

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE.

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA
NATURE DE LA VIE DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS.

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE.

LABORATOIRE DES PRODUITS NATURELS "LAPRONA"

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN BIOLOGIE.

OPTION : SCIENCES DES ALIMENTS.

THÈME :

Inscrip. Sup. N°
Date de : 17/09/2013
Conte

Détermination De L'activité Antioxydante des polyphénols du Caroubier
(Cératonia siliqua) de la région de Tlemcen.



PRÉSENTÉ PAR: M^{elle} Ben Khaldi Hassiba.

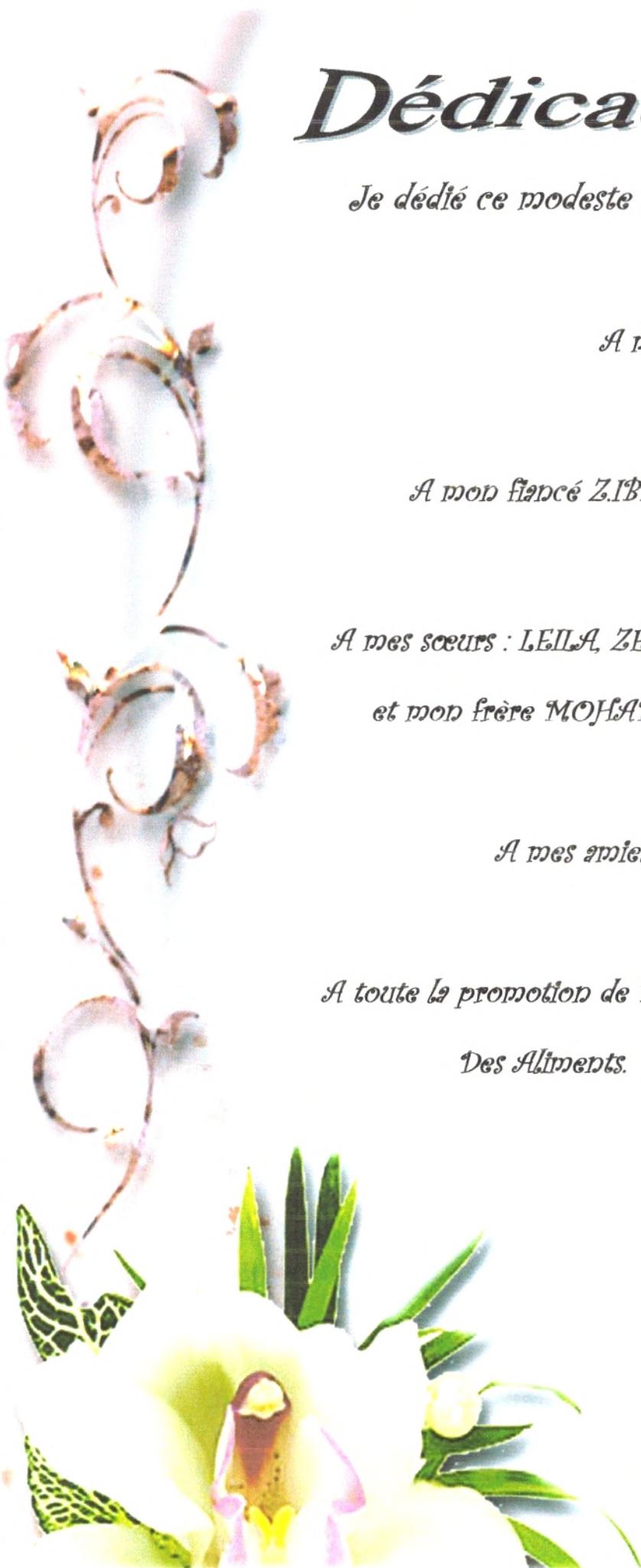
SOUTENU LE: 25/06/2013.

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

- ❖ Présidente : M^{me} Belarbi M. ; Professeur, Université de Tlemcen.
- ❖ Examineur : M^r Baghdad C ; Maître de conférences de classe B, Université de Tlemcen.
- ❖ Encadreur : M^r Benammar C. ; Maître de conférences de classe B, Université de Tlemcen.



Année Universitaire :2012-2013.



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents :

A mon fiancé ZIBRAHIM ;

A mes sœurs : LEILA, ZEINEB, ILHAM,

et mon frère MOHAMED ;

A mes amies ;

A toute la promotion de Master Sciences

Des Aliments.

Remerciements :

 Je tiens à remercier avant tous Allah le tout puissant qui m'a donné la santé, le courage, la volonté et la patience de réaliser ce travail.

 Mes sincères remerciements et ma profonde reconnaissance sont adressés à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail, notamment :

- *Monsieur : Benammar C. ; pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ces conseils et la confiance qu'il m'a accordé m'ont permis de réaliser ce travail.*
- *Madame : Gauoat N. ; pour avoir m'aider au cours de la partie expérimentale et pour ces conseils, ces encouragements et sa gentillesse.*

 Je tiens à remercier également les membres de jury: M^me Belarbi M. et M^r Beghdad C. ; d'avoir accepté de juger ce travail.

 Un remerciement exceptionnel à mes parents et à toute ma famille et à mon fiancé IBRAHIM pour leur soutien, leur présence et leurs encouragements ainsi qu'à toute mes amies.

Tables des matières:

<u>Titres.</u>	<u>Pages.</u>
Liste des figures.	
Liste des tableaux.	
Liste des abréviations.	
Introduction	1
Chapitre 1 : Présentation du caroubier	3
1-Origine et historique	4
2-Etymologie	4
3-Etude botanique	4
3-1-Taxonomie.....	4
3-2- Description morphologique du caroubier.....	5
3-2-a- Arbre	5
3-2-b- Racines.....	6
3-2-c- Tronc.....	7
3-2-d- Feuille.....	7
3-2-e- Fleurs	8
3-2-f- Floraison	9
3-2-h- Fruit	9
3-3- Multiplication du caroubier	10
3-3- a- multiplication par semis	11
3-3- b- multiplication par bouturage	11
3-3-c- multiplication par culture in vitro ou la micro propagation.....	11
3-3- d- Multiplication par greffage	11
4- Ecologie du caroubier	11
5-Répartition géographique.....	12
6-Production et récolte	14
6-a-Production mondiale.....	15
6-b-Production en Algérie.....	16

6-c-Récolte.....	17
7-Composition chimique de la caroube	17
7-a-La pulpe de gousse de caroube	17
7-b-La farine de graines de caroube	17
7-c-La protéine de germe de caroube	18
8-Les polyphénols de la caroube	18
9-Les utilisations du caroubier.....	18
9-1-Arbre	18
9-2-Les feuilles	18
9-3-Fruit	19
9-3-a-La farine de pulpe de caroube	19
9-3-b- La farine de graines de caroube	19
9-3-c-La protéine de germe de caroube	19
9-4-Ecorce	20
10- Utilisations en médecine traditionnelle	20
10-a-Action phytothérapeutique	20
10-b- La médecine traditionnelle	20
Chapitre2 : Métabolites secondaires et activité antioxydante.....	21
1-Introduction.....	22
2- Les métabolites primaires.....	22
3- Les métabolites secondaires	22
3. Classification des métabolites secondaires	23
3-a-Composés phénoliques	25
3-a-1.Les flavonoïdes	26
3-a-2. Les tanins	29
3-a-3.Les non flavonoïdes	30
4-L'activité antioxydante des polyphénols	31
5- Rôle et intérêt des composés phénoliques	31
5-a- Chez les végétaux	31
5-b- Chez les humains.....	31
5-c- Rôle antioxydant des polyphénols	32
5-c- 1-Les radicaux libres:	32
5-C- 2-Rôle antiradicalaire des polyphénols	33
Chapitre 3 : Matériels et méthodes.....	34

