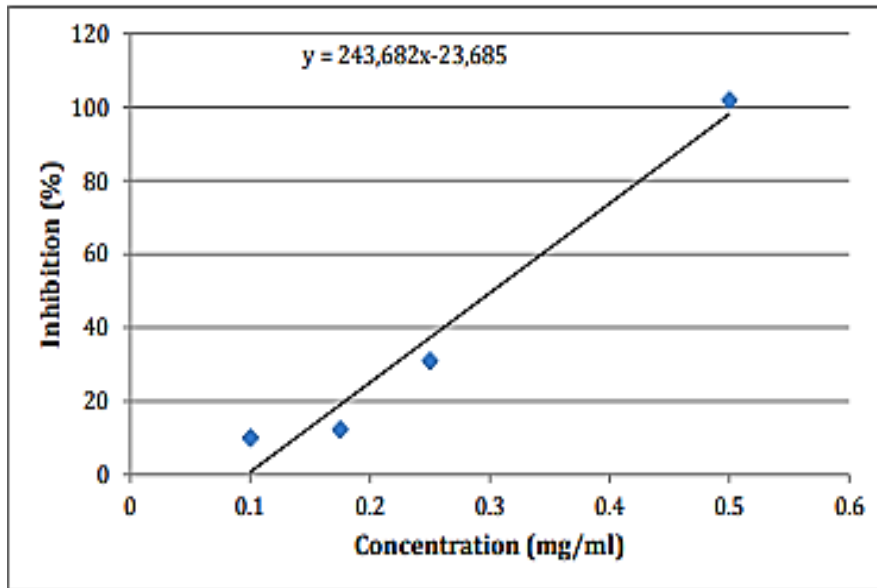


Figure 17 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction de la concentration de l'aspirine (Originale)

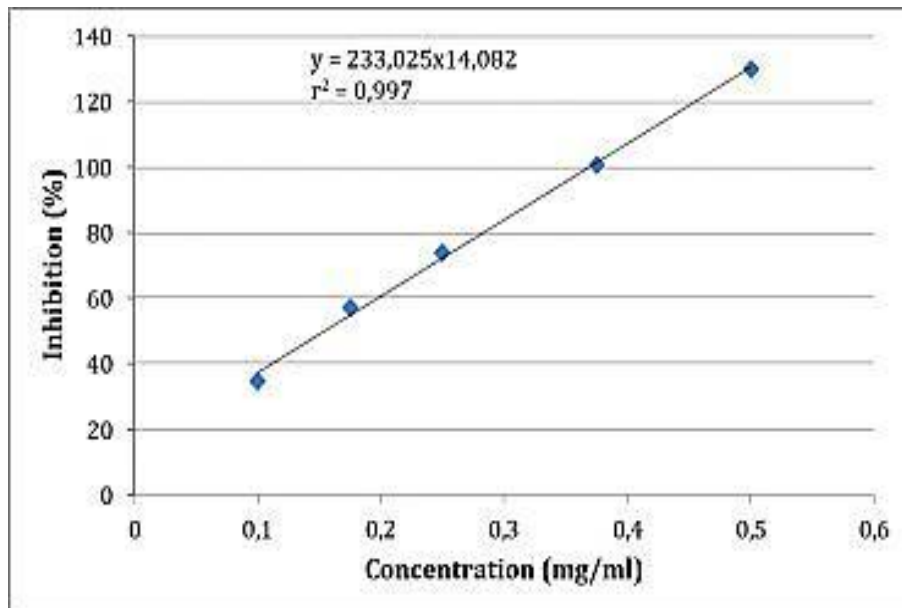


Figure20 : Pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines en fonction de la concentration de moringa (Originale)

Tableau 6 : Valeurs des concentrations inhibitrices à 50% (IC50) (anti-inflammatoire) (Original)

Espèce	Aspirine	Moringa oleifera
IC 50(mg /ml)	0,302	0,219

Les analyses de l'activité anti-inflammatoire effectuées pour *Moringa*, montrent que la plante possède une activité anti-inflammatoire, la moringa présente le taux élevé 0,219 mg/ml par rapport aux autres plantes et qui est proche du taux de standard utilisé 0,302mg/ml (Aspirine).

