



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعرييرج

Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A

كلية علوم الطبيعة والحياة و علوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers

قسم العلوم البيولوجية

Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Intitulé

Activité antioxydante de fruit et de l'écorce de *Ceratonia siliqua*

Présenté par :

BOUDJRIMA Roumaissa & DAHAK Meriem

Soutenu le 03/07/2022, Devant le Jury :

Président : Mme BOUMAIZA Souad MAA Faculté SNV-STU, Univ. de B.B.A.
Encadrant : Mme MEZITI Asma MCB Faculté SNV-STU, Univ. de B.B.A.
Examineur : Mme BOULKROUNE Hasna MCB Faculté SNV-STU, Univ. de B.B.A.

Année Universitaire 2021/2022

Dédicace

JE DEDIE CE MODESTE TRAVAIL A :

Avant toute chose, je remercie le DIEU, le tout puissant

Pour m'avoir donné la force et la patience

A tous les personnes qui m'encouragent toujours aux moments difficiles :

Mon père : TOUFIK

La lumière de ma vie et, merci pour toute que vous avez fait pour moi.

Ma mère : BENAMER KARIMA

Pour m'avoir donnée la vie et la joie de vivre.

Mon seul frère : RIADH

Mes sœurs : SIHEM, HANA

Mon encadreur : MEZITI ASMA

Pour leur conseil, leur présence, Et leur patience.

Mon grand père : AMAR

La personne la plus précieuse de ma vie, que Dieu lui fasse miséricorde.

Mon amie : BENTOUMI AHLEM

Aux techniciens et ingénieurs du laboratoire de l'université de BBA.

Mes tout amis et collègues de la promotion.

Meriem

Dédicace

JE DEDIE CE MODESTE TRAVAIL A :

Avant toute chose, je remercie le DIEU, le tout puissant

Pour m'avoir donné la force et la patience

A tous les personnes qui m'encouragent toujours aux moments difficiles :

Mon père :

La lumière de ma vie et, merci pour toute que vous avez fait pour moi.

Ma mère :

Pour m'avoir donnée la vie et la joie de vivre.

Mon seul frère

Mes sœurs

Mon encadreur : MEZITI ASMA

Pour leur conseille, leur présence, Et leur patience.

Mon mari et sa famille

Aux techniciens et ingénieurs du laboratoire de l'université de BBA.

Mes tout amis et collègues de la promotion.

Roumaissa

REMERCIEMENT

*Nous remercions tout d'abord **Allah** le tout puissant, pour m'avoir donnée le courage, la force, la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous remercions nos **chers parents** qui nous ont aidés à être ce que nous sommes et Qui nous ont entourés avec tant d'amour et d'affection. On remercie leur dévouement, leur consacre detemps et leur présence constante au cours de toutes ces années d' « études ». On ne saurait jamais les remercier assez pour leur bien. « Merci, ce travail est la vôtre ». On vous aime...*

*Sans oublier, on tient à remercier sincèrement **Mme MEZITI Asma** notre encadreur, qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour nous avoir guidées dans notre travail. Ses conseils et sa gentillesse au bon déroulement de ce travail.*

*Je remercie **Mme BOUMAIZA Souad**, Maître assistant classe A, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de ce mémoire.*

*On veut également remercier madame **BOULKROUNE Hasna**, on exprime notre reconnaissance de nous avoir l'honneur d'être l'examinatrice.*

Un grand merci particulier à nos collègues et nos amies pour les sympathiques moments qu'on a passés ensemble, on les remercie pour leur confiance, leur disponibilité et leur fidélité.

Enfin, on est profondément reconnaissantes à toute personne qui nous a aidés de près ou de loin, directement ou indirectement durant ce passage.

Meriem, Roumaïssa

Sommaire

Dédicace

Remerciement

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Résumé

Introduction	01
Matériel et méthodes.....	05
1. Matériel.....	05
1.1. Matériel végétal	06
1.2. Appareillage et produits chimiques.....	07
2. Méthodes.....	08
2.1. Préparation de matériel végétal.....	08
2.1.1. Broyage et tamisage.....	08
2.2. Préparation de l'extrait brut.....	08
2.2.1. Préparation de l'extrait méthanolique.....	08
2.2.2 Préparation de l'extrait aqueux.....	09
2.3. Analyse des extraits de <i>Ceratonia siliqua</i>	10
2.3.1. Dosage des composés phénoliques.....	10
2.3.2. Dosage des flavonoïdes.....	11
2.3.3. L'activité antiradicalaire du DPPH.....	12
2.3.4. Test de blanchissement du β -carotène.....	14
2.3.5. Test de l'hémolyse oxydative des érythrocytes induite par le peroxyde d'hydrogène.....	15
Résultat et discussion.....	16
1. Préparation des extraits méthanoliques et aqueux de <i>Ceratonia siliqua</i>	16
2. L'analyse quantitative des composés phénoliques des extraits de l'écorce et du fruit de <i>Ceratonia siliqua</i>	17
3. L'activité antioxydante.....	20
3.1. Effet scavenger du radical DPPH.....	20
3.2. Test de blanchissement du β -carotène.....	24
3.3. Activité anti-hémolytique de <i>Ceratonia siliqua</i>	26
Conclusion.....	28
Références bibliographiques	29

Liste des tableaux

Tableau I : Aspects, couleurs et rendements des extraits aqueux et méthanolique de l'écorce et de fruit de <i>Ceratonia siliqua</i>	16
Tableau II : La teneur en composés phénoliques et en flavonoides des extraits de <i>Ceratonia siliqua</i>	17
Tableau III : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de fruit de <i>Ceratonia siliqua</i>	27

Listes des figures

Figure 01. L'arbre de caroubier.....	05
Figure 02. L'écorce et la poudre de fruit de <i>Ceratonia siliqua</i>	06
Figure 03. Distribution géographique du caroubier dans le monde.....	06
Figure 04. Extraction par macération à l'aide d'un solvant méthanolique	08
Figure 05. Evaporation du solvant au Rotavapeur.....	09
Figure 06. Extraction par décoction à l'aide d'eau distillé.....	09
Figure 07. Changement de couleur due à une réduction du molybdate d'ammonium (Jaune) par le noyau phénol (Bleu).....	10
Figure 08. Réaction entre $AlC3^+$ les flavonoïdes.....	11
Figure 09. Réduction du radical DPPH.....	12
Figure 10. Réduction du radical DPPH : passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm.....	13
Figure 11. Solution de globules rouges et centrifugeuse de laboratoire nécessaire pour la réalisation de test in vitro de l'hémolyse oxydative.....	15
Figure12. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	18
Figure13. Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	18
Figure14. Activité anti radicalaires de l'extrait aqueux, méthanolique et l'acide ascorbique.....	22
Figure15. Les concentration efficaces à piéger 50%(IC50) du radical DPPH par les extraits étudiés et l'acide ascorbique.....	22
Figure16. Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490nm en absence et en présence des extrait de <i>Ceratonia siliqua</i> et du l'acide ascorbique.....	24
Figure17. Activité antioxydant relative des extraits de <i>Ceratonia siliqua</i> , de l'acide ascorbique dans le système β -carotène/acide linoléique	25
Figure18. Absorbance de l'hémoglobine en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de fruit de <i>Ceratonia siliqua</i>	27

Liste des abréviations

AAR : Activité antioxydant relative

ABS : Absorbance

AG : Acide gallique

AlCl₃ : Trichlorure d'aluminium

ASC : Acide Ascorbique

BHA : Le butylhydroxyanisol

BHT : Le butylhydroxytolène

CAT : Catalase

DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle

EAG : Equivalent d'acide gallique

EAQ : Extrait aqueux

ED : L'eau distillée

EME : Extrait methanolique

EQ : Equivalents de quercétine

ERO : Espèces réactifs de l'oxygène

GPX : La glutathion peroxydase

Hb : Hémoglobine

HO• : Radical hydroxyle

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%

MS : Matière sèche

NaCl : Chlorure de sodium

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium

Na₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de sodium

NaH₂PO₄ : Dihydrogénophosphate de sodium

NO : Monoxyde d'azote

NOS : L'oxyde nitrique synthase

NO₃⁻ : Peroxynitrite

O₂⁻ : Radical superoxyde

O₃ : L'ozone (gaz toxique)

PBS : Tampon phosphate salin (souvent abrégé PBS, de l'anglais phosphate-buffered saline)

RL : Radicaux libres

SOD : Le superoxyde dismutase

UV: Ultra violet

XO : La xanthine oxydase

الملخص

Ceratonia siliqua L هي شجرة فاكهة متوسطة تنتمي إلى عائلة البقوليات (Fabaceae) ، ولها أهمية بيئية واجتماعية واقتصادية وعلاجية.

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المائية والميثانولية لحاء وفاكهة *Ceratonia siliqua*. يُظهر التقدير الكمي لمجموع البوليفينول بواسطة طريقة Folin-Ciocalteu والفلافونويدات بواسطة طريقة ثلاثي كلوريد الأمونيوم ثراء المستخلص الميثانولي من اللحاء في البوليفينول (205.125 ميكروغرام EAG / ملغ) ومستخلص الفاكهة الميثانولية في الفلافونويد (15.53 ميكروغرام EQ / ملغ).

يُظهر التقييم الكمي لقوة الاصطياد للمستخلصات فيما يتعلق بـ DPPH أن المستخلص الميثانولي من اللحاء هو الأكثر نشاطاً مع IC50 بترتيب 0.4493 مجم / مل ، وهذا النشاط مشابه لنشاط فيتامين سي.

علاوة على ذلك ، يكشف اختبار التبييض بيتا كاروتين أن المستخلص الميثانولي من اللحاء هو الأكثر نشاطاً مع تثبيط بنسبة 78.048٪.

يتم اختبار النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات الخروب على خلايا الدم الحمراء ، والمستخلص الميثانولي للفاكهة هو المستخلص الوحيد الذي له تأثير وقائي ضد انحلال الدم التأكسدي الناجم عن بيروكسيد الهيدروجين.

الكلمات المفتاحية : *Ceratonia siliqua* L ، البوليفينول ، الفلافونويد ، النشاط المضاد للأكسدة ، انحلال الدم التأكسدي.

Résumé

Ceratonia siliqua L est un arbre fruitier méditerranéen qui appartient à la famille des légumineuses (Fabacées), il possède une importance écologique, socio-économique et thérapeutique.

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits aqueux et méthanoliques de l'écorce et du fruit de *Ceratonia siliqua*.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode au trichlorure d'ammonium montre la richesse de l'extrait méthanolique de l'écorce en polyphénols (205.125 µg EAG/mg) et l'extrait méthanolique de fruit en flavonoïdes (15.53 µg EQ/mg).

L'évaluation quantitative du pouvoir piégeur des extraits vis-à-vis du DPPH montre que l'extrait méthanolique de l'écorce est le plus actif avec une IC50 de l'ordre de 0,4493 mg/ml, cette activité est similaire à celle de la vitamine C.

Par ailleurs, le test de blanchissement du β-carotène révèle que l'extrait méthanolique de l'écorce est le plus actif avec une inhibition de 83,048%.

L'activité antioxydante des extraits de caroubier est testée sur des globules rouges, l'extrait méthanolique des fruits est le seul extrait qui a exercé un effet protecteur contre l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène.

Mots clés : *Ceratonia siliqua* L, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, hémolyse oxydative.

Summary

Ceratonia siliqua L is a mediterranean fruit tree which belongs to the family of legumes (Fabaceae), it has ecological, socio-economic and therapeutic importance.

The objective of this study is the evaluation of the antioxidant activity of the aqueous and methanolic extracts of the bark and the fruit of *Ceratonia siliqua*.