1-Préparation du matériel biologique végétal.....	35
2- Détermination des métabolites secondaires	35
2-a- Extractions selectives	35
2-b- Extraction des polyphenols totaux.....	35
2-c- Extraction des tanins.	35
2-d- Extraction des flavonoides.	36
3-Tests d'activité antioxydante	36
3)-1- Test du radical DPPH(2,2-diphenyle-1- picrylhydrazyle).....	36
3)-2- Test de la réduction du fer,(Ferric reducing antioxydant power) FRAP.....	38
3)-3- Test du blanchiment du β carotène	39
4)- L' EC ₅₀	40
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	41
1. L'extraction des polyphénols	42
2. La détermination de l'activité antioxydante	43
2. 1 .la détermination de l'activité antioxydante par la méthode DPPH.....	43
2. 2.La détermination de l'activité antioxydante par la méthode FRAP	47
2.3. La détermination de l'activité antioxydante par la méthode B-Carotène	51
3. Comparaison entre des trois méthodes.....	53
Conclusion.....	55
Références bibliographiques.....	57
Annexes.	
Résumé.	

LISTES DES FIGURES :

Figure 1: L'arbre du caroubier (<i>Ceratonia siliqua L.</i>)	6
Figure 2 : Le tronc du caroubier.....	7
Figure 3 : les feuilles du caroubier.....	3
Figure 4: Inflorescence du caroubier.....	8
Figure 5: Les grains de pollen du caroubier.....	9
Figure 6 : Caroube vert.....	10
Figure 7: Caroube mûr.....	10
Figure 8: les gousses et les graines de la caroub.....	11
Figure 9: Centres d'origine et distribution du caroubier dans le monde.....	13
Figure 10 : Distribution du caroubier en Algérie suivant les domaines bioclimatiques...	14
Figure 13: Classification des quelques métabolites secondaires.....	24
Figure 14 : les différentes polyphénols	26
Figure 15 : Structure générale des flavonoïdes.	27
Figure 16 : Dérivés de l'acide benzoïque -formule générale.	30
Figure 17 Dérivés de l'acide cinnamique formule générale.....	30
Figure 18: UV-VIS spectrophotomètre.....	37
Figure 20 : Solution de DPPH après réaction avec l'extrait phénolique.....	36
Figure 21 : Les rendements des composées phénoliques.....	42
Figure 22 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits phénoliques de la pulpe de <i>Ceratonia siliqua L.</i>	43
Figure 23 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits phénoliques de la graine de <i>Ceratonia siliqua L.</i>	45
Figure 24: Les valeurs des concentrations inhibitrices EC_{50} des différents extraits en mg/ml.	46
Figure 25: Pouvoir réducteur (FRAP) des 3 extraits phénoliques de la pulpe <i>Ceratonia siliqua L.</i>	48
Figure 26 : Pouvoir réducteur (FRAP) des 3 extraits phénoliques des graines	48
Figure 27: Valeurs des EC_{50} des différents extraits en mg/ml.....	50

Figure 28 : L'Activité antioxydante relative des extraits phénoliques de la pulpe du B-carotène (les valeurs sont la moyenne de 2 mesures).....	51
Figure 29: d'Activité antioxydante des extraits phénoliques des graines du B- carotène (les valeurs sont la moyenne de 2 mesures)	51
Figure 30: Valeurs des EC ₅₀ des différents extraits en mg/ml.....	53

Liste des tableaux:

Tableau 1 : Classification classique.....	5
Tableau 2 : Superficie occupée par le caroubier.....	15
Tableau 3 : Production mondiale de caroube.....	16
Tableau 4: Principales classes des flavonoïdes.....	27
Tableau 5 : Les rendements des composés phénoliques du <i>Cératonia siliqua</i>	42
Tableau 6 : Les quantités des composés phénoliques du <i>Cératonia siliqua</i>	46
Tableau 7: Valeurs des EC ₅₀ trouvées pour les extraits des deux parties de la plante	46
Tableau 8: Valeurs des EC ₅₀ trouvées pour les extraits des deux parties de la plante.....	50
Tableau 9 : Valeurs des EC ₅₀ trouvées pour les extraits des deux parties de la plante.....	53

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BHT : le dibutylhydroxytoluène .

BHA : le butylhydroxyanisole .

CaCO₃ : Carbonate de Calcium.

C° : Degré Celsius.

DO : Densité optique.

DPPH : 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl.

EC₅₀: Concentration Efficace à 50%.

g : Gramme.

H₂O₂ : Le peroxyde d'hydrogène

mg : milligramme.

J.C : Jésus Christ.

M : molaire.

m : mètre.

MgSO₄ : Sulfate de magnésium.

mm : millimètre.

ml : millilitre.

µl : Microlitre.

MeOH : Méthanol.

nm : nanomètre.

R : rendement.

t/min :tours par minutes.

T : Tonne.

V : Volume.

UV/VIS: Radiation ultraviolette/ Visible.

%: Pourcentage.

~
1
~

Introduction

L'Algérie est un grand pays, sa situation géographique à donner une biodiversité en climat qui a influé sur le monde végétale. Ce dernier est très riche en plantes utilisées comme herbes médicinales et comme aliments naturels. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées à partir de ces plantes et beaucoup d'entre elles sont utilisées en médecine traditionnelle.

Parmi ces plantes, On trouve le caroubier (*Ceratonia siliqua L.*) appartenant à la grande famille des légumineuses. C'est une essence presque endémique du pourtour méditerranéen, cultivé depuis longtemps pour ses produits dérivés mais aussi pour sa résistance au manque d'eau. La gousse du caroubier, comestible et sucrée, présente une valeur énergétique importante (**Bine et al, 2007**). Deux principaux produits sont tirés de la caroube :

-La gomme, extraite de l'endosperme de la graine, est utilisée dans les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques, cinématographiques, textiles et cosmétiques. Etant le dérivé le plus recherché de la caroube, la gomme possède des caractéristiques très intéressantes en tant que multi additif (**Sbay et, 2008**).

-La farine, obtenue en séchant, torréfiant et moulant les gousses après les avoir débarrassées de leurs graines, est employée pour la production industrielle de bioéthanol et d'acide citrique (**Makris et Kefalas, 2004**) mais surtout en agroalimentaire comme antioxydant grâce à sa composition riche en polyphénols.