L'étude de Nidaye et *al.*, (2016) consiste à la mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire de sous-fraction méthalonique des feuilles de *Moringa oleifera*. Les résultats de cette étude montrent et confirment que les feuilles de *Moringa oleifera* possèdent majoritairement des substances chimiques polaires à activité anti-inflammatoire. Nos résultats sont en accord avec ceux de Nidaye et *al.*, (2016).

- **Activité antibactérienne**

L'activité anti-bactérienne avec l'extrait de la plante a été réalisée, en mesurant la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Tableau 7).

Tableau 7 : Sensibilité et CMI (mg/ml) des souches bactériennes testées aux extraits méthanoïques des deux espèces étudiées (Originale)

Espèce végétale	Moringa
Espèce bactérienne	
<i>Acinetobacter baumannii</i> NDM-1	2,2
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	R
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	3,33
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	2,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,5
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	R
<i>Serratia marcescens</i>	R
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	6,25

Les résultats d'activité antibactérienne de la plante *Moringa oleifera*, nous avons constaté, qu'il a une forte activité antibactérienne avec toutes les bactéries présentes dans le tableau mis à part *l'Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, et *Serratia marcescens*, qui sont résistantes.

Nous pouvons déduire que, l'espèce *Moringa oleifera*, a un **pouvoir antibactérien** élevé, donc, on peut fabriquer un antibiotique avec cette plante.

III.2.4 Analyse physico chimique

Nous avons réalisé des analyses physico-chimiques afin de confirmer la valeur nutritionnelle de *Moringa oleifera*. Le tableau ci-dessous résume les résultats de notre étude.

Tableau 8 : Résultats des analyses physico-chimiques de la poudre de *Moringa oleifera*.

Paramètres	Unité	Résultats	References
Glucide	g/100g	49.73	-
Fibre alimentaire	g/100g	6.34	Méthode de Weend
Protéine	g/100g	15.95	Méthode de Kjeldah
Matière grasse	g/100g	11.66	Extraction Soxhlet
Sel (Nacl)	g/100g	0.59	Méthode de Mohr
Valeur énergétique	Kcal/ 100g Kj/1 00g	367.66 1547.98	- -
PH a 10 % (20 ° C)	-	5.32	PH-mètre
Extrait sec	g/100g	90.73	Étuvage
Humidité	g/100g	9.27	
Cendre	g/100g	13.39	Calcination
Métaux lourds			
Teneur en Fer	g/100g	0.026	
Teneur en Plomb	g/100g	Non détectable	
Teneur en Chrome	g/100g	Non détectable	
Teneur en Cadmium	g/100g	Non détectable	
Teneur en Mercure	g/100g	Non détectable	
Sodium	g/100g	2	Spectrophotomètre a flamme
Potassium	g/100g	1.96	Spectrophotomètre a flamme
Calcium	g/100g	0.55	Spectrophotométrie
Magnésium	g/100g	0.37	Spectrophotométrie

Nos résultats obtenus montrent que, les valeurs nutritionnelles et énergétique du *Moringa oleifera* d'origine Algérien sont élevés par rapport a ceux de l'étude de Diagne et *al.*, (2005), dont le Moringa Nigérien est très connu mondialement par ses propriétés qualitatives ; concernant le calcium et le magnésium, ainsi que, le fer, ils sont dans les normes ; avec une zéro détection de métaux lourds qui veut dire que cette plante ne provoque aucune toxicité (Diagne et *al.*, 2005).

Suite à l'étude de danger de la norme ISO 22000, on peut déduire que le mauvais séchage ou stockage de la plante met en conséquent le taux d'humidité plus élevé par rapport à la norme.

III.2.5 Formulation et Fabrication

- **La fabrication**

Après la formulation, dont on a élaboré notre produit en fonction des allégations souhaité et sélection de la matière première la plus adaptée.