The quantitative estimation of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method and of flavonoids by the ammonium trichloride method shows the richness of the methanolic extract of the bark in polyphenols (205.125 µg EAG/mg) and the extract methanolic fruit in flavonoids (15.53 µg EQ/mg).

The quantitative evaluation of the trapping power of the extracts with respect to DPPH shows that the methanolic extract of the bark is the most active with an IC₅₀ of the order of 0.4493 mg/ml, this activity is similar to that of vitamin C.

Moreover, the β-carotene bleaching test reveals that the methanolic extract of the bark is the most active with an inhibition of 83.048%.

The antioxidant activity of carob extracts is tested on red blood cells, the methanolic extract of the fruits is the only extract that exerted a protective effect against oxidative hemolysis induced by hydrogen peroxide.

Key words : *Ceratonia siliqua* L, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, oxidative hemolysis.

Introduction

Aujourd'hui le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, dit du « stress oxydant », c'est-à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive des radicaux oxygénés toxiques. Actuellement, il est bien admis que même si un stress oxydant n'est pas une maladie en soi, il est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant ou associé à des complications lors de leur évolution. Ce facteur d'inflammation et de mutagenèse est considéré comme une des principales causes du cancer et jouerait un rôle dans la maladie d'Alzheimer, comme dans plusieurs affections plus courantes telles que les maladies cardio-vasculaires, les accidents cérébraux vasculaires, l'arthrite rhumatoïde ou les cataractes (**Alain Favier, 2003**).

L'appellation espèces oxygénées réactives (EOR) inclut les radicaux libres de l'oxygène (radical superoxyde O_2^- , radical hydroxyle HO^{\bullet} , monoxyde d'azote NO, etc...) mais aussi certains dérivés réactives non radicalaires dont la toxicité est plus importante tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le peroxydinitrite NO_2^- (**Halliwell et Whiteman, 2004**). Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /ou un pouvoir oxydant fort, il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe (**Akroum, 2011**).

Les sources endogènes des radicaux libres comprennent la chaîne respiratoire dans les mitochondries, les réactions immunitaires, les enzymes telles que la xanthine oxydase (XO) et l'oxyde nitrique synthase (NOS) l'oxydation médie par les métaux de transition (**Lykkesfeldt J, 2007**), la gamme variée de sources exogènes de ROS englobe les rayonnements ionisants (rayons X) et non ionisants, les polluants, les gaz toxiques naturels tels que l'ozone (O_3), les médicaments et les toxines (**Pandey et Risvi, 2009; Pandey et Risvi, 2010**).

Un antioxydant est une molécule capable d'inhiber l'oxydation d'une autre molécule. Il brise la chaîne de réactions des radicaux libres en sacrifiant leurs propres électrons pour nourrir les radicaux libres, sans devenir eux-mêmes des radicaux libres. Afin de combattre et de neutraliser les effets délétères des ERO, diverses stratégies antioxydants existent, soit en augmentant les défenses enzymatiques antioxydants endogènes, soit en renforçant les défenses non enzymatiques par des moyens diététiques ou pharmacologiques (**Dontha , 2016**).

Les principales enzymes antioxydants sont le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX). Les antioxydants non-enzymatiques renferment des substances endogènes comme le glutathion, la bilirubine l'acide urique et des substances exogènes apportées par l'alimentation comme la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et les polyphénols (**Pincemail et al., 2002**).

Le butylhydroxyanisol (**BHA**) et le butylhydroxytolène (**BHT**) sont les antioxydants synthétiques lipophiles les plus fréquemment utilisés comme conservateurs à faible concentration dans les produits cosmétiques et alimentaires afin de protéger les lipides du rancissement. Les risques et les effets néfastes de ces antioxydants ont été questionnés au cours des dernières années et la nécessité de les substituer par des antioxydants naturels, issus de plantes médicinales, est apparente. Les antioxydants naturels sont donc une alternative intéressante en raison de leurs variétés de structures et d'interactions chimiques, ainsi que des nombreuses activités biologiques qu'ils possèdent. En s'appuyant sur cette vision, il est indispensable d'intensifier l'effort de recherche pour développer de nouvelles molécules biologiquement actives à partir de plantes.

Aujourd'hui, de nombreux travaux menés dans le domaine de la pharmacologie, montrent que les plantes utilisées en médecine traditionnelle et qui ont été testées sont souvent d'une part, des plantes efficaces dans le modèle pharmacologique et d'autre part seraient dépourvues de toxicités à certaines doses (**François, 2010**). Parmi les potentialités biologiques reconnues des plantes, l'activité antioxydante présente un intérêt de plus en plus grandissant à cause des rôles importants que jouent les composés antioxydants, retrouvés au niveau des plantes, dans le traitement et la prévention des maladies du stress oxydant (**Sahabi, 2009**).

Les Fabaceae ou légumineuses constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs les plus connues, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical (**Sylvie, 2011**). Le caroubier ou *Ceratonia siliqua* L est un arbre fruitier méditerranéen qui appartient à la famille des légumineuses (Fabacées). Il est utilisé depuis l'Antiquité pour ses fruits (les caroubes), pour l'homme et le bétail. Son nom générique *Ceratonia* vient du grec et signifie « petite corne » (en référence à ses caroubes, gousses en forme de cornes à maturité). Le nom d'espèce, *siliqua*, désigne en latin une silique, ou gousse. (**Abdullatif, 2017**).

Ceratonia siliqua L atteint une taille de 15 à 17 mètres et une durée de vie de 200 à 500 ans (**Gillet, 2018**). Les feuilles de *Ceratonia siliqua* L sont assez grandes (10 à 20 cm), composées de 4 à 10 folioles ovales opposées, de couleur verte luisantes à la face supérieure et vert pâle à la face inférieure.

Ceratonia siliqua L, perd ses feuilles tous les deux ans, au mois de Juillet (**Benamar et al, 2011**). Les fleurs sont groupées en grappes latérales possèdent une couleur pourpre et parfois rougeâtre. La morphologie florale chez *Ceratonia siliqua* L est très complexe dont on peut distinguer des inflorescences mâles (**Simon, 2010**) avec des étamines courtes ou bien longues, des inflorescences femelles avec des étamines rudimentaires, des inflorescences hermaphrodites à floraison à lieu en automne c'est pour ça cette espèce considérée comme la seule dans la région méditerranéenne qui fleurisse en été (**Benamar et al, 2011**).

La gousse de *Ceratonia siliqua* L est principalement composée de deux éléments : la pulpe et les graines. Elle nécessite 9 à 10 mois pour atteindre la maturité (Batlle et Tous, 1997). La gousse possède une couleur verte avant la maturité, et devient brune foncée à noire et parfumées après la maturité (Haddarah, 2013). Les graines sont ovoïdes, rigides, d'une couleur qui dépend de la variété, elle peut-être marron ou rougeâtre (Batlle et Tous, 1997). *Ceratonia siliqua* L possède une écorce lisse et grise lorsque la plante est jeune ; et brune et rugueuse à l'âge adulte (Ait Chitt et al, 2007).

Ceratonia siliqua L est un arbre d'importance écologique, socio-économique, et industriel. Dans en terme de produits, l'arbre et ses composants (feuille, fleurs, écorce et racines) sont utiles (El kahkahir, 2016).

Depuis longtemps, l'écorce et les feuilles ont été utilisées dans la médecine traditionnelle en Tunisie et Turquie pour traiter les maladies laxatives, diurétiques, anti-diarrhéique et pour le traitement de la gastro-entérite des bébés (Aboura, 2018).

L'utilisation de *Ceratonia siliqua* L comme ingrédient alimentaire par les industries pharmaceutiques et alimentaires pourrait être développée. De nombreux fabricants agroalimentaires utilisent la farine de pulpe de *Ceratonia siliqua* L comme additif (E410), comme substitut du cacao dans les pâtisseries et la crème glacée. La richesse de la pulpe et des graines de caroube en éléments minéraux reflète l'importance accordée à cet aliment depuis longtemps pour la nutrition animale et humaine (El bouzdoudi, 2017).

De plus, leur pulpe est riche en sucre total (48-56%), et dans certains pays le sirop de caroube est une boisson populaire, obtenue à partir de croquettes de caroube avec de l'eau (Mohammed Yahya et al, 2017).

Ceratonia siliqua L est utilisée aussi dans les industries cosmétiques pour ses propriétés épaississantes, émulsifiantes et stabilisantes (Addarah, 2013).

Ceratonia siliqua L est une espèce qui présente un réservoir potentiel de molécules naturelles bioactives, elle contient également des composés phénoliques qui lui confèrent différents rôles biologique (Dallali et al ,2018). Des tannins condensés insolubles, terpenoïdes (stérole), alcaloïdes, quinones (Klonew et al. 2007 ; lachkar et al 2016).

Des acides phénoliques (acide coumarique et l'acide gallique) sont identifiés dans les extraits des pulpes (Fedal et al, 2011). Des flavonoïdes qui sont des (flavones, flavonoles, flavonones, isoflavones) (Metrouh, 2009). Les gousses et les graines de *Ceratonia siliqua* sont riches en glucides, fibres alimentaires, les matières grasses et les protéines (Gaouar, 2011).

Dans le cadre de la recherche des antioxydants naturels s'inscrit le présent travail, dont l'objectif essentiel est l'évaluation de l'activité antioxydante de *Ceratonia siliqua*.

Cette étude englobe deux volets :

- Le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction, la détermination de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes des différents extraits obtenus à partir de l'écorce et des fruits du caroubier.
- Le second est consacré à l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits par le test de DPPH, blanchissement de β carotène et l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène.

***Matériel et
Méthodes***

1. Matériels

Le caroubier ou *Ceratonia siliqua* L appartient à la famille des légumineuses (Fabacées).

Il est un arbre ou arbuste dioïque à feuilles persistantes et de croissance lente qui pousse dans la région méditerranéenne.

Selon (Cronquiste, 1981) *Ceratonia siliqua* appartient au :

Règne : plantae

Sous-règne : Tracheobionta (plante vasculaire).

Embranchement : spermaphytes.

Sous-embranchement : Magnoliophyta (Angiosperme)

Classe : Magnoliopsida.

Sous-classe : Rosidae.

Ordre : Fabales.

Famille : Caesalpiniaceas.

Sous-famille : Caesalpinioideas.

Genre : *Ceratonia*.

Genre espèce : *Ceratonia siliqua* L.



Figure 1. L'arbre du caroubier

1.1. Matériel végétal

La récolte de l'écorce de tronc de *Ceratonia siliqua* a été effectuée en mars 2022 au niveau de la commune de Djaafra de la wilaya de Bordj Bou Arreridj.

Le fruit de *Ceratonia siliqua* est acheté d'une épicerie en mars 2022 au niveau de la commune de El Achir de la wilaya de Bordj Bou Arreridj qui va servir à la préparation de l'extrait AQ et ME.



Figure 2. L'écorce et la poudre de fruit de *Ceratonia siliqua*

Distribution géographique du caroubier

Selon Hillcoat *et al.*, 1980 le caroubier se trouve à l'état sauvage dans les régions méditerranéennes de l'Est, (Chypre, Egypte, Palestine, Jordanie, Liban, Libye, Arabie saoudite, Syrie, Tunisie, Turquie).

Cependant il est cultivé en Algérie, Argentine, Australie, Chili, Croatie, France, Grèce, Inde, Indonésie, Italie, Malte, Maroc, Mexique, Pakistan, Portugal, Espagne, États-Unis d'Amérique et Venezuela (Figure 3).

En Algérie, le caroubier est cultivé dans l'Atlas Saharien (Quezel et Santa, 1962) où la température varie entre 5°C et 20°C et la pluviométrie de 80mm/an à 600mm/an (Rebour, 1968).