La caroube contient 2 à 20% de composés phénoliques (**Makris et Kefalas, 2004**), 24 différentes structures principales ont déjà été identifiées et leur teneur déterminées par **Owen et al, (2003)**. Des études récentes ont montré que d'autres parties de l'arbre tel que la feuille (**Whiteley et Klurfeld ,2009 ; Tahiri et al ; 2009**) et l'écorce (**Alaoui et al ; 2010**) sont également riches en composés phénoliques. Il est prouvé actuellement que ces composés offrent des possibilités chimio-préventives intéressantes contre certains cancers, en particulier ceux de la région gastro-intestinale (**El Hajaji et al, 2011**).

Plusieurs autres activités biologiques différentes sont attribuées aux composés phénoliques, dont notamment, antioxydante (**Rice-Evans et al, 1995**), antimutagène (**Yamagishi et al ,2000**), anticarcinogène (**Mukthar et al, 1992**), antiproliférative (**Manthey**

et *al*,2002) et antioestrogénique (Messinaet *al*, 1991). Il a également été prouvé que ces biométabolites jouent un rôle indéniable dans la protection des plantes vis à vis de différents stress (Dai et *al*,1995) et qu'ils peuvent de ce fait subir des fluctuations très importantes.

Dans ce contexte, L'objectif de notre travail vise à démontrer les rendements des composées phénoliques de notre plante et à déterminer leur activité antioxydante *in vitro*. Pour cela notre étude englobe deux aspects :

- Dont le premier est d'ordre phytochimique basé principalement sur l'extraction et la quantification des composés phénoliques.
- Le second aspect est consacré à une évaluation de l'activité antioxydante des composées phénoliques par trois tests chimiques différents:
 1. le test de piégeage du radical diphényl picryl hydrazyl (DPPH),
 2. la mesure du pouvoir réducteur (FRAP),
 3. la technique de décoloration du β -carotène.

Ce travail est planifié comme suit :

- ✓ Le premier chapitre de ce mémoire est consacré à l'étude bibliographique de caroubier. Celle-ci est constituée d'une description botanique de la plante et d'une présentation générale des composées chimiques qu'elle contient. La distribution géographique, la production et la récolte sont également résumés. Enfin, l'utilisation en médecine traditionnelle ainsi que les potentiels thérapeutiques, économiques et écologiques de caroubier sont abordés,
- ✓ Le deuxième chapitre présente les métabolites secondaires, leurs classifications, rôle et intérêt des composés phénoliques, l'activité antioxydante des polyphénols,
- ✓ Le troisième chapitre présente les matériels et les méthodes utilisés pour l'extraction et la détermination de l'activité antioxydante des composées phénoliques de deux parties de la gousse du caroubier (pulpe, graine),
- ✓ Le quatrième chapitre présente les résultats obtenus lors de l'extraction et la détermination de l'activité antioxydante des composées phénoliques avec les discussions,
- ✓ Et enfin, nous avons complété cette étude par une conclusion générale.

232

Chapitre 1 : Présentation du caroubier

1-Origine et historique :

L'origine de "caroubier" semble être de l'Est de la méditerranée est domestique depuis 4000 ans avant J.C ; Sa culture extensive date au moins de 2000 ans avant J.C (**Battle et tous, 1997 ; Gharnit, 2003; Berrougui, 2007**). Il est connu dans le proche Orient et les îles de la méditerranée. En Egypte les pharaons ont utilisé la farine du fruit de « caroubier » pour rigidifier les bandelettes des momies en XVIIe Siècle avant J.C.

Le "**caroubier**" a d'abord été propagé par les Grecques, puis par les Arabes et les Berbères de l'Afrique du nord, en Grèce et en Italie, en Espagne et en Portugal (**Rejeb, 1995 ; Gharnit, 2003**), ensuite il a été introduit en Amérique du Sud, du Nord et en Australie par les Espagnols (**Berrougui, 2007**).

2-Etymologie :

Le mot "**caroubier**" vient de l'arabe **el kharroube**, **ahkhabou** en berbère, **Charuv** en Hébreu, **algarrobo** ou **garrofero** en espagnol. Son nom latin **Ceratonia** vient du grec *keratia* signifiant "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. Il est aussi appelé Carouge, Pain de saint Jean-Baptiste, figuier d'Égypte, fève de Pythagore (**Battle et Tous, 1997**). En outre, les graines de caroube, vu leur uniformité, sont appelées 'carats' et ont servi pendant longtemps aux joailliers comme unité de poids pour peser les diamants, les perles et d'autres pierres précieuses (1 carat =205.3mg), (**Rejeb, 1995 ; Bllil et Boussafi, 2011**).

3- Etude botanique :

3-1-Taxonomie:

Le caroubier (***Ceratonia siliqua* L**), est un arbre appartenant à la famille des ***Leguminosae (Fabaceae)*** et de l'ordre des Rosales. Il est généralement placé dans la tribu des ***Cassieae***, sous famille des ***Caesalpinoïdeae***. La seconde espèce du genre, ***Ceratonia oreothauma*** décrite par (**Hillocaot et al, 1980**), contient selon leurs origines deux sous-espèces distinctes:

-La sous-espèce *oreoethauma* qui est native d'Arabie (Oumane),

-Et la sous-espèce *somalensis* qui est native du nord de la Somalie (Batlle et Tous, 1997 ; Konaté, 2007).

Tableau 1 : Classification classique (Lewis et al, 2005).

Règne	<i>Plantae--plantes</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta- angiospermes,phanérogames</i>
Classe	<i>Magnoliopsida--dicotylédones</i>
Sous-classe	<i>Rosidae</i>
Ordre	<i>Fbales</i>
Famille	<i>Fabaceae (Légumineuses),</i>
Sous-famille	<i>Caesalpinoïdeae</i>
Genre	<i>Cératonia</i>
Espèce	<i>Cératonia siliqua</i>

3-2- Description morphologique du caroubier :

3-2-a- Arbre :

Le caroubier est un arbre à croissance lente, pouvant atteindre une quinzaine de mètres de hauteur (Quezel et Santa, 1962/63). Il peut atteindre dans des conditions propices une hauteur de 7 à 10 m et même 15 à 20 m en Orient. Sa croissance est très lente, particulièrement au début.



Figure 1: L'arbre du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.).

Source : http://p5.storage.canalblog.com/51/31/338481/80917460_o.jpg&imgrefurl.

C'est un arbre xérophytique, pérenne (persistant), sa longévité est considérable, jusqu'à 200 ans (**Ait Chitt et al, 2007**). Il se trouve souvent placé dans des conditions de déficit hydrique et soumis fréquemment à des pressions sélectives limitant la productivité et la qualité des récoltes de gousses (**Rejeb et al, 1991**). L'arbre est dioïque, parfois hermaphrodite et rarement monoïque (**Linskens and Scholten, 1980; Batlle et Tous, 1988**).

Le caroubier est un arbre alternant. Cette alternance est contrôlée génétiquement, mais elle peut être accentuée par des facteurs climatiques et de stress ou des pratiques culturales inadéquates (**Ait Chitt et al, 2007**).

3-2-b- Racines:

Le caroubier a des racines fortes qui pénètrent dans le sol pour atteindre une profondeur de 18 m ou même plus. Il peut émettre des rejets de souche avec vigueur et se caractérise par des branches solides et robustes (**Ait Chitt et al, 2007**).