- **Fabrication**

Fabrication à grande échelle de notre complément alimentaire au format désiré à l'aide des gélules manuelles qui peut produire 400 gélules à la fois (Annexe V.2).

- **Conditionnement**

Accompagnement d'une boîte en plastiques comme packaging pour nos conditionnements(Annexe V.4).

- **Etiquetage**

Nous même profiler notre étiquette grâce à un logiciel et l'imprimer dans un papier autocollant de bonne qualité (Annexe V. 3).

- **Contrôle qualité**

Traçabilité des matières dans les résultats précédent et contrôle minutieux du processus de fabrication.

III.2.6. Analyse microbiologique

L'analyse microbiologique pour la matière première et de produit fini est une étape indispensable dans notre projet afin d'assurer la qualité de notre complément alimentaire. Les résultats sont représentés dans le tableau XI (Annexe VI) :

Tableau 9: Résultats d'analyses microbiologiques de la matière première (Original)

Determination	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Norme	Spécification
Coliformes thermotolérants	00	//	//	//	//	NF V08-017	< 100
Levures et Moisissures / g	2500	//	//	//	//	ISO 7954	<10000
S.R Clostridium 46°C	00	//	//	//	//	NA 15176	<100
Salmonella / 25g	Abs	//	//	//	//	ISO 6579	Abs dans 25g
Staphylococcus aureus	00	//	//	//	//	ISO 6888-1	/

Selon la bonne pratique de la norme ISO 22000 durant tout le processus de fabrication de la matière première au produit fini ce qui induit aux bons résultats et l'absence de différentes espèces bactériennes mis à part les levures et moisissures qui sont la conséquence d'une humidité élevée. Tous ces tests d'analyse sont exigés par la norme ISO 22000.

Suite au bon séchage effectué pour notre matière première, on a pu obtenir les résultats suivants qui montre que le taux de levures et moisissures sont diminuer avec une valeur de 1700 g (Tableau 10). Ce qui confirme l'origine et le seul problème durant tout notre travail.

Tableau 10 : Résultats d'analyses microbiologiques de produit final élaborer

Détermination	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5	Norme	Spécification
Coliformes thermotolérants	00	//	//	//	//	NF V08-017	< 100
Levures et Moisissures / g	800	//	//	//	//	ISO 7954	<10000
Clostridium S.R à 46°C	00	//	//	//	//	NA 15176	<100
Salmonella / 25g	Abs	//	//	//	//	ISO 6579	Abs dans 25g
Staphylococcus aureus	00	//	//	//	//	ISO 6888-1	/

III .2.6. L'analyse des dangers

Pour notre cas, on remarque dans les analyses physico-chimiques que le taux de l'humidité est élevé, donc la criticité de dangers biologique est :

Criticité = Gravité est de 2 x Fréquence d'apparition est de 4 car c'est très fréquent = **8**.
Donc, on détermine un PRPo ou on aura besoin d'un bon séchage avec un déshydrateur pour ne pas retomber dans un tel risque (Annexe VII.1).



**Prototype du complément alimentaire
« immune-Mori »**

Conclusion et perspectives

Les compléments alimentaires sont des denrées alimentaires, dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments : Vitamines, Magnésium, Fer, Calcium

Le travail que nous avons entrepris, nous a permis d'élargir nos connaissances dans le domaine commercial « phyto-thérapeutique » d'effectuer une étude consiste à la formulation et la fabrication d'un complément alimentaire à base de la plante miracle *Moringa oleifera*, dont son appellation « **Immune-Mori** » à partir des molécules s bioactives de cette dernière à l'échelle moléculaire.

L'application de la norme 22000 permet de démontrer une aptitude à identifier et à maîtriser les dangers liés à la sécurité des compléments alimentaires, cette norme est liée à l'approche HACCP qui a pour objectif la prévention, l'élimination ou la réduction à un niveau acceptable de tout danger « biologique, chimique, et physique » au regard de la sécurité des produits, mais aussi à fournir en permanence des produits finis et sûrs.