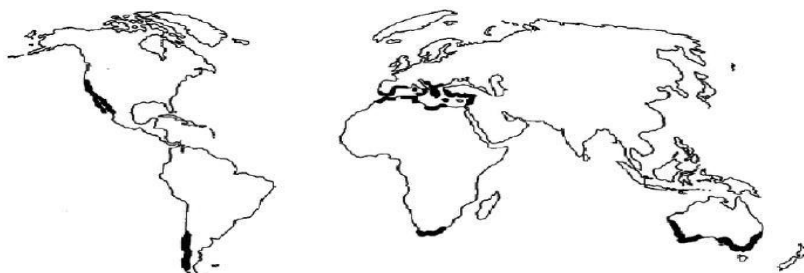


Figure 3. Distribution géographique du caroubier dans le monde (Batlle et Tous, 1997)

1.2. Appareillage et produits chimique :

Pour réaliser cette étude, on a utilisé un ensemble d'équipements, de verreries, d'appareillages et de produits chimiques :

Produits :

- ✓ Trichlorure d'aluminium $AlCl_3$
- ✓ Les étalons poly-phénoliques (quercétine, acide gallique).
- ✓ Acide ascorbique.
- ✓ Méthanol
- ✓ Carbonate de sodium (Na_2CO_3).
- ✓ Folin-ciocalteu
- ✓ DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle).
- ✓ β -carotène
- ✓ Acide linoléique
- ✓ Chloroforme
- ✓ Tween 40
- ✓ Chlorure de sodium $NaCl$
- ✓ Peroxyde d'hydrogène H_2O_2
- ✓ Hydrogénophosphate de sodium Na_2HPO_4
- ✓ Dihydrogénophosphate de sodium NaH_2PO_4

Appareils et verreries :

- ✓ Rota vapeur (BUCHI).
- ✓ Spectrophotomètre UV-visible (SHIMADZU : UV mini – 1240).
- ✓ Etuve.
- ✓ Agitateur magnétique.
- ✓ Vortex.
- ✓ Micropipettes
- ✓ Balance de précision.
- ✓ Plaque chauffante.
- ✓ Centrifugeuse de laboratoire.
- ✓ pH-mètre
- ✓ Différents verreries (ballon, tube, bécher, entonnoirs, erlenmeyer...etc).

2. Méthodes

2.1. Préparation de matériel végétal

2.1.1. Broyage et tamisage

Une fois que l'écorce de la plante est bien séchée, elle est broyée à l'aide d'un mortier, puis tamisée à l'aide d'un tamiseur. La poudre de l'écorce récupérée a été conservée dans un récipient en verre à l'obscurité et à une température ambiante pour utilisation ultérieure.

La poudre de fruit achetée a été aussi conservée dans un récipient en verre dans les mêmes conditions que l'écorce.

2.2. Préparation de l'extrait brut

2.2.1. Préparation de l'extrait méthanolique

Une quantité de 15 g de la poudre est mise à macérer dans 150 ml de méthanol, sous agitation douce pendant 30 min et lisse dans la réfrigération pendant 24h. L'extrait alcoolique est récupéré après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre, le méthanol est éliminé du filtrat par évaporation sous pression réduite dans un rota-vapeur (BÜCHI). L'extrait est séché dans l'étuve à 37C° pendant 2 jours.



Figure 4. Extraction par macération à l'aide d'un solvant méthanolique



Figure 5. Evaporation du solvant au Rotavapeur

2.2.2. Préparation de l'extrait aqueux

L'extrait aqueux est préparé par décoction de 15g de la poudre de *Ceratonia siliqua* dans 150ml d'E.D, pendant 10 min à température élevée. L'extrait aqueux est récupéré dans un premier temps après filtration du mélange à l'aide d'un papier filtre. L'extrait est séché dans l'étuve à 37C° pendant 2 jours .Permettant ainsi d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur brune foncée, qui est considéré comme étant l'extrait brut.



Figure 6. Extraction par décoction à l'aide d'eau distillé

Calcul de rendement

Le rendement en pourcentage (%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait brute et celle de la plante sèche en poudre.

Il est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt} = (\text{PB} / \text{PA}) \times 100$$

PB : poids d'extrait brut

PA : poids de la plante sèche en poudre en lever

2. 3. Analyse des extraits de *Ceratonia siliqua*

2.3.1. Dosage des composés phénoliques

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon (Li et al., 2007).

Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribereau, 1968).

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux (Ghazi et Sahraoui, 2005).



Figure 7. Changement de couleur due à une réduction du molybdat d'ammonium (Jaune) par le noyau phénol (Bleu) (Agbor et al., 2014).

Mode opératoire

Un volume de 1 ml de réactif de Folin (10% : 10 fois dilué) est ajouté à 200 μ l d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables, après 4 min, 800 μ l d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel.

Après 1.5 heures d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 765nm par un spectrophotomètre. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (5-200 μ g/ml) et est exprimée en μ g d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait).

2.3.2. Dosage des flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et al., 1996) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits aqueux et méthanolique de *Ceratonia siliqua*.

Principe

Les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5 susceptible de donner en présence de chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{+3} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (Ribéreau-Gayon et Gautheret, 1968).

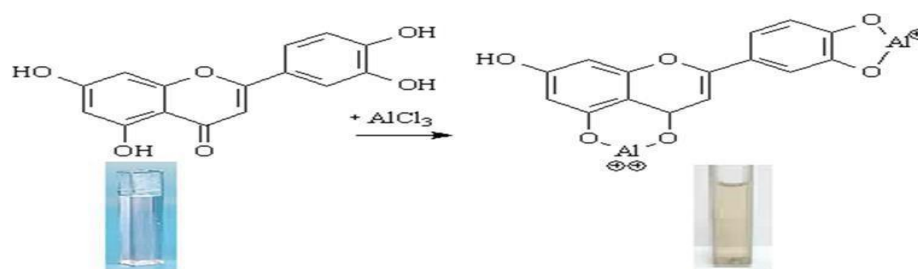


Figure 8. Réaction entre $AlCl_3$ + et les flavonoïdes (Mbaebie,2012).

Mode opératoire

À 1 ml d'échantillon (préparés dans le méthanol) est ajouté 1 ml de la solution d' AlCl_3 (2% dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, l'absorbance est lue à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (1,5-40 $\mu\text{g/ml}$) et est exprimée en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait).

2.3.3. L'Activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique et de l'extrait aqueux de *Ceratonia siliqua* évaluée en utilisant le Diphénylpicryl-hydrazyl (DPPH) comme un radical libre relativement stable selon le protocole décrit par Mansouri et *al* (2005).

Principe

Le 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) est un radical libre, stable et centré par l'azote qui porte un électron impair. Il est de couleur violette foncée. En présence d'antioxydants, il réagit avec eux par l'intermédiaire de deux mécanismes différents : une abstraction directe de l'hydrogène des groupes d'hydroxyles ou un processus de transfert d'électron, pour former un produit final stable qui est le diphenyl-b-picrylhydrazine coloré en jaune et qui donne une absorption forte à 517 nm (Choi et *al.*, 2002).

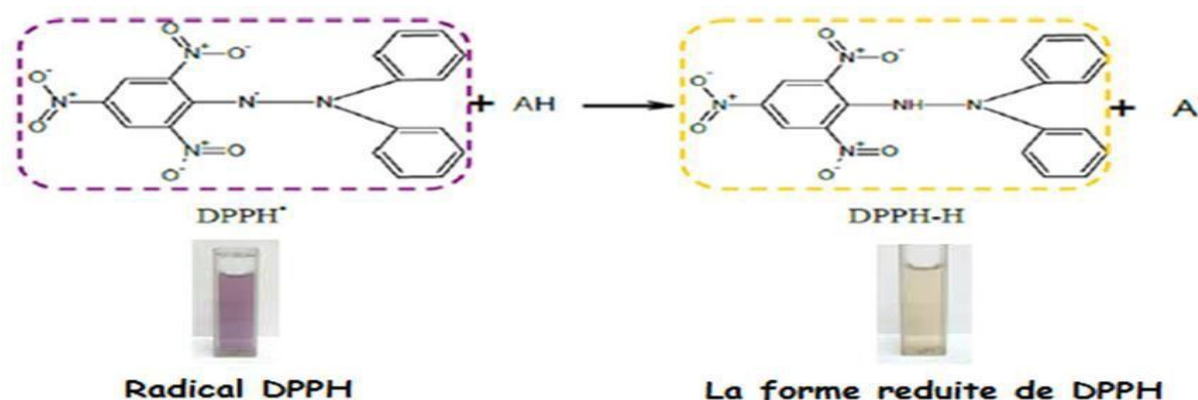


Figure 9. Réduction du radical DPPH (Molyneux , 2004).

Mode opératoire

La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 50 μ L des solutions d'extraits ou standards (acide ascorbique) sont ajoutés à 1950 μ L DPPH, les concentration des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre (0-4mg/ml) pour l'extrait écorce ED et (0-10 mg/ml) pour l'extrait fruit ED et entre (0-1 mg/ml) pour l'extrait méthanol écorce et pour le fruit méthanol entre (0-5 mg/ml).

Alors que celles de l'acide ascorbique sont comprises entre (0-1,5mg/ml).

Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm.

L'activité antiradicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\% \text{d'activité antiradicalaire} = \frac{(\text{Abs}_{517} \text{ contrôle} - \text{Abs}_{517} \text{ échantillon})}{\text{Abs}_{517} \text{ contrôle}} \times 100$$

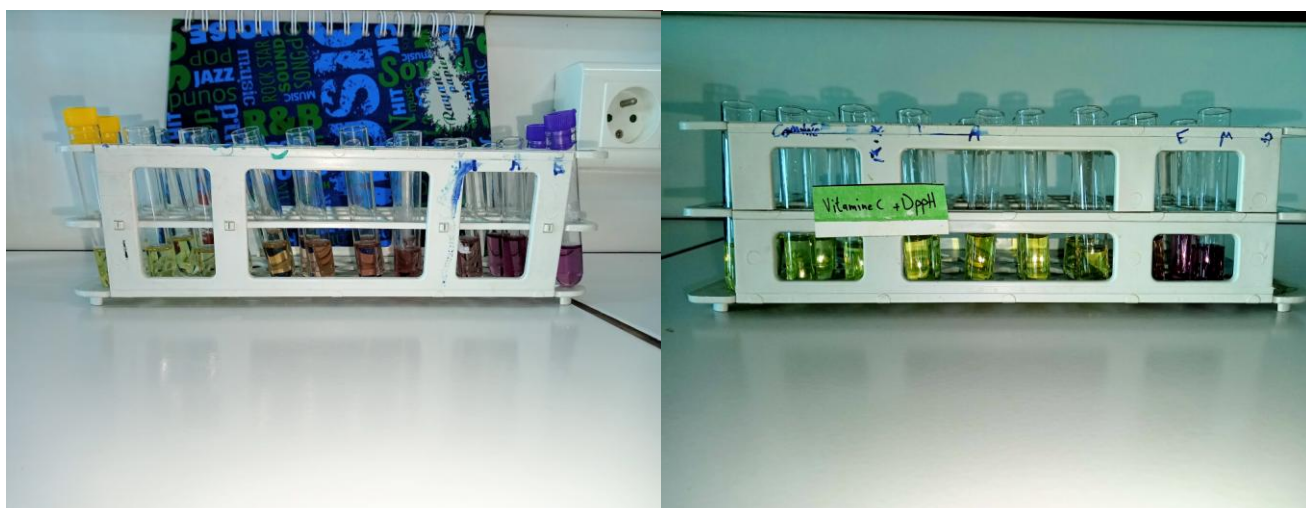


Figure 10. Réduction du radical DPPH : Passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm

2.3.4. Test de blanchissement du β -carotène

Dans ce test la capacité antioxydants des extraits est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydatif du β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique selon la méthode décrite par Kartal et *al* (2007).