3-2-c- Tronc:

Le caroubier a une circonférence à la base du tronc de 2 à 3 m (Ait Chitt et *al*, 2007).



Figure2 : Le tronc du caroubier.

Source : <http://krapooarboricole.files.wordpress.com/2010/09/caroub-2.jpg&imgrefurl>.

3-2-d- Feuille:

Les feuilles du caroubier sont composées, persistantes, vertes, luisantes sur la face dorsale, plus claires et mates sur la face ventrale, à folioles ovales entières légèrement échancrées au sommet, paripennées.



Figure 3 : les feuilles du caroubier.

Source : <http://www.phrygana.eu/Flora/Fabaceae/Ceratonia-siliqua / P1680274 .JPG &imgrefurl>.

La feuille est composée de 4 à 10 folioles glabres (Rejeb, 1995). Le caroubier ne perd pas ses feuilles en automne sauf en juillet chaque deux ans, lesquelles sont renouvelées au printemps de la même année, en avril et mai (Gharnit, 2003).

3-2-e- Fleurs :

Les fleurs du caroubier sont regroupées en grappes latérales, habituellement dressées ou ascendantes, brièvement pédonculées. Initialement, les fleurs sont bisexuelles; il y a suppression d'un axe durant le développement et le fonctionnement des cellules pour aboutir à des fleurs mâles ou femelles (Gharnit, 2003).

Les fleurs femelles sont constituées d'un pistil court et recourbé avec un petit ovaire (5 à 7mm) bi-carpelle. Les stigmates sont bilobés et couvertes par des papilles. A la base, le disque nectarifère est entouré de 5 à 6 sépales rudimentaires. Par contre, la corolle est absente et les fleurs mâles portent 5 étamines (Aafi, 1996).



Figure 4: Inflorescence du caroubier.

Source:<http://www.phrygana.eu/Flora/Fabaceae/Ceratonia-siliqua/P1680274.JPG&imgrefurl>.

Les grains de pollen sont ellipsoïdes avec aux pôles 28 à 29 μm de diamètre et à l'équateur 25 à 28 μm (Ferguson, 1980; Linskens et Scholten, 1980) et peuvent germer facilement (Sfakiotakis, 1978).



Figure 5: Les grains de pollen du caroubier.Source:

<http://www.phrygana.eu/Flora/Fabaceae/Ceratonia-siliqua/P1680274.JPG> & imgrefurl.

La pollinisation des fleurs du caroubier est, en grande partie, assurée par les insectes (**Retana et al, 1990, 1994 ;Rejeb et al, 1991 ;Ortiz et al, 1996**) mais aussi par le vent (**Passos de Carvalho, 1988 ;Tous et Batlle, 1990**).

3-2-f- Floraison :

Le caroubier est considéré comme le seul arbre méditerranéen qui fleurisse en été : d'août à octobre (**Aafi, 1996**) ou en automne : de septembre à novembre (**Fournier, 1977**). Le temps et la durée de la floraison dépend des conditions climatiques (**Battle et tous, 1997**).

3-2-g- Fruit :

Le fruit du caroubier se développe très lentement nécessitant 9 à 10 mois pour atteindre la maturité. (**Battle et Tous, 1997 ;Konaté, 2007**). Leur croissance passe par trois stades de développement qui sont :

- Le premier stade : correspond à une croissance lente en automne et en hiver durant lequel la gousse montre une légère augmentation du poids,
- Le deuxième stade : correspond à une croissance rapide entre avril et août caractérisé par une période d'activité de la gousse en début printemps,
- Le troisième stade : la gousse s'accroît lentement, mûrit et se durcit en juin, change de la couleur verte en brun. Ainsi, la gousse devient mûre après dix mois (**Ait Chitt et al, 2007**).

Le fruit du caroubier est de grande taille, 10 à 30 cm de longueur et 2 à 3.5 cm de largeur et indéhiscence après maturité. Il est vert puis brun et au moment de la maturité, brun foncé à noir. Il est sinueux sur les bords, aplati, droit ou arqué et présente un tissu pulpeux, sucré et rafraîchissant. La gousse est séparée à l'intérieur par des cloisons pulpeuses et renferme 12 à 16 graines brunes dont la longueur et la largeur sont respectivement de 8 à 10 mm et de 7 à 8 mm (Batlle et Tous, 1997 ;Konaté, 2007).



Figure 6 : Caroube vert.



Figure 7: Caroube mûr.

(Source : Figure 6 :<http://www.phrygana.eu/Flora/Fabaceae/Ceratonia-siliqua/P1680274.JPG&imgrefurl> ; Figure7 : http://en.wikipedia.org/wiki/Ceratonia_siliqua).



Figure8:les gousses et les graines du caroube.

(Source :<http://amateurs-de-bassins.nicetopic.net/t1682-caroubier>).

3-3- Multiplication du caroubier :

La multiplication du caroubier peut se faire avec 5 méthodes qui sont :

3-3-a- multiplication par semis :

C'est une méthode classique et la seule utilisée jusqu'à présent pour multiplier le caroubier (Ait Chitt et al, 2007). La germination par semis est facilement réalisable, mais elle est entravée par l'impossibilité de connaître le sexe de la plante avant la maturation et la production tardive qui peut prendre 8 ans de plus (Rejeb, 1995 ; Gharnit, 2003).

3-3-b- multiplication par bouturage :

C'est une technique végétative possible mais limitée en pratique. Les résultats varient en fonction des arbres (génétique), de la nature de la bouture (Ait Chitt et al, 2007). Elle demande des soins très minutieux et une température édaphique élevée (Rejeb, 1995).

3-3-c- multiplication par culture in vitro ou la micro propagation:

C'est une technique prometteuse (Ait Chitt et al, 2007). Elle permet d'obtenir une plante conforme à la plante d'origine et réaliser à partir de plantules et de plantes adultes (Sebastian et Mc Comb ,1986 ; Batlle et Tous, 1997) et avec les explants : les nœuds prélevés des plantules issues de germination (Belaizi et al, 1994) et les bourgeons axillaires (Saidi et al, 2007). Les plantations ont été réalisées surtout en Algérie et en Tunisie (Ramon-Laca et Maberley, 2004).

3-3-d- Multiplication par greffage :

C'est une technique efficace et maîtrisée (Ait Chitt et al, 2007).

4- Ecologie du caroubier :

L'aire de répartition du caroubier s'étend dans les secteurs des plateaux et en moyennes montagnes jusqu'à 1700 m d'altitude, il tolère les sols pauvres, sableux, limoneux lourds, rocaillieux et calcaires, schisteux, gréseux et des pH de 6,2 jusqu'à 8,6 ; mais il craint les sols acides et très humides (Baum, 1989 ; Sbay et Abrouch, 2006 ; Zouhair, 1996). Il s'adapte à plusieurs types de sols à l'exception des sols hydromorphes et salés et les croûtes schisteuses (Nabli, 1989).

La sécheresse cyclique a révélé que le caroubier résiste mieux au manque d'eau que le chêne vert, le thuya et l'oléastre qui lui sont associés. C'est une essence très plastique, héliophile, thermophile, très résistante à la sécheresse (200 mm/an). Il joue un rôle important dans la protection des sols contre la dégradation et l'érosion et dans la lutte contre la désertification (**Zouhair, 1996**).