En perspectives, nous souhaitons de :

- 1- Reconnaître l'importance des différents végétaux médicinaux pour lutter contre la malnutrition et développer le tissu socio-économique du secteur agricole de l'Algérie
- 2- Mettre à disposition le *Moringa Oleifera* par un approvisionnement local pourrait permettre l'émergence de solutions pour lutter contre la malnutrition susceptible de toucher un nombre conséquent de foyers.
- 3- Évaluer la viabilité de la filière et ses conditions, et de proposer des recommandations d'actions comme désigner des producteurs pilotes, programmer des volumes de production, fixer des prix de référence ou encore créer des supports de sensibilisation
- 4- Établir des laboratoires spécifiques et fournir, faciliter aux étudiants la recherches phytothérapeutiques

Références Bibliographiques

Alhakmani F., Kumar S., Okindra A., et Khan A. (2013). Estimation of total phenolic

Ali-Dellile L., (2013). Les plantes médicinales d'Algerie. Berti Edition Alger 6_11

Al-zoreky, N.S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (punica grantum L.) Fruit peels. International Journal of Food Microbiology, 134: 244- 248

Amjad, M. S., Qureshi, H., Arshad, M., Chaudhari, S. K., Masood, M. (2015). The incredible

and medicinal properties of Moringa olifera leaves. Trends & Prospects in Processing

of Andrews JM, (2001). BSAC standardized disc susceptibility testing method. J. Antimicrob Chemother 4: 43-57

Anzano, A., Ammar, M., Papaianni, M., Grauso, L., Sabbah, M., Capparelli, R., Lanzotti, V.

Armha, R., Navaratne, S. B., Uthpala, T. G. G. (2019). Moringa olifera plant and the nutritional

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 3(8): 623-627.

Bhattacharya, A., Tiwari, P., Sahu, P. K., Kumar, S. (2019). A review of the phytochemical and

Boukandoul,S.,Casal,S.&Zaidi,F.(2019). Moringa oleifera seed oil: Production, uses and

BOUALI, W. (2010). Contribution à la mise en place d'un plan HACCP dans une unité de fabrication

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi S., Gontier, E. (2001). Production of plant secondary

Briand, P. (2006). Saisine N° 2005-SA-0211relatif à une demande concernant un projet d'arrêté relatif

Bruneton J. (2008). Pharmacognosie, phytochimie plantes médicinales. Edition : Technique et Documentations. p1120

CARO, L., CAYROL, C., DALEM, E., & Et al . (2010). LES COMPLEMENTSALEMENTAIRES.

Caswell, J. A. (1996). HACCP as an international trade standard. American Journal of Agricultural

Charles M., et Benbrook Ph. D. 2005. Elevating antioxidant levels in food through organic.

Coffee Calvin Tinashe Traore Adama 2019 ; ADSORPTION D'UNE POLLUTION

compléments alimentaires. Journal Officiel L N°183, 51-57.

content, in vitro antioxidant and anti inflammatory activity of flowers of Moringa oleifera.

d'évaluation in vitro de la capacité antioxydanteOCL. Oléagineux corps gras lipides, 14 (5) :

De Souza R.f., W.F., De Giovani. (2004). Antioxidant Properties of Complexes of des aliments pour animaux. du 10 juin 2002 relative au rapprochement des législations des Etats membres concernant les Economics, 78(3), 775-779.

et la (±)- camptothécine. Thèse Doc. Chem. Univ. **Joseph Fourier. Grenoble 1. France.**

et ses environs (Sud-Kivu, RD Congo). J. Appl. Bios. 75(1), 6211-6220

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) (**Laleye et al., 2015**).

fabrication des compléments alimentaires.

farming and food processing: An organic center state of science review. The organic center.

Flavonoids with metal ions. Redox Report. 9(2): 97-104.

from Arnica flowers, Planta Med., 68, 385-391.