L'émulsion de β -carotène /acide linoléique est préparée par solubilisation de 2 mg de β carotène dans 1 ml du chloroforme, 25 μ l de l'acide linoléique et 200 mg de Tween 40 sont additionnés, le chloroforme est complètement évaporé au rotavapeur pendant 1min dans 35C°, par la suite 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène sont ajoutés, l'émulsion résultante est agitée vigoureusement.

350 μ L de solution d'extraits ou d'antioxydants de référence (vitamine C) solubilisé dans du méthanol (2 mg/ml) sont additionnés à 2,5 ml de l'émulsion précédente.

La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence d'antioxydant (contrôlenégatif dans lequel l'échantillon est remplacé par 350 μ l de méthanol) est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 48 heures.

Les pourcentages d'inhibition de blanchissement de β -carotène ont été calculés par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(Abs E_{t=48h} - Abs C_{t=48h}) / (Abs C_{t=0h} - Abs C_{t=48h})] \times 100$$

Tel que :

Abs E_{t=48h}: Absorbance de l'échantillon à T = 48 h

Abs C_{t=48h}: Absorbance du contrôle négatif à T= 48h

Abs C_{t=0h}: Absorbance du contrôle négatif à T = 0h

2.3.5. Test de l'hémolyse oxydative des érythrocytes induite par le peroxyde d'hydrogène

L'effet protecteur des extraits de fruit et de l'écorce de caroubier contre l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène est évalué selon le protocole décrit par Manna *et al.* (2002) avec quelques modifications.

Prélèvement sanguin et préparation de l'hématocrite

Le sang humain utilisé dans ce test est obtenu par prélèvement veineux au pli du code de volontaires sains et non fumeurs. Le sang collecté dans un tube hépariné est centrifugé à 3900rpm/12min/ à température ambiante, après élimination du plasma, le culot est lavé deux fois par un tampon phosphate (NaCl 125 mM, phosphate de sodium 10 mM, pH 7,4). Pendant chaque lavage, la suspension est homogénéisée par un simple retournement du tube. Le surnageant et la couche d'interface sont éliminés juste après la centrifugation. À l'issue de la dernière centrifugation le culot cellulaire obtenu est dilué avec le même tampon phosphate pour obtenir un hématocrite de 2%.

Mode opératoire

200µl d'extrait (2mg/ml) sont ajoutés à 200µl de la suspension érythrocytaire préalablement préparée, mélangée avec 100µl de l'H₂O₂ (3 mmol/L) dissous dans PBS. Après 90 min d'incubation à 37C°, 8 ml de PBS sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange réactionnel est centrifugé à 3900rpm/12min/ à température ambiante et l'hémolyse (libération d'hémoglobine) est évaluée en mesurant l'absorbance du surnageant à 540 nm. Le tube contrôle contient le même milieu réactionnel sauf l'extrait qui est remplacé par le même volume de PBS.

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse (IH) est calculé à partir de l'équation suivante :

$$\% \text{ IH} = [(\text{Abs}_{\text{contrôle(-)}} - \text{Abs}_{\text{échantillon}}) / \text{Abs}_{\text{contrôle(-)}}] * 100$$

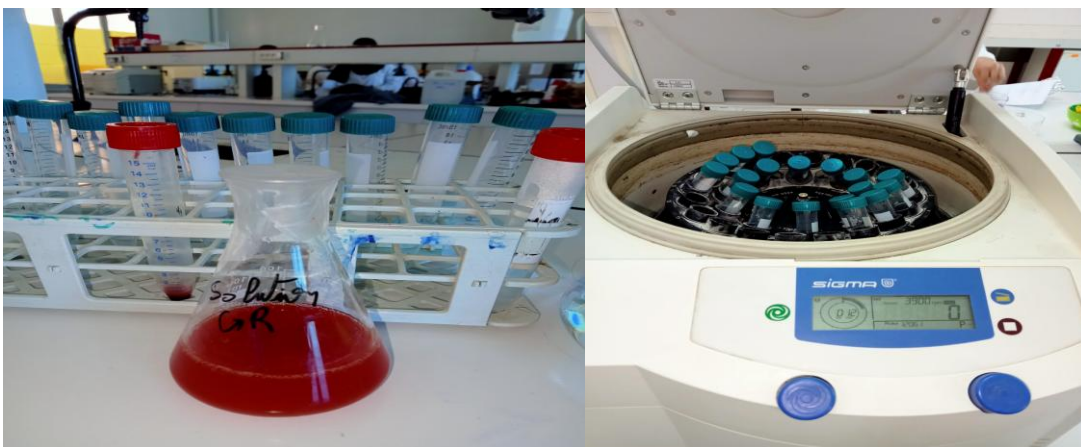


Figure 11. Solution de globules rouges et centrifugeuse de laboratoire nécessaire pour la réalisation de test de l'hémolyse oxydative

Résultats et Discussion





1. Préparation des extraits méthanoliques et aqueux de *Ceratonia siliqua*

La préparation des extraits bruts à partir de fruit et de l'écorce de caroubier a été effectuée par macération. En utilisant deux solvants différents le méthanol et l'eau distillée pour chaque partie. Quatre différents extraits ont été obtenus : l'extrait méthanolique de fruit (EMEf), l'extrait aqueux de fruit (EAQf), l'extrait méthanolique de l'écorce (EMEé) et l'extrait aqueux de l'écorce (EAQé).

Les résultats obtenus montrent que le rendement des extraits de l'écorce et du fruit de *Ceratonia siliqua* varie en fonction du solvant utilisé (**Tableau I**). Pour le fruit, l'extrait aqueux (44%) et l'extrait méthanolique (44,2%) présentent un rendement presque similaire. En outre, l'extrait méthanolique de l'écorce présente le rendement le plus élevé (17%) par rapport à l'extrait aqueux de l'écorce (12,06%). L'extraction par deux solvants différents, permet de séparer les composants qui se trouvent dans l'écorce et dans le fruit de la plante à étudier, selon leur degré de solubilité dans le solvant approprié (Hagerman et al., 2000).

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en métabolites secondaires, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites (Lee et al., 2003).

Tableau I. Aspect, couleur et rendement des extraits aqueux et méthanolique de l'écorce et de fruit de *Ceratonia siliqua*

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement
E ME fruit	Poudre	 Brun foncé	44,2%
E AQ fruit	Poudre	 Marron caramel	44%
E ME écorce	Poudre	 Brune foncée	17%
E AQ écorce	Poudre	 Marron caramel	12,06%

2. L'analyse quantitative des composés phénoliques des extraits de l'écorce et du fruit de *Ceratonia siliqua*

Afin de caractériser les extraits préparés à partir de *Ceratonia siliqua*, un dosage de polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antioxydantes des plantes sont attribuées à ces composés (Zhang *et al.*, 2016).

La méthode du dosage des polyphénols totaux est celle de Folin–Ciocalteu. L'acide gallique (**figure 12**) a été utilisé comme standard, alors que le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium, en utilisant comme standard la quercétine (**figure 13**).

Les résultats des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits sont résumés dans le **tableau II**.

Tableau II. La teneur en composés phénoliques et en flavonoïdes des extraits de *Ceratonia siliqua*

Extraits	Polyphénol ^(a)	Flavonoïdes ^(b)
E ME fruit	89.71 ±30.50	15.53 ±3.474
E AQ fruit	24.97 ±2.83	2.927 ±0.759
E ME écorce	205.125 ±0.883	7.62 ±0.837
E AQ écorce	172.37 ±18.119	7.42 ±0.611

^(a) :µg d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait.

^(b) :µg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait.

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD.

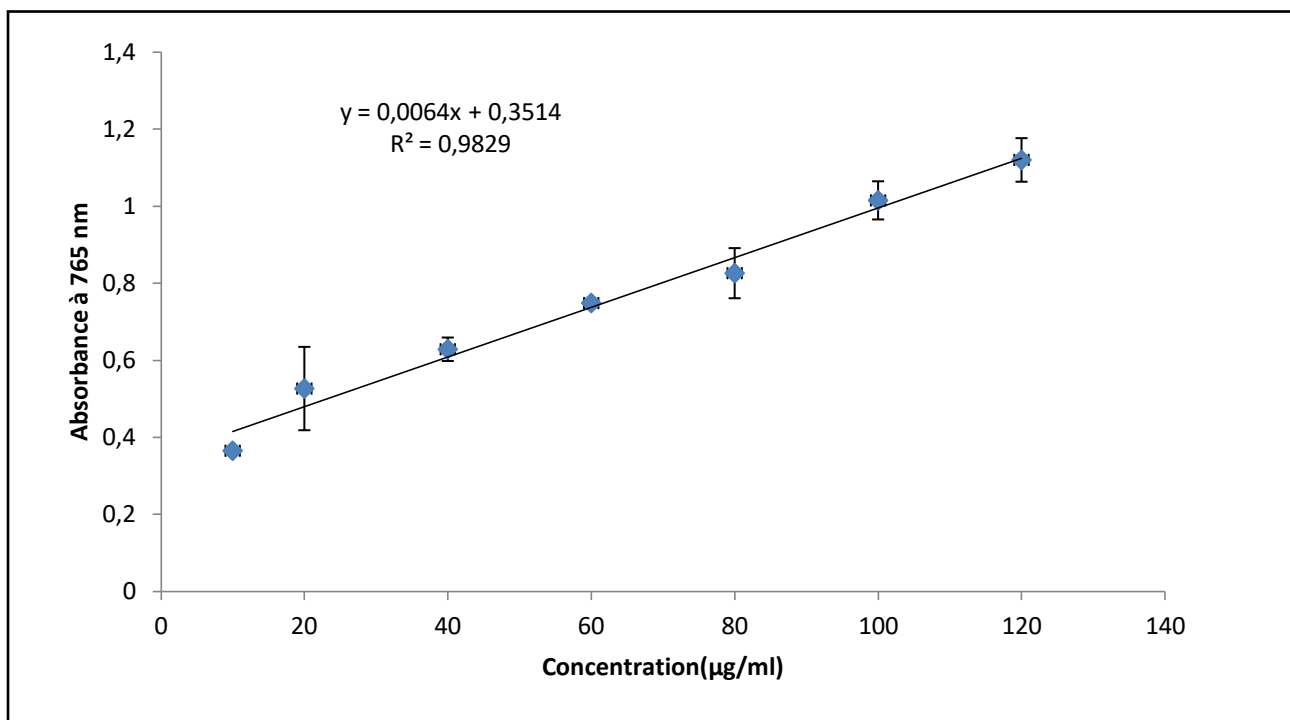


Figure 12. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm SD de deux essais).