Le caroubier se comporte comme une véritable espèce résistante à la sécheresse en s'adaptant morphologiquement et physiologiquement au manque d'eau. Les principales adaptations peuvent se résumer comme suit :

- Les stomates sont situés sur une seule face, le nombre de ces derniers est assez élevé et ils sont de petite taille,
- le système racinaire est développé,
- un dépôt de cire important,
- l'évaluation des réservoirs hydriques du bois,
- les mouvements d'osmorégulation se sont avérés absents au niveau foliaire, et il est souhaitable de vérifier ce résultat au niveau racinaire,
- l'assimilation et les échanges gazeux dépendent de l'état hydrique général (**Rejeb, 1995**).

De part, ses aptitudes d'adaptation aux stress du sol et du climat, le caroubier pourrait contribuer au développement des zones défavorisées (**Gharnit et al, 2006**).

5. Répartition géographique :

Le caroubier est un arbre essentiellement méditerranéen d'importance écologique, industrielle et ornementale indiscutable (**Hariri et al, 2009**). On le rencontre à l'état naturel principalement en Espagne, Portugal, Maroc, Grèce, Italie, Turquie, Algérie, Tunisie, Égypte, et Chypre. Il a été introduit aussi en Australie, en Afrique du Sud, aux États-Unis et en Amérique du Sud (**Figure 9**), (**Sbay et Abourouh, 2006**).

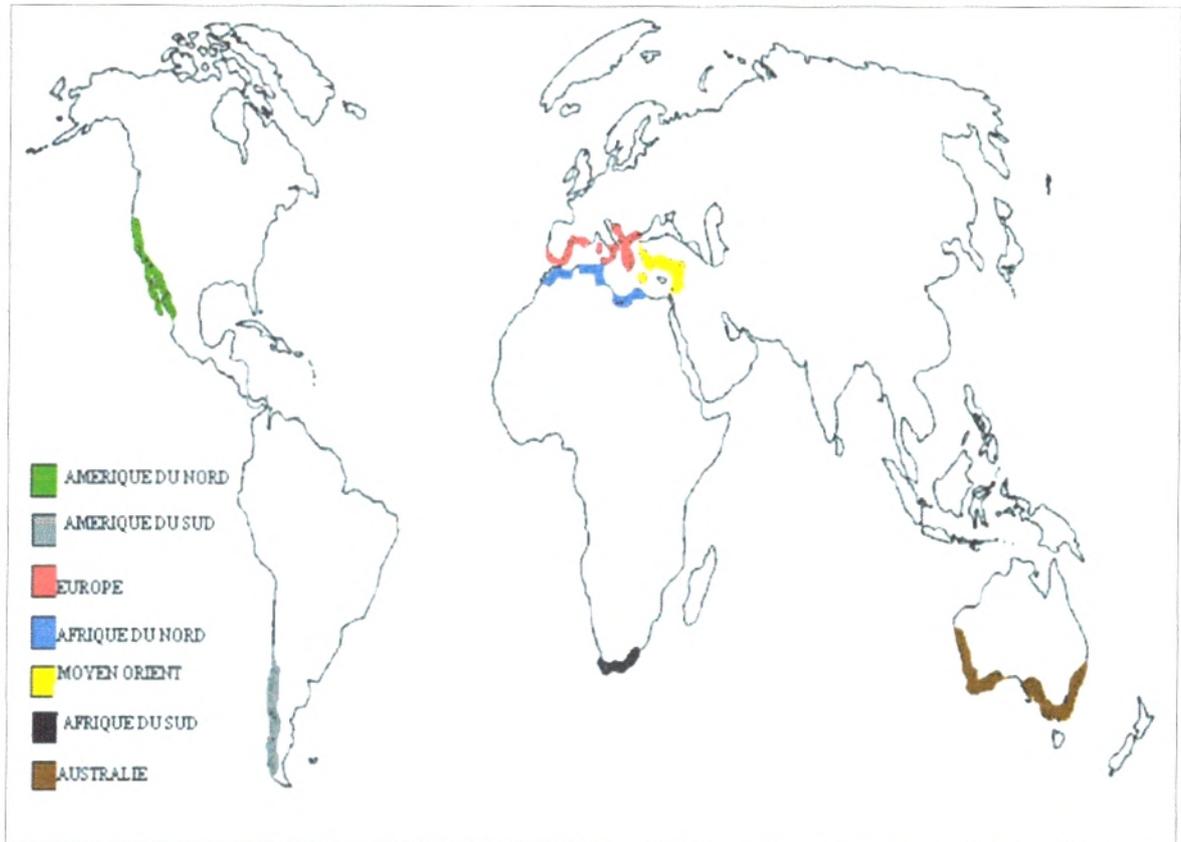


Figure 9: Centres d'origine et distribution du caroubier dans le monde (Batlle et Tous, 1997).

Au Maroc, le caroubier est localisé dans les plaines et les moyennes montagnes du Rif, du Moyen Atlas, du Haut Atlas et de l'Anti-Atlas et dans des bioclimats de type humide, subhumide, semi-aride et aride côtier à variantes chaude et tempérée. Il est souvent en association avec l'olivier, le lentisque, le thuya ou l'arganier. La principale population spontanée de caroubier est localisée dans les régions situées entre 600 et 1000 m d'altitude, en association avec d'autres espèces forestières et abritées des vents et du froid (Ait Chitt *et al*, 2007).

En Tunisie, le Caroubier croît dans les conditions naturelles à l'état sauvage, en association avec l'olivier et le lentisque. Il est bien défini dans les étages humide, subhumide, et semi-aride supérieur, à variante chaude à tempérée. Dans les conditions naturelles, on le rencontre à l'état sauvage en association avec l'olivier et le lentisque, et en mélange avec le callitris (Rejeb, 1995).

En Algérie, le caroubier est fréquemment cultivé dans l'Atlas Saharien et il est commun dans le tell (Quezel et Santa, 1962). On le trouve à l'état naturel en association avec l'amandier, *Olea Europea* et *Pistacia Atlantica* dans les étages semi-aride chaud, subhumide et humide, avec une altitude allant de 100m à 1300m dans les vallons frais qui le protègent de la gelée ; avec une température de 5°C jusqu'à 20°C et une pluviométrie de 80 mm à 600mm/an (Rebour, 1968). Suivant ces critères climatiques ; on a établi l'aire de répartition du caroubier en Algérie (figure 10) et à Tlemcen dans les régions suivantes : Sidi M'djahed, Sebra, Hennaya, Tlemcen, Aïn Tellout, Sidi Abdli, Remchi, Ben Sekran, Aïn Youcef et de Beni Saf jusqu'à Marsat Ben M'hidi. (Gaouar, 2011).