Gopalakrishnan, L., Doriya, K., Kumar, D. S. (2016). Moringa oleifera: A review on nutritive

Health benefits and phenolic compounds of Moringa oleifera leaves: A comprehensive review **Mohamed Ahmed Hassan 2021**

Health Benefits of Uses and Applications of Moringa oleifera in Bakery Products health benefits. In: Hong, N. Kh. D. (Ed.), Seed oil: Production, uses and benefits. Nova Science

Horticultural Crops, 251-268.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ptr.5325> idney J. **Stohs*** and **Michael J. Hartman 2015**

idney J. Stohs* and **Michael J. Hartman**

importance and its medicinal application. Food science and human wellness, 5(2), 49-56.

in Phytochemical science. Chromatographic Science Series, 477-478.

infrarouge comme élément d'aide à la décision pour la gestion du risque fongique et

Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., DE Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la roque R., De laroque O., Vican P., Deelsalle -Feat T., Biaujeaud M., Ringuet J., **Bloth J., Bortel A., (2001)** _ Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. 2^{ème} édition de VUEF, Hong Kong: 335

Kaur, A. (2018). Nutritional and medicinal value of Moringa Oleifera. International journal of scientific research in biological sciences, 5(3), 46-50

Koul, B., Chase, N. (2015). Moringa oleifera Lam.: Panacea to several maladies. J. Chem.

• **Klaas, C. A., Wagner, G., Laufer, S., Sosa, S., Loggia, R. D., Bomme, U., Pahl, H. L. and**

186p.

2018 Mar 12;10(3):343. doi: 10.3390/nu10030343.

278-292.

à la constitution des dossiers relatifs aux substances et aux plantes pouvant être employées dans la

Laguerre, M., Lopez Giraldo, L J., Lecomte, J., Pina, M., Villeneuve, P. (2007). Outils

Levasseur-Garcia C., Kleiber D., Surel O., (2013). Utilisation de la spectroscopie

Mangambu M., Mushagalusa K., and Kadima N. (2014). Contribution à l'étude Med, 3(9), 744-751.

Merfort, I. (2002). Studies on the anti-Inflammatory Activity of Phytopharmaceuticals prepared

metabolites: A historical perspective. Plant Science, 161, 839–851

MINERALE ET ORGANIQUE SUR LES FEUILLES ET GRAINES DE MORINGA

Muniz M.N. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a mycotoxique. Cah. Agric. 22 : 216-27

Nutraceutical or Pharmacological Potential of Moringa oleifera Lam [**Xianjuan Kou Justin M Drake 2018**]

Nutraceutical or Pharmacological Potential of Moringa oleifera Lam [Xianjuan Kou Justin M Drake 2018]

overview. Horticulturae, 7(10), 409

Paula García Milla, 2021

Pharm. Res, 7(6), 687-707

pharmacological characteristics of Moringa oleifera. Journal of pharmacy & bioallied

photochimique de quelques plantes médicinales antidiabétiques de la ville de Bukavu

plantes: emplacement et signification fonctionnelle. . Plant Sci 196, 67–76.

Publishers, New York, 2018. 1–27.

queen of green: Nutritive value and therapeutic potential of Moringa oleifera Lam. J Coast Life

Rouessac, F ; et Rouessac, A. 2004. Chromatographie liquide haute performance.In Analyse chimique-Méthodes et techniques instrumentales modernes, Paris. 36-59.

sciences, 10(4), 181

Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J. (2011). High Performance Liqromatography (2021). Moringa oleifera lam.: A phytochemical and pharmacological

[16:48, 09/09/2023] **ines Maroua:** Directive 2002/46/CE . (2002). Parlement européen et du Conseil

[16:51, 09/09/2023] **ines Maroua:** **Agati G, A. E. (2012).** Les flavonoïdes comme antioxydants dans les

[J. Mol. Sci. 2016, 17(12), 2141]

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ptr.5325>

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29534518/>

<https://www.ajol.info/index.php/ijbcs/article/view/130176>

<https://www.ajol.info/index.php/ijbcs/article/view/130176>

; <https://doi.org/10.3390/ijms17122141>

<https://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2141>

<https://jardinage.lemonde.fr/dossier-1371-moringa-oleifera-arbre-vie.html> 2

; <https://doi.org/10.3390/ijms17122141>

<https://www.mdpi.com/1422-0067/17/12/2141>

Annexes'