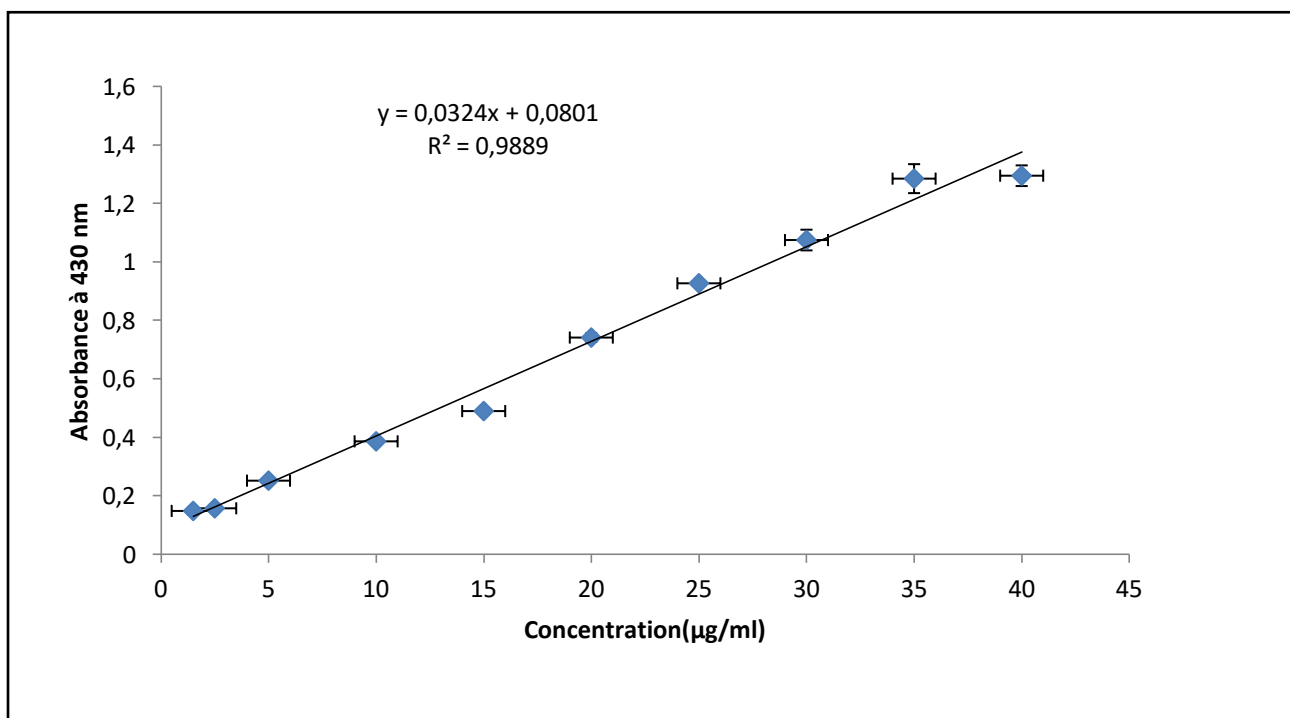


Figure 13. Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm SD de deux essais).

Les résultats obtenus révèlent que les extraits méthanolique et aqueux du fruit contiennent des teneurs différentes en polyphénols (89.71 µg EAG/mg et 24.97 µg EAG/mg pour l'extrait EME et EAQ respectivement) et des teneurs différentes en flavonoïdes (15.53 µg EQ/mg et 2.92 µg EQ/mg pour l'extrait EME et EAQ respectivement). Cependant les extraits méthanolique et aqueux de l'écorce contiennent des teneurs presque similaires en polyphénols (205.125 µg EAG/mg EME et 172.37 µg EAG/mg EAQ) et en flavonoïdes (7.62 µg EQ/mg EME et 7.42 µg EQ/mg EAQ).

Parmi les quatre extraits de *Ceratonia siliqua*, l'extrait méthanolique de l'écorce représente l'extrait le plus riche en polyphénols (205.125 µg EAG/mg). Par contre, l'extrait méthanolique de fruit est le plus riche en flavonoïdes (15.53 µg EQ/mg).

L'étude faite par **Custodio et al (2013)** sur le dosage des polyphénols dans l'écorce jeune du caroubier montre une quantité très forte de polyphénols (le rendement de l'extrait méthanolique est égale à 23,8 mg/gMS).

En outre, l'étude réalisée par **Fadel et al (2011)** sur la pulpe du caroubier montre des teneurs plus élevées en composés phénoliques (l'acide coumarique $20,52 \pm 8,76\%$, l'acide gallique $17,8 \pm 9,06\%$).

Toutefois, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relative et semble être lié aux propriétés génétiques ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions et à la durée de stockage, de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées (le type de solvant, température et durée d'extraction, le rapport soluté solvant).

3. L'activité antioxydante

3.1. Effet scavenger du radical DPPH

L'activité antioxydante des quatre extraits aqueux et méthanolique de l'écorce et de fruit de *Ceratonia siliqua* vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517nm.

Le DPPH (diphényl picrylhydrazyl) est un radical libre organique, toujours utilisé comme un réactif pour évaluer l'activité anti radicalaire des antioxydants (Hidayat *et al.*, 2017). Il est caractérisé par son adaptation à plusieurs échantillons dans une courte durée, aussi il est assez sensible pour détecter les ingrédients actifs à des basses concentrations, à cet effet, il a été employé pour le criblage des activités anti radicalaires des extraits végétaux (Yi *et al.*, 2008).

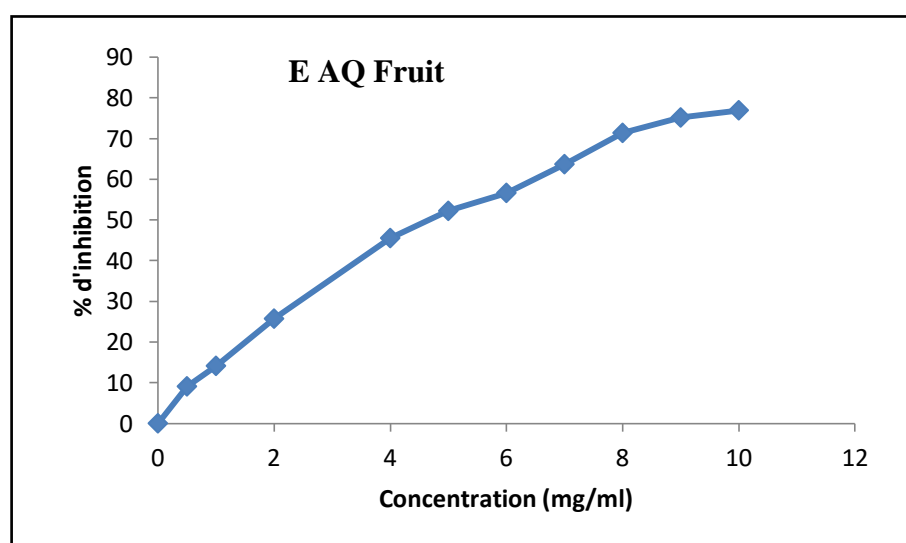
Les profils d'activité anti radicalaire obtenus (**Figure 14**) révèlent que les extraits de *Ceratonia siliqua* possèdent une activité anti radicalaire dose dépendante.

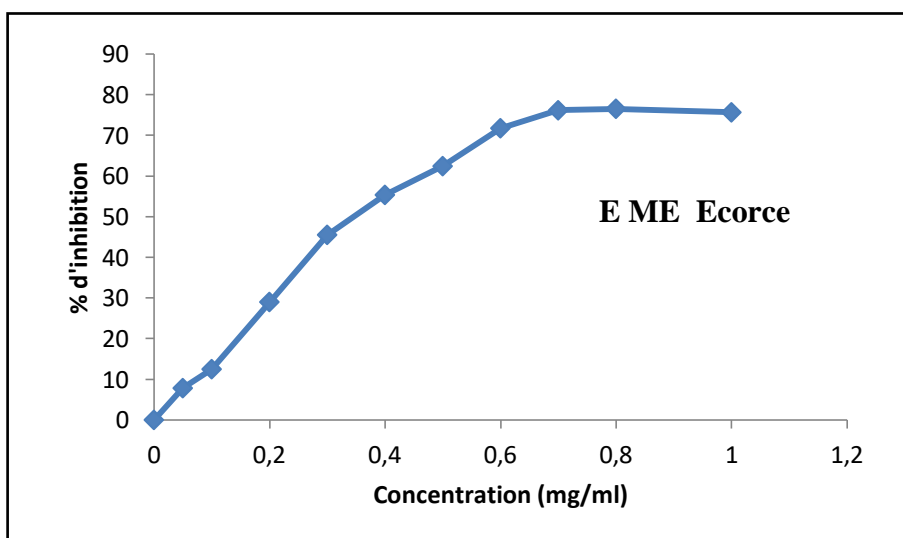
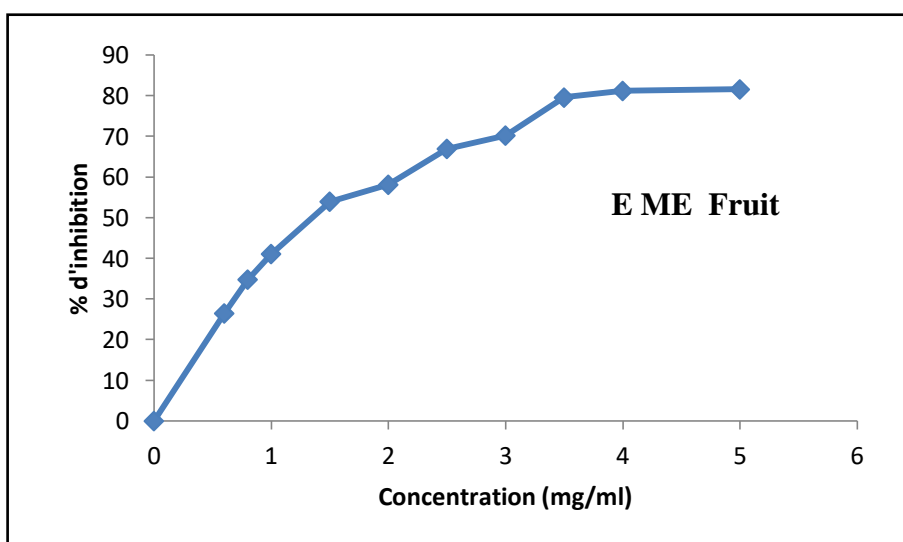
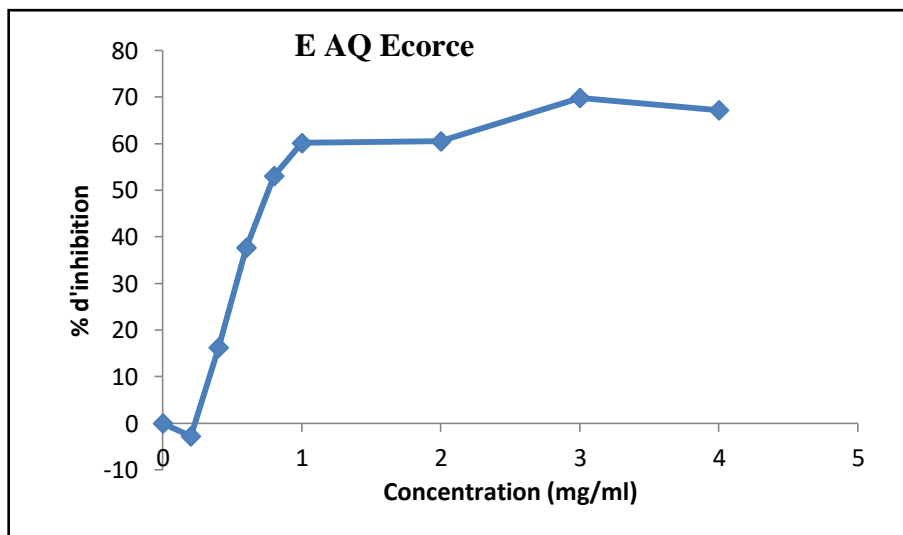
Pour mieux caractériser le pouvoir antioxydant, le paramètre IC50 est calculé.

L'IC50 est inversement lié à la capacité antioxydante d'un composé, car il exprime la quantité d'antioxydants nécessaire pour diminuer la concentration du radical libre de 50%.

Plus-la valeur d'IC50 est basse, plus l'activité antioxydante est élevée (Pokorny et Ai., 2001).

Les valeurs d'IC50 trouvées pour les extraits étudiés sont représentées dans la figure 15.





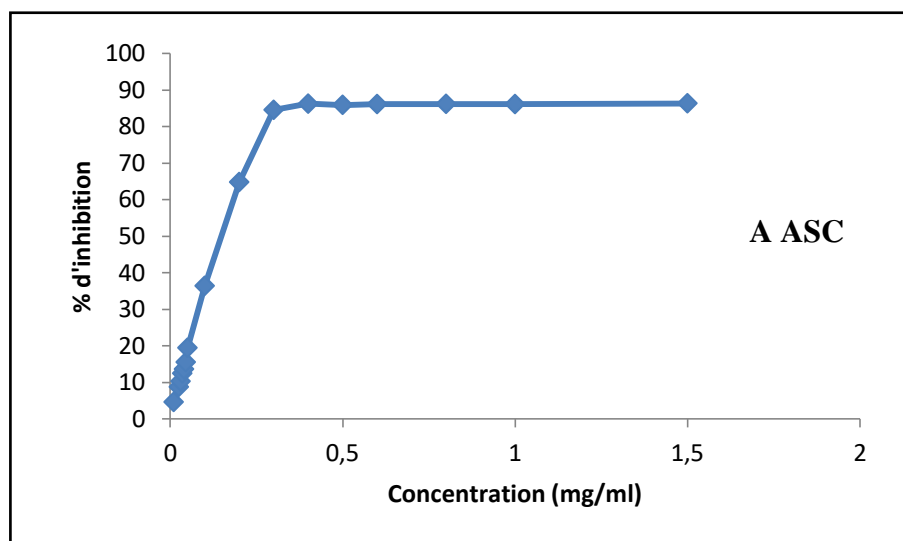


Figure 14. Activité anti radicalaire de l'extrait aqueux, méthanolique et acide ascorbique

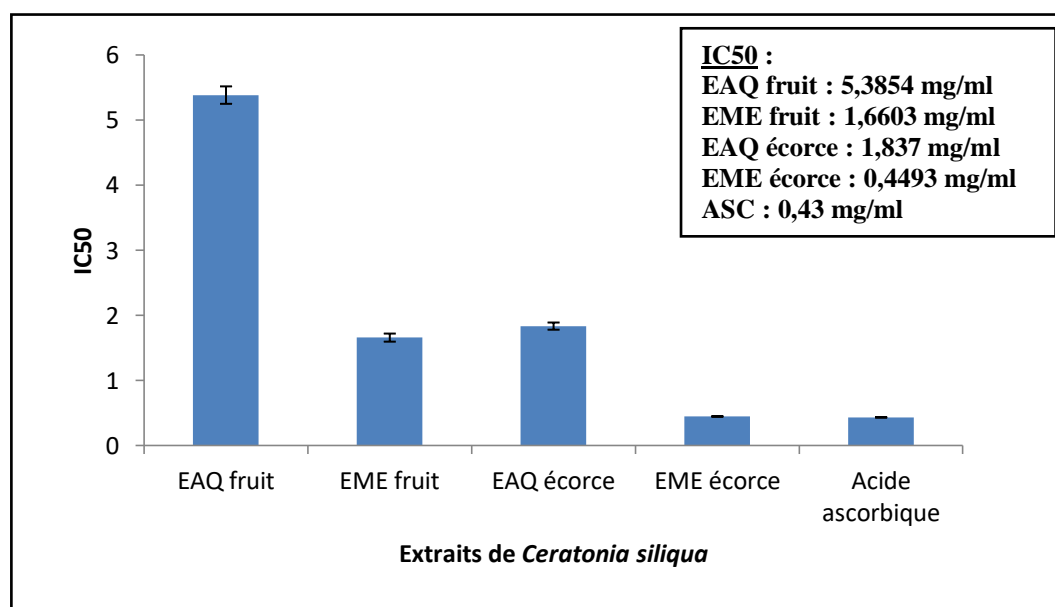


Figure 15 . Les concentrations efficaces à piéger 50% (IC50) du radical DPPH par les extraits étudiés et l'acide ascorbique

Les résultats obtenus montrent une activité anti radicalaire considérables dans les deux extraits de fruit de *Ceratonia siliqua* avec des IC50 de l'ordre de 1.66 mg/ml et 5.38 mg/ml pour l'extrait méthanolique et aqueux respectivement.

L'extrait méthanolique de fruit est presque trois fois plus actif que l'extrait aqueux.

En outre, les extraits de l'écorce de *Ceratonia siliqua* montre une activité importante supérieure à celle des extrait de fruit avec des IC50 très faible de l'ordre de 0.44 mg/ml et 1.83 mg/ml pour l'extrait méthanolique et aqueux respectivement.

En comparaison avec la vitamine C qui a présenté une IC50% de 0.43 mg/ml, l'extrait méthanolique de l'écorce possède une activité antioxydante similaire.

Ces résultats se concordent avec les travaux de Bakchiche et son équipe (2013) qui ont trouvé que l'extrait méthanolique exerce une activité antioxydante plus élevée que l'extrait aqueux.

Cela s'explique probablement par la capacité élevé de méthanol à extraire les composés phénolique .

3.2. Test de blanchissement du β -carotène

Dans ce test l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxydes, suite à l'abstraction des atomes d'hydrogènes à partir de groupements méthylènes diallyliques de l'acide linoléique. Ces radicaux libres vont par la suite oxyder le β -carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie spectrophotométriquement à 490 nm. Cependant, la présence d'un antioxydant pourrait neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc prévenir l'oxydation et le blanchissement du β -carotène. La cinétique de blanchissement du β -carotène en absence et en présence des extraits de *Ceratonia siliqua*, de l'antioxydant standard (vitamine C) et les activités antioxydants relatives sont représentés dans les **Figures 16** et **17**.

D'après ces résultats, il est évident que tous les extraits testés inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β carotène par rapport au contrôle négatif qui représente 100% de la peroxydation.

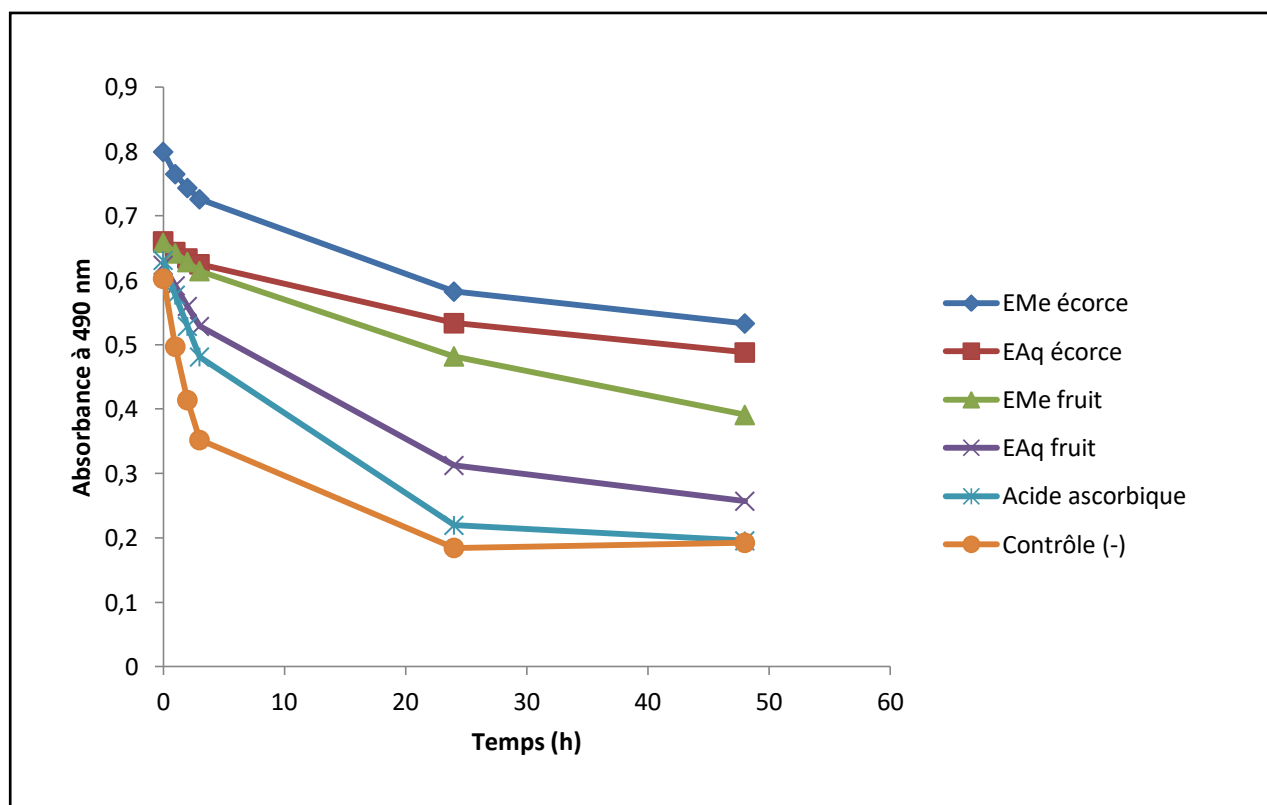


Figure 16. Cinétique de blanchissement du β -carotène à 490 nm en absence et en présence des extraits de *Ceratonia siliqua*, et de l'acide ascorbique (chaque valeur représente la moyenne de deux essais).

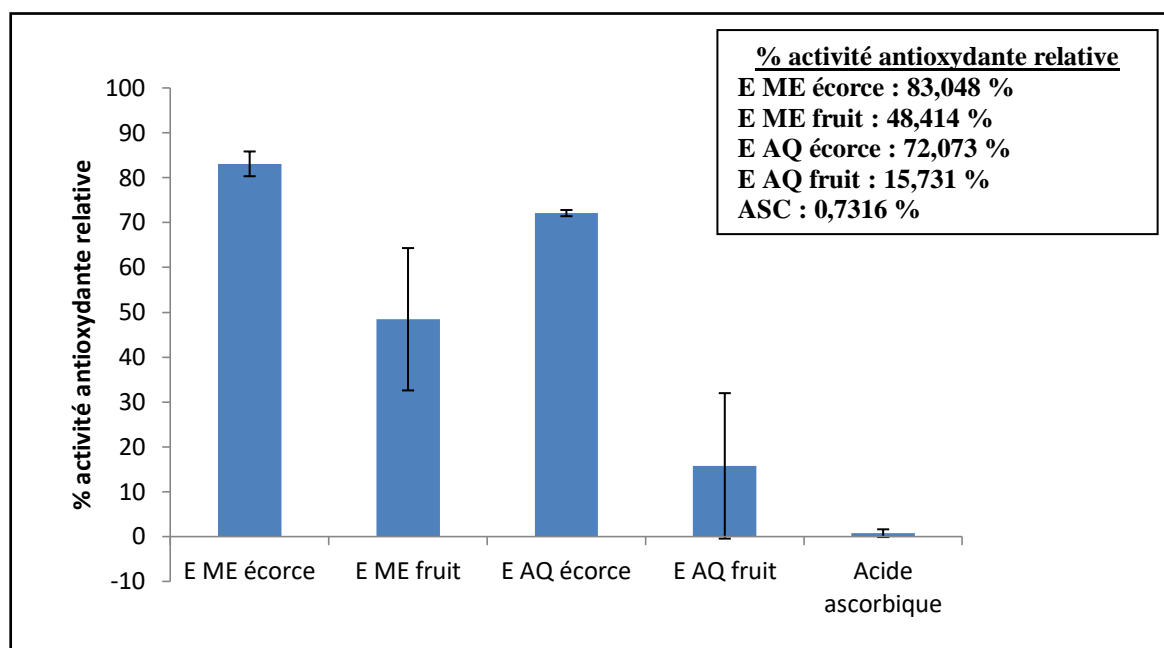


Figure 17. Activité antioxydante relative des extraits de *Ceratonia siliqua*, de l'acide ascorbique dans le système β -carotène/acide linoléique (les valeurs sont la moyenne de deux mesures \pm SD).

Les deux extraits méthanolique et aqueux de l'écorce (83% et 72%) montrent la plus grande activité inhibitrice suivi par l'extrait méthanolique de fruit (48%).

Cependant l'extrait aqueux de fruit montre une faible activité (15%).

L'activité des quatre extraits de caroubier est supérieure à celle de l'acide ascorbique (0,73%) .

La faible activité exercé par l'acide ascorbique (vitamine hydrosoluble) s'explique par le paradoxe des phénomènes polaires comme il est décrit par Frankel et ses collaborateurs (1994). Etant donné que le test de blanchissement du β carotène est similaire à un système d'émulsion de lipides dans l'eau, Frankel et Meyer (2000) ont proposé que les antioxydants apolaires exposent des propriétés antioxydantes plus importantes car ils sont concentrés au sein de l'interface lipide-eau, permettant ainsi de prévenir la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène. Alors que les antioxydants polaires restent dilués dans la phase aqueuse et sont ainsi moins efficaces dans la protection des lipides.

Selon plusieurs auteurs, le test d'inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène, paraît très utile comme un modèle mimétique de la peroxydation des lipides dans les membranes biologiques (Ferreria *et al.*, 2006).

L'importance de ce test, réside dans l'utilisation du β -carotène comme agent colorant dans les boissons, ainsi sa décoloration sera nettement à l'origine de la réduction de la qualité de ces produits (Bougatef *et al.*, 2009).

3.3. Activité anti-hémolytique de *Ceratonia siliqua* :

L'hémolyse est un phénomène irréversible au cours duquel les hématies sont détruites et libèrent leur contenu cellulaire notamment l'hémoglobine. Le degré d'hémolyse peut être régulé soit par : Des facteurs intracellulaires qui peuvent être : l'état de la membrane, le métabolisme énergétique intracellulaire, la structure de l'hémoglobine.

Des facteurs extracellulaires : tels que le plasma, l'état anatomique de l'appareil circulatoire et l'état fonctionnel du système mononuclé phagocytaire (macrophages, monocytes et leurs cellules souches) (Aguilar, 2007).

Les érythrocytes constituent un modèle cellulaire très adéquat pour l'étude du stress oxydant. En raison de la richesse de leurs membranes en acides gras polyinsaturés et la concentration cellulaire élevée en oxygène et en l'hémoglobine, ces cellules sont extrêmement susceptibles aux endommagements oxydatifs (Arbos *et al.*, 2008 ; Çimen, 2008). L'exposition des érythrocytes à une attaque radicalaire conduit donc à la rupture de leurs membranes plasmiques avec libération du contenu cellulaire mesurable à 540 nm.

Ce système cellulaire aurait pu être très utile pour l'étude de l'effet protecteur des extraits de l'écorce et des fruits de caroubier contre l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène. Cependant, ce test n'a pas pu être réalisé avec les extraits aqueux de fruit, les extraits aqueux et méthanolique de l'écorce.. ;), car on a constaté que ces extraits eux mêmes provoquent une hémolyse importante des erythrocytes. avant l'exposition à l'attaque radicalaire. L'effet hémolytique des extraits est probablement attribué à la présence des saponosides.

Ce résultats se concorde avec les travaux de Mebirouk-boudechiche et son équipe (2014) qui ont mesuré les teneurs en composés primaires et secondaires des feuilles de neuf arboristes fourragers y compris *Ceratonia siliqua*. Les résultats montrent que les feuilles du carobier possède une activité hémolytique (22,5 %) avec une teneur en saponines de l'ordre de 9,87 g équivalent diosgénine/kg MS).

Le seul extrait testé dans l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène est l'extrait méthanolique des fruits. L'absorbance et le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse de l' EM de fruit en fonction des déférentes concentrations d'extrait sont portés sur la **figure 18** et le **tableau III**.

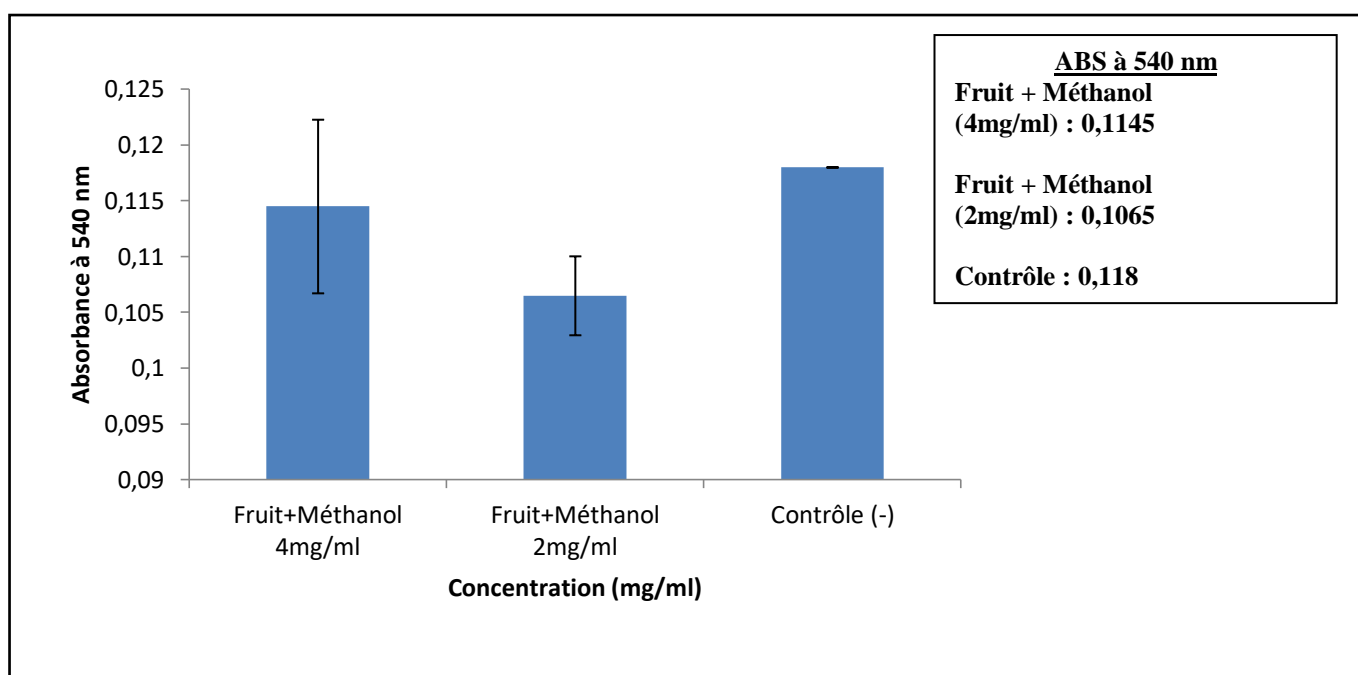


Figure 18 : Absorbance de l'hémoglobine en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de fruit de *Ceratonia siliqua*

Les résultats obtenus révèlent que l'EM des fruits (4mg/ml) de *Ceratonia siliqua* exerce une inhibition faible de l'ordre de 2,96 %. Cependant, une inhibition plus élevée (9,74%) est obtenue avec 2mg/ml d'extrait.

Tableau III : Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique de fruit de *Ceratonia siliqua*

Concentration de l'extrait (mg/ml)	Pourcentage (%)
4 mg/ml	2,96
2 mg/ml	9,74

Conclusion

Les plantes médicinales sont la source de la majorité des antioxydants naturels et elles restent encore sous exploitées dans le domaine médicale et l'industrie pharmaceutique. Sachant que les antioxydants sembleraient de manière significative à la prévention des maladies, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre de jour.

Ceratonia siliqua L ou familièrement connue sous le nom du Caroubier est l'une des plantes largement cultivées dans la zone méditerranéenne, elle est largement cultivée pour son fruit, la caroube, à des fins ornementales et industrielles.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités importantes en polyphénols dans les deux extraits méthanolique et aqueux de l'écorce. De même, le dosage des flavonoïdes par la méthode d'AlCl₃ montre que cette plante contient une quantité raisonnable de flavonoïdes.

Le potentiel anti radicalaire des extraits a été déterminé par la méthode de réduction du radical libre 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) et les résultats montrent que ces extraits possèdent des activités antioxydantes différentes dont l'extrait ME de l'écorce est le plus actif que les autres extraits.

Le test de blanchissement du β -carotène a montré également que l'extrait méthanolique et aqueux de l'écorce sont les extraits les plus actifs comme inhibiteurs de l'oxydation de l'acide linoléique couplée à celle du β -carotène.

Par ailleurs, l'étude *in vitro* des extraits de l'écorce et de fruit de *Ceratonia siliqua* contre l'hémolyse oxydative des érythrocytes a indiqué que l'extrait méthanolique de fruit possède un effet anti hémolytique, par contre les extraits méthanolique et aqueux de l'écorce et l'extrait aqueux de fruit ont une activité hémolytique.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que les extraits de l'écorce et de fruit de *Ceratonia siliqua* représentent une source naturelle prometteuse des molécules antioxydantes qui peuvent avoir des applications thérapeutique et préventive, et comme perspectives on propose :

D'identifier les molécules responsables de l'activité antioxydante par des méthodes plus performantes HPLC, spectrométrie de masse.

De confirmer l'activité antioxydante par des études *in vivo*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

Références bibliographiques

- Abdullatif Azab, (2017).** CAROB (*Ceratonia siliqua*): health, medicine and chemistry, *Vol (6)*, 456-469.
- Agbor G.A., Jeo V.A. & Patreck D.E., 2014:** Folin reagents for polyphenol assay ,147-156
- AGUILAR M. (2007).** Erythrocytes -MB7 : Hématologie. Faculté de médecine ; Montpellier, France.
- Ait Chitt. M ; Belmir. M. ; Lazrak. A, (2007).** Production des plantes sélectionnées et greffées du caroubier. Transfert de technologie en Agriculture, N°153, IAV Rabat, p.1-4.
- Akroum Souâd, (2011).** Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels, Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en science à Université Mentouri Constantine 1, p14-34.
- Alain Favier, (2003).** Le stress oxydant (l'intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique), *L'actualité Chimique* ,108-11.
- Arbos, K.A., Claro, L.M., Borges, L., Santos, C.A.M., Weffort-Santos, A.M. (2008)** Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. *Nutrition Research*. **28**: 457–463.
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunete, C., Dine, T., Vasseur, J., Gazin, J.C., Pinkas, M., Luycky, M., Gazin, M. (1996)** Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel-Forschung*. **46**: 1086-1089.
- Bakchiche B., Gherib A., Smail A., Cutodia G. & Graca M., 2013:** Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products* **46**, 85-96.
- Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira I C F R and Baptista P (2007).** Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, **103**, 413-419.
- Benamar benmahioul, Meriem k, Harch et Florence D, (2011).** Une espèce à usage multiple, *forêt méditerranéenne*.51-58.
- Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y and Nasri M (2009).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, **114**, 1198-1205.

Références bibliographiques

- Battle I. et Tous J., (1997).** « Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops». 17. Institute of plant Genetic and crops Plant Research. Gatersleben/ International Plant Ressources Institute. Rome.Italy. p97.
- Chwalek, M. (2004)** Hémisynthèse de saponosides à hédragenine. Etude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité hémolytique. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Reims Champagne-Ardennes. France.
- Çimen, M.Y.B. (2008)** Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta.* **39:** 1-11.
- Cronquist. A, (1981).** An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press p42.
- Custódio L., Escapa A., Patarra J., Aligué R., Fernando Alberício F., Neng N. Nogueira J., Romano A. (2013).** Sapwood of Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) a Potential Source of Bioactive Compounds. *Rec. Nat. Prod.* 7:3, pp: 225-229.
- Dllali S, Aloui F,Selmi H,Sebei H, (2018).** Comparison of the chemical composition and the antioxidant activity of the leaves of Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) Collected in three sites of Djebel Zaghouan (Tunisia). *Journal of new science Agriculture and Biotechnology* , Vol (21), 3429-3438.
- Dontha, S. (2016).** A review on antioxidant methods. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(2), 14-32.
- El Bouzdoudi B, Saïdi R, Embarch K, El Mzibri M, Nejjar El Ansari Z, El Kbiach M, Badoc A, Patrick M, Lamarti A, (2017).** Mineral composition of mature carob (*Ceratonia siliqua* L), *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, Vol (7): 91-103.
- El kahkahir M, Moustaine M, Bachir S, Lemrharia A, Zouhir R, Aitchitt M, Errkhi R, (2016).** Technical sheet on the culture carob tree (*ceratonia siliqua* L) in morocco.
- Fadel, F., Fattouch, S., Tahrouch, S., Lahmar, R., Benddou, A., Hatimi, A., (2011).** The phenolic compounds of *Ceratonia siliqua* pulps and seeds. *J. Mater. Environ. Sci.*, Vol (2), 285-292.

Références bibliographiques

- Ferreria, A., Proenca, C., Serralheiro, M.L.M., Araujo, M.E.M. (2006)** The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plant from Portugal. *Journal of ethnopharmacology*. **108**: 31-37.
- François Nsemi muanda, (2010)**. Identification de polyphenols, évaluation de leur activité antioxydant et étude de leurs propriétés biologiques, Thèse doctorat, Université Paul Verlaine-metz.
- Gaouar Naila épouse Borsali, (2011)**. Etude de la valeur nutritive de la caroube de différentes variétés Algériennes, thèse en vue de l'obtention du diplôme de Magister en agronomie, université abou bekr belkaid-Tlemcen.
- Haddarah Amira, (2013)**. L'influence des cultivars sur les propriétés fonctionnelles de la caroube libanaise (thèse en cotutelle université libanaise et l'université lorraine France).p 13, 12, 30.
- Hagerman A.E., 2002**: Tannin Chemistry (www.users.muohio.edu/hagermae). *Institute of Animal Nutrition, University of Hohenheim (Germany)*.
- Hidayat M.A., Fitri A. & Kuswandi B., 2017**: Scanometry as microplate reader for high throughput method based on DPPH dry reagent for antioxidant assay. *Acta Pharmaceutica Sinica B*.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004)** Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*. **142**: 31-2.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen., A. (2007)** Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*. 100: 584–589.
- Klenow S., Gleis M., Haber B., Owen R et Pool-Zobel B.L, (2007)**. Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food and Chemical Toxicology*.
- Kumazawa S, Hayashi K, Kajiya K, Ishii T, Hamasaka T and Nakayama T (2002)**. Studies of the constituents of *Uruguayan propolis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4777-4782.

Références bibliographiques

- Lachkar N, Al-Sobarry M, El Hajaji H, Lamkinsi T, Lachkar M, Yahia Cherrah Y, and Alaoui K, (2016).** Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Ceratonia siliqua L.* methanol Barks extract, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. Vol (8) 202-210.
- Lee K. W., Kim Y. J., Lee H. J. & Lee C. Y., 2003:** Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem* **51**, 7292-7295.
- Li, H.B., Cheng, K.W., Wong, C.C., Fan, K.W., Chen, F., Jiang, Y 2007.**, Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemist.* 102(2007) 771-776.
- Liyana-Pathirana, C.M., Shahidi, F. (2006)** Antioxydant properties of commercial soft and hard winter wheats (*Triticum aestivum L.*) and their milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* **86**: 477-485.
- Manna, C., D'angelo, S., Migliardi, V., Loffredi, E., Mazzoni, O., Morrica, P., Galletti, P., Zappia, V. (2002)** Protective effect of the phenolic fraction from virgin olive oils against oxidative stress in human cells. *Journal of agricultural and food chemistry.* 50: 6521-6526.
- Mansouri, A., Embarek, G., Kokkalou, E., Kefalas, P. (2005)** Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chemistry.* 89: 411-420.
- Mbaebie B.O., Edeoga H. O. & Afolayan A. J., 2012:** Phytochemical analysis and antioxidants activities of aqueous stem bark extract of *Schotia latifolia Jacq.* *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 118-124.
- MEBIROUK-BOUDECHICHE, L., CHERIF, M., BOUDECHICHE, L., SAMMAR, F. (2014).** Levels of primary and secondary compounds of foliage from fodder shrubs of Algerian wet area. *Revue Méd. Vét.*, 165, 11-12, 344-352.
- Metrouh hassiba épouse Amir, (2009).** Etude du pouvoir antioxydant de *Ceratonia siliqua* : Effets de la température et du solvant d'extraction, Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de magiste en Biologie, université abderrahmane mira bejaia.
- Mohammed Yahya Hadi, Imad Hadi Hameed, Israa Adnan Ibraheam. (2017).** *Ceratonia siliqua*: Characterization, *Pharmaceutical Products and Analysis of Bioactive Compounds*, 1827-1831.

Références bibliographiques

- Molyneux P., 2004:** The use of the stable free radical of Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)forrestination antioxidant activity .*songklankarinJ.sectechol* **26**, 211-219.
- Mpondo, E., Dibong, S.D, (2012).** Traditional knowledge on medicinal plants use by ethnic communities in Douala, Cameroon. *European Journal of Medicinal Plants*, vol. 2, pp. 159-176.
- Neuzil. J. ; Stocker. R. (1993).** Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters*. 331: 281-284.
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.O. (2002)** Physiological action of antioxidant defences. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. **16**: 233-239.
- Pokorny J. & Ai., 2001:** Antioxydants in food, Practical applications. *Woolhead Publishing Limited*. ISBN: 1 85573-463X.
- Quezel P. et Santa S. (1962/63).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méditerranéennes. Tome 1. Edit CNRS. Paris.
- Rebour H., (1968),** fruits Méditerranéen, la maison rustique Paris.
- Rezaire, (2012).** Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa), Thèse pour le doctorat en phytochimie, Université des Antilles et de la Guyane, p 51-52.
- Ribéreau-Gayon. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Ed Dunod, Paris, p : 5-7 ,10-13, 55-86.
- Sahabi bakasso, (2009).** Etude phytochimique et potentialités biologique de cinq espèces d'indigofera (fabaceae) utilises en médecine traductionnelles au Burkina Faso, Thèse unique, université Ouagadougou, p1.
- Sébastien Gillet, (2018).** Etude des relations entre la structure des galactomannane de caroube et leurs propriétés fonctionnelles (communauté française de Belgique, université de liege. Gembloux agro bio tech), p 28,30.
- Simon M, (2010).** Production enzymatique d'oligosaccharides à partir de gomme de caroube. Mémoire : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).

Références bibliographiques

- Sparg, S.G., Light, M.E., Van Staden, J. (2004)** Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. **94**: 219-243.
- Sylvie Morel, (2011)**. Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae), (thèse doctorat, université d'Angers), p25.
- Yi Z., Yan Y., Liang Y.& Zeng B., 2008**: In vitro antioxidant and antimicrobial Activities of Pericarpium Citri Reticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid. *LWT* **41**,597- 603.
- Zhang L., Fu Q. & Zhang Y., 2016**: Composition of anthocyanins in pomegranate flowers and their antioxidant activity. *Food Chemistry* **127**(4), 1444-1449.

Ceratonia siliqua L هي شجرة فاكهة متوسطة تنتمي إلى عائلة البقوليات (Fabaceae) ، ولها أهمية بيئية واجتماعية واقتصادية وعلاجية. الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات المائية والميثانولية لحاء وفاكهة *Ceratonia siliqua*. يظهر التقدير الكمي لمجموع البوليفينول بواسطة طريقة Folin-Ciocalteu والفلافونويدات بواسطة طريقة ثلاثي كلوريد الأمونيوم ثراء المستخلص الميثانولي من اللحاء في البوليفينول (205.125 ميكروغرام EAG / ملغ) ومستخلص الفاكهة الميثانولية في الفلافونويد (15.53 ميكروغرام EQ / ملغ). يظهر التقييم الكمي لقوة الاصطياد للمستخلصات فيما يتعلق بـ DPPH أن المستخلص الميثانولي من اللحاء هو الأكثر نشاطاً مع IC50 بترتيب 0.4493 مجم / مل ، وهذا النشاط مشابه لنشاط فيتامين سي. علاوة على ذلك ، يكشف اختبار التبييض بيتا كاروتين أن المستخلص الميثانولي من اللحاء هو الأكثر نشاطاً مع تثبيط بنسبة 83.048%. يتم اختبار النشاط المضاد للأكسدة لمستخلصات الخروب على خلايا الدم الحمراء ، والمستخلص الميثانولي للفاكهة هو المستخلص الوحيد الذي له تأثير وقائي ضد انحلال الدم التأكسدي الناتج عن بيروكسيد الهيدروجين.

الكلمات المفتاحية : *Ceratonia siliqua* L ، البوليفينول ، الفلافونويد ، النشاط المضاد للأكسدة ، انحلال الدم التأكسدي.

Résumé

Ceratonia siliqua L est un arbre fruitier méditerranéen qui appartient à la famille des légumineuses (Fabacées), il possède une importance écologique, socio-économique et thérapeutique.

L'objectif de cette étude est l'évaluation de l'activité anti-oxydante des extraits aqueux et méthanoliques de l'écorce et du fruit de *Ceratonia siliqua*.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et des flavonoïdes par la méthode au trichlorure d'ammonium montre la richesse de l'extrait méthanolique de l'écorce en polyphénols (205.125 µg EAG/mg) et l'extrait méthanolique de fruit en flavonoïdes (15.53 µg EQ/mg).

L'évaluation quantitative du pouvoir piègeur des extraits vis-à-vis du DPPH montre que l'extrait méthanolique de l'écorce est le plus actif avec une IC50 de l'ordre de 0,4493 mg/ml, cette activité est similaire à celle de la vitamine C.

Par ailleurs, le test de blanchissement du β-carotène révèle que l'extrait méthanolique de l'écorce est le plus actif avec une inhibition de 83,048%.

L'activité antioxydante des extraits de caroubier est testée sur des globules rouges, l'extrait méthanolique des fruits est le seul extrait qui a exercé un effet protecteur contre l'hémolyse oxydative induite par le peroxyde d'hydrogène.

Mots clés : *Ceratonia siliqua* L, polyphénols, flavonoïdes, activité antioxydante, hémolyse oxydative.

Summary

Ceratonia siliqua L is a mediterranean fruit tree which belongs to the family of legumes (Fabaceae), it has ecological, socio-economic and therapeutic importance.

The objective of this study is the evaluation of the antioxidant activity of the aqueous and methanolic extracts of the bark and the fruit of *Ceratonia siliqua*.

The quantitative estimation of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method and of flavonoids by the ammonium trichloride method shows the richness of the methanolic extract of the bark in polyphenols (205.125 µg EAG/mg) and the extract methanolic fruit in flavonoids (15.53 µg EQ/mg).

The quantitative evaluation of the trapping power of the extracts with respect to DPPH shows that the methanolic extract of the bark is the most active with an IC50 of the order of 0.4493 mg/ml, this activity is similar to that of vitamin C.

Moreover, the β-carotene bleaching test reveals that the methanolic extract of the bark is the most active with an inhibition of 83.048%.

The antioxidant activity of carob extracts is tested on red blood cells, the methanolic extract of the fruits is the only extract that exerted a protective effect against oxidative hemolysis induced by hydrogen peroxide.

Key words : *Ceratonia siliqua* L, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, oxidative hemolysis.