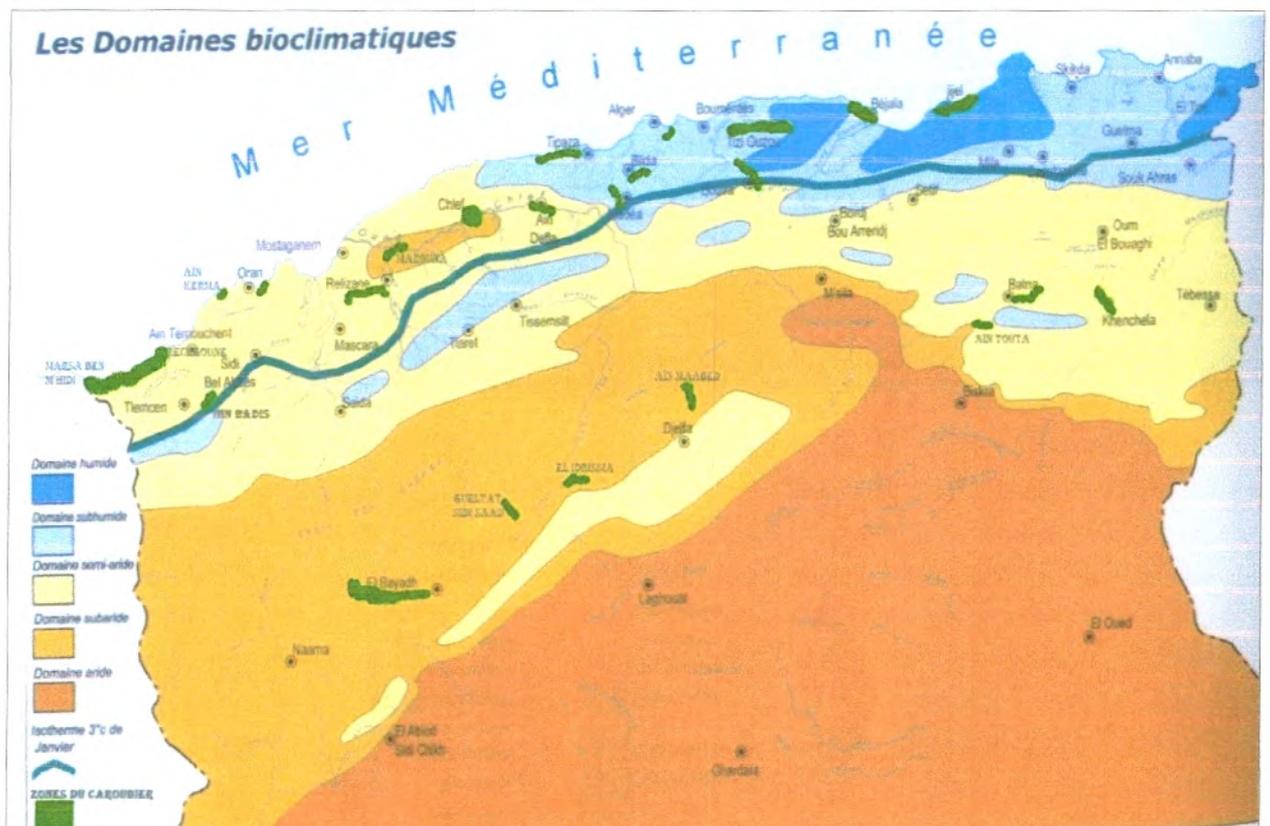


Figure 10 : Distribution du caroubier en Algérie suivant les domaines bioclimatiques (A.N.R.H, 2004).

6-Production et récolte :

La production du caroubier est bisannuelle, mais dans les plantations bien conduites, on peut avoir une régularité dans la production et un rendement annuel satisfaisant. Pour des densités de 45 à 100 arbres par hectare, les productions moyennes sont de l'ordre de 2 à 3,5 tonnes par hectare. Des exemplaires adultes isolés peuvent produire plusieurs centaines de

kilogrammes de fruits; une production de 300 Kg n'étant pas rare. On cite des arbres exceptionnels ayant produit une tonne de caroube. Un verger de 50 arbres par hectare, produisant en moyenne à l'âge adulte 70 Kg/plant, fournit 3,5 tonnes par hectare. Avec une production unitaire de 100 Kg, on pourrait espérer une production de 5 tonnes pour un verger bien entretenu (Rejeb, 1995).

6-a-Production mondiale:

Selon les données du FAOSTAT (2010), l'aire totale de la production mondiale du caroubier est estimée à 102939 hectare (Tableau 2). La plus grande superficie, 83574 hectare, est celle de l'Europe, contre une superficie estimée à 1000 hectare pour l'Algérie et 13460 hectare pour les pays d'Afrique du Nord. La production mondiale de caroube est estimée à 191355.64 tonnes. Elle est essentiellement concentrée en Espagne, Italie, Maroc, Portugal, Grèce, Turquie, suivie de Chypre, Algérie, Liban, et en dernier la Tunisie (Tableau 3).

Tableau 2 : Superficie occupée par le caroubier (FAOSTAT, 2010).

Pays	Superficie (ha) en 2004 Superficie (ha) en 2008
Algérie	1066 1000
Afrique du Nord	13526 13460
Europe	92218 83574
Monde	112711 102939

Tableau 3 : Production mondiale de caroube (FAOSTAT, 2010).

Pays	Production en tonnes (2004)	Production en tonnes(2008)	Pays	Production en tonnes (2004)	Production en tonnes(2008)
Espagne	67000	72000	Chypre	7000	3915
Italie	24000	31224	Algérie	4600	3600
Maroc	40000	25000	Liban	3200	2800
Portugal	20000	23000	Tunisie	1000	1000
Grèce	19000	15000			
Turquie	14000	12100			

6-b-Production en Algérie:

En Algérie, selon les données du ministère de l'Agriculture et du développement Rural en 2006, la superficie consacrée au caroube de plus d'un millier d'hectares aurait permis de produire 37100 quintaux (**Lettre Algex, 2008**). Durant le siècle dernier, la production mondiale de caroube a connu une chute dramatique, elle est passée de 650.000 T en 1945 (**Orphanos et Papaconstantinou 1969**) à 310.000 T en 1997. La grande perte a été enregistrée en Espagne où la production a chuté de 400.000 T en 1930 à 150.000 T en 1990 (**MAPA, 1994**).

Selon **Batlle (1997)**, la régression accusée dans la production du caroubier a été principalement liée à la baisse des prix et aux programmes du développement des zones côtières au dépend des plantations de caroubier.

On remarque qu'en Algérie la production de caroube ainsi que la surface cultivée ont baissé par rapport aux données enregistrées en 2004, car il n'est plus utilisé comme plante fourragère pour l'aliment de bétails au profit de l'orge et c'est dû à son coût élevé et son rendement lent (10 à 15 ans après sa plantation).

6-c-Récolte :

Au mois de septembre, on effectue le gaulage des arbres de façon à provoquer la chute des fruits qui ne se sont pas encore détachés par abscission naturelle; les caroubes sont ensuite ramassées (**Rejeb, 1995**).

7-Composition chimique de la caroube :

La pulpe et les graines sont les deux principaux constituants de la gousse du caroubier et représentent respectivement 90% et 10% de son poids total. Selon plusieurs auteurs, la composition chimique de la pulpe dépend en général, du cultivar, de l'origine et parfois de la période de récolte (**Orphanos et Papaconstantinou, 1969; Vardar et al, 1972; Calixto et Cañellas, 1982; Albanell et al, 1991**).

7-a- La pulpe de gousse de caroube :

Elle contient une forte proportion de sucre (glucose, saccharose, fructose), se situant entre 35% à 50%, selon la région géographique de récolte (**Ait Chitt et al,2007**), mais pauvre en protéines et en lipides dont les acides saturés et insaturés qui sont en proportion égales (**Leroy, 1929 ;Puhan et Wieling, 1996**). En plus, la pulpe renferme une teneur très élevée en fibre et une quantité non négligeable de tanins condensés (20%) et de mucilage (2-3%) et des sels minéraux, et des vitamines A,B ,B2 ,B3 ,et D (**Saura-Calixto, 1987 ; Puhan et Wieling, 1996 ; Ghrabi, 1996 ; Makris et Kefalas, 2004**). Par ailleurs, l'analyse minéralogique faite, par **Puhan (1996)**, sur la pulpe, a révélé une composition (en mg/100g de pulpe) de: K= 1100, Ca= 307, Mg= 42, Na= 13, Cu= 0.23, Fe= 104, Mn= 0.4, Zn= 0.59.

7-b -La farine de graine de caroube :

La graine renferme un galactomanane ou gomme un épaississant **E 410 (Ait Chitt et al, 2007)**.

7-c-La protéine de germe de caroube :

Lors de la préparation de la gomme de caroube, à partir de la graine, génère un sous-produit très riche en protéines: le germe. Celui-ci, selon les régions, peut présenter de 35% à plus de 50% de taux de protéines (Ait Chitt ; *et al*, 2007).

8-Les polyphénols de la caroube :

Les polyphénols se trouvent dans les gousses de caroube sous forme de granules brun clair. Ces granules se trouvent dans la fraction fibreuse de la pulpe de caroube et peuvent être extrait par les solvants polaires, à haute température. La section d'une gousse de caroube examinée au microscope électronique montre la présence de larges cellules parenchymateuses remplies de granules de tannin ressemblant à des pièces d'ambre en microscope optique (gousses de caroube). Les polyphénols de caroube ont une masse moléculaire très élevée rarement rencontrée chez les autres plantes (Wursch *et al*, 1984). Les principaux polyphénols décrits dans les gousses de caroube sont insolubles, appartenant aux tannins condensés contenant un noyau flavone (Kumazawa *et al*, 2002).

9-Les utilisations du caroubier :

9-1-Arbre :

Le caroubier est cultivé en arbre isolé comme arbre ornemental, pour son ombrage, en alignement, comme arbre d'allée (Menzel Bourguiba, Californie) et en verger comme plantation homogène de production (Espagne, Portugal, Crète). Le bois jeune est blanc jaunâtre et rouge foncé est utilisé en ébénisterie et surtout comme bois de chauffe. (Rejeb, 1995). Il est utilisé pour le reboisement et la refroidissement des zones affectées par l'érosion et la désertification (Boudy, 1950 ; Rejeb *et al*, 1991 ; Biner *et al*, 2001). Le caroubier est beaucoup utilisé en alimentation humaine et animale (Rejeb, 1995).

9-2-Les feuilles :

Sont utilisées pour le fourrage (Rejeb, 1995).

9-3-Fruit :

La gousse de caroube, fruit du caroubier, se compose d'une cosse appelée " pulpe de caroube" enveloppant une graine, Ces deux composants présentent des sous-produits abondamment utilisés en alimentation humaine comme en alimentation animale: la farine de pulpe de caroube, la farine de graine de caroube et la protéine de germe de caroube. (**Ait Chitt et al, 2007**).

9-3-a) La farine de pulpe de caroube :

La pulpe de caroube est utilisée, après un process de torréfaction qui en change l'aspect, la couleur ainsi que son goût, comme un substitut au cacao. La pulpe contient par contre une quantité élevée de polyphénols, pour lesquels est très prisé le chocolat. La pulpe est particulièrement recherchée dans les domaines des 'chocolats' à faible teneur en sucres biologiques, et à grande valeur ajoutée. (**Ait Chitt et al, 2007**).

9-3-b) La farine de graines de caroube :

La graine contient des gommés qui ont de nombreuses utilisations (**Rejeb, 1995**).La gomme de caroube provenant de la mince enveloppe brune qui recouvre les graines(**Johnson et al, 1988 ;Neukom, 1988 ;Tous et Batlle, 1990**).Selon **Coit (1967)**, les gommés du caroube sont utilisées en imprimerie, photographie , matière plastique, encre, cirage, cosmétique et surtout en industrie alimentaire(sauce , mayonnaise, glace...). Selon **Tichor (1958)**, le taux de gomme par graine varie selon les pays et les provenances, il est de 30 % à Chypre et de 50 % en Grèce.En Tunisie, Égypte et certains autres pays méditerranéens, on extrait des fruits de caroubier un sirop et on fabrique des boissons désaltérantes très appréciées (**Rejeb, 1995**).

9-3-c) La protéine de germe de caroube :

Elle est très utilisée dans le domaine de l'alimentation de bétail au niveau mondial,Un usage dans l'alimentation humaine est déjà en cours et présente de nouveaux développements, tout particulièrement pour son absence en gluten (**Ait Chitt et al, 2007**).

9-4-Ecorce :

L'écorce du caroubier a été toujours utilisée en tannerie, particulièrement dans l'achèvement l'émaillage des peaux (Batlle, 1997).

10- Utilisations en médecine traditionnelle :

10)-a-Action phytothérapeutique :

- ✚ Utilisé comme agent épaississant non-digestible, la gomme de caroube des graines est très utilisée contre les vomissements du nourrisson.
- ✚ Dans les régimes, il est proposé comme additif pour les régimes amaigrissants. La pulpe agit contre la gastro-entérite infantile (Ghrabi, 1996).

10)-b- La médecine traditionnelle :

- ✚ Les extraits des feuilles contiennent des tanins utilisés dans la médecine traditionnelle pour traiter la diarrhée et dans l'alimentation diététique (Baytop, 1984).
- ✚ Pulpe du fruit trituré dans de l'eau donne un jus rafraîchissant qui est diurétique, laxative. Il est très bon pour la diarrhée.
- ✚ L'eau de la caroube est bien connue pour le traitement des problèmes du foie.
- ✚ Les caroubes avec le fenugrec, *Trigonella foenum-graecum L.*, les raisins secs, le cumin, *Cuminum cyminum L.* et de figes sèches faire : une tisane prise lors de l'accouchement quand il est difficile d'arrêter l'hémorragie.
- ✚ Dans le sud de la Tunisie, un mélange de caroube et les figes sont cuites pour donner une compote brune qui est donnée aux femmes quand ils se lèvent après l'accouchement (Ghrabi, 1996).
- ✚ En Turquie, l'écorce a été également utilisée par la médecine 'traditionnelle' comme remède anti-diarrhée (Baytop, 1984 ; konaté, 2007).
- ✚ Contre les diarrhées infantiles, Antitussif et antidiabétiques.
- ✚ Utilisé dans les régimes pour obèses, empêchant la sensation de faim.

Chapitre 2 : Métabolites secondaires et activité antioxydante.

1-Introduction :

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. Parmi ces composées on distingue deux groupes de métabolites : les métabolites primaires et les métabolites secondaires (**Hartmann, 2007 ; François, 2010**).

2- Les métabolites primaires :

Les métabolites primaires : sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes, les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

3- Les métabolites secondaires :

Les métabolites secondaires : sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante. Ils sont synthétisés par la plante en réaction à des stimuli extérieurs et ont souvent une fonction régulatrice dans le cadre d'une série de réactions physiologiques et métaboliques en cascade à la suite d'un stress environnemental ou d'une attaque par des ravageurs.

Les produits du métabolisme secondaire qui sont émis en très faible quantité, sont d'une grande variété structurale (plus de 200000 structures définies). Ces composés marquent de manière originale, un genre, une famille ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique (**Brandt et coll, 2001 ; Charles, 2005**).

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches, ils ont un intérêt multiple, ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires (**Epifano et al, 2007 ; François, 2010**). On trouve les métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre. Parmi les principales familles de métabolites secondaires trouvées chez les plantes on distingue :

- **Les composés phénoliques** qui interviennent dans les interactions plante-plante (allélopathie, inhibition de la germination et de la croissance). Parmi ces composés, on citera les **polyphénols**, les **lignines**, les **stilbènes**, les **flavonoïdes**, les **phénylpropanoïdes**, les **anthocyanes** et les **tannins**.

- **Les alcaloïdes**, renferme un atome d'azote dans la structure. Parmi ces derniers, certains relarguent de l'acide cyanhydrique quand les plantes sont abîmées. Ils sont synthétisés à partir d'acides aminés. On citera la nicotine, l'atropine, la codéine, la lupinine .

-**Les mucilages** : se sont des polymères complexes de fructose, d'acide d'acide glucorinique et d'acide manuronique. Les mucilages sont des mélanges colloïdaux qui gonflent avec l'eau (agar agar).

-**Les gommes et les résines** : se sont des substances produites par la plante à la suite d'une blessure.

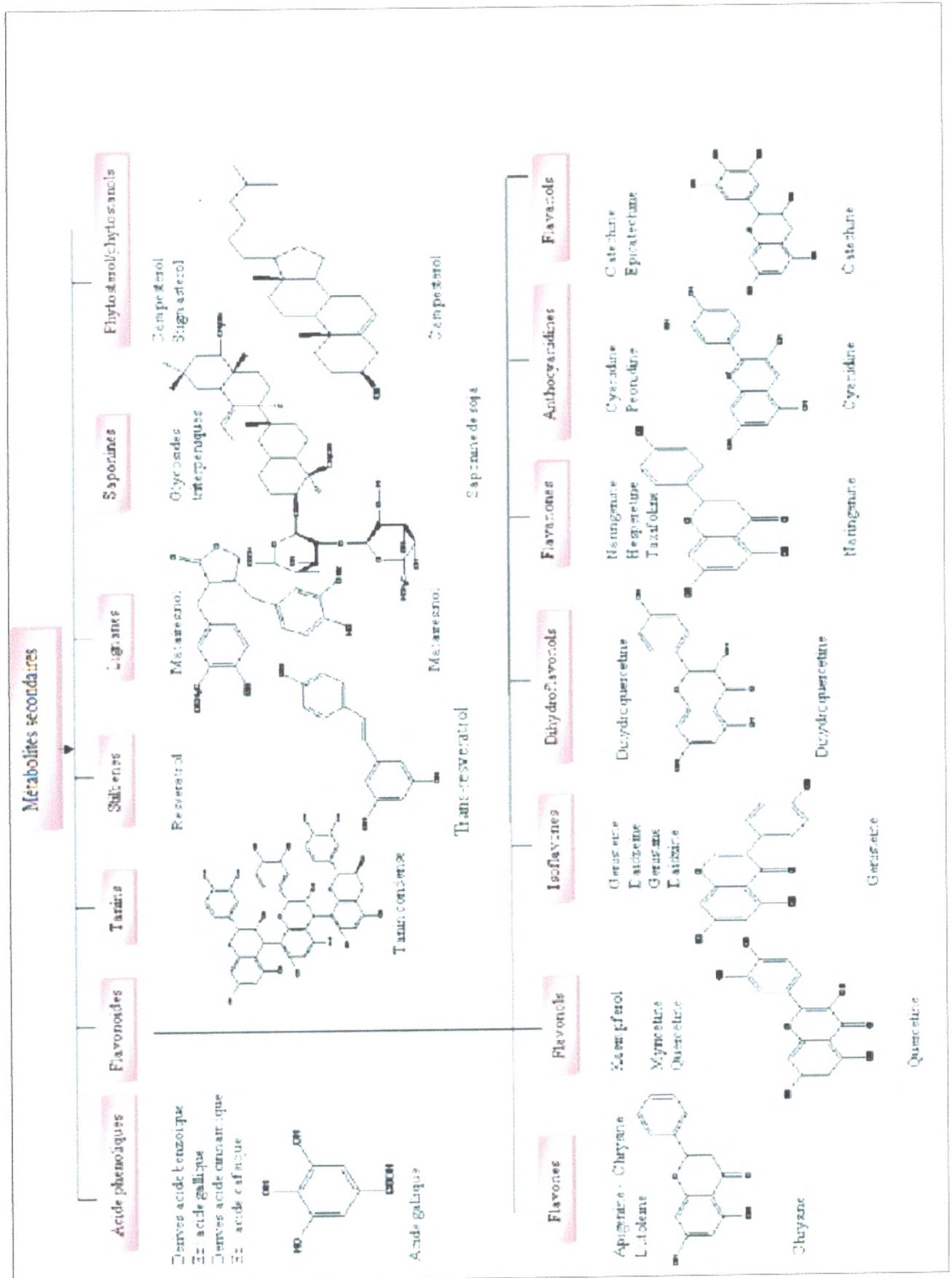
- **Les huiles essentielles**: Ces sont des liquides concentrés et hydrophobes des composés aromatiques (odoriférants) volatils d'une plante, ces essences sont très volatiles et non miscibles à l'eau.

- **Les latex**: Ces sont des substances sécrétées ou fabriquées par des cellules laticifères (vraies ou anastomosées) et qui ont la particularité de se solidifier au contact de l'air (**François, 2010**).

3. Classification des métabolites secondaires :

La figure (13) en- dessous montre la classification des métabolites secondaires :

Figure 13: Classification des quelques métabolites secondaires (François, 2010).



3-a-Composés phénoliques :

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement en jouant soit le rôle des signaux de reconnaissance entre les plantes (Allélopathie), entre les plantes et les symbioses, ou bien lui permettant de résister aux diverses agressions vis-à-vis des organismes pathogènes. Ils participent de manière très efficace à la tolérance des végétaux à des stress variés, donc ces composés jouent un rôle essentiel dans l'équilibre et l'adaptation de la plante au sein de son milieu naturel (**Macheix et al, 2005**).

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales, alliées à leur difficulté de production. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (**Macheix et al, 2005**).

La désignation générale «*composés phénoliques*» concerne à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques (**Fleuriet et al, 2005 ; François