Business Model Canvas

Key Partners

- Les centres de recherche et développement
- Les universités
- Les fournisseurs

Key Activities

- Zozo pharm** est engagé dans la recherche, le développement, la fabrication et la commercialisation des compléments alimentaires
- Les principales activités sont:**
- La fabrication des produits parpharmaceutiques
 - Suppléments (vitamines qui fournissent de meilleurs soins pour le vieillissement et l'amélioration de la santé globale)
 - R & D pour améliorer la santé des patients
 - Commercialisation et Distribution
 - Créer de la valeur grâce à des partenariats
 - Disponibilité et performance des Compléments alimentaires

Designed for:

Value Propositions

- Notre produit vise a aider les personnes atteintes des maladies immunitaires ,auto-immunes et inflammatoires,qui sont dans l'attente d'un traitement efficace grace a la combinaison des données moléculaires et techniques
- Produits bio et de qualité et moins cher
- De nombreux investissements en R & D et partenariats innovants pour rechercher et délivrer les meilleurs traitements
- Céer nos propres points de vente

Designed by:

Customer Relationships

- Conférences téléphoniques et sessions individuelles.
- Participation dans les salons et les séminaires
- Site Web
- Destinés à tous les clients au niveau national
- Service après vente
- Rencontres directes avec tous les clients et les médcins au niveau de nos points de ventes

Date:

Customer Segments

Physique

- Les Patients (adultes a partir de 13ans ,les enfants de 3ans a 12 ans
 - Les médecins
 - Les pharmacies
 - Les distributeurs
- #### Géographique
- Partenaires et patients dans l'est algérien

Version:

Année universitaire : 2022-2023

Présenté par :BOUMAH RAT ZOHEIR

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et génomique végétale

Intitulé
Lancement d'une start-up
Fabrication d'un complément alimentaire
« immune-Mori »

Résumé

Les compléments alimentaires sont des denrées alimentaires, dont le but est de compléter le régime alimentaire normal et qui constituent une source concentrée de nutriments : Vitamines, Magnésium, Fer, Calcium

Les travaux effectués dans le cadre de cette étude consistent à la formulation et la fabrication d'un complément alimentaire à base de *Moringa oleifera*, à partir des molécules bioactives de cette dernière au niveau moléculaire.

L'application de la norme 22000 permet de démontrer une aptitude à identifier et à maîtriser les dangers liés à la sécurité des compléments alimentaires, cette norme est liée à l'approche HACCP qui a pour objectif la prévention, l'élimination ou la réduction à un niveau acceptable de tout danger « biologique, chimique, et physique » au regard de la sécurité des produits, mais aussi à fournir en permanence des produits finis et sûrs.

Au cours de notre étude, plusieurs techniques d'analyses ont été réalisées : l'identification des principes actifs, l'évaluation des activités biologiques, dosage des flavonoïdes, analyses physico-chimiques, et analyses microbiologiques.

Les résultats obtenus de ces analyses confirment la présence des flavonoïdes dans les feuilles *Moringa oleifera* par une valeur de 12.547 mg EQ/g plus précisément les molécules bioactives acide chlorogénique et l'isoquécétine ; et assurent que la plante étudiée a des activités biologiques (activité antioxydant de 0.040 mg/ml., anti-inflammatoire 0,154/ml , et antibactérienne avec toutes les souches étudiées mise appart *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 , *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 , et *Serratia marcescens*, qui sont résistante au *Moringa oleifera*) dans le but de stabiliser la formule.

Mots-clefs : *Moringa oleifera*, Technique HPLC, activités biologiques, analyses microbiologiques, complément alimentaire.

Laboratoires de recherche :

Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales. (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Président : CHIBANI Salih (MCA. Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadrant : HAMMOUDA Dounia (Prof. Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur: MOURI Fouzia (MCB Université Frères Mentouri, Constantine 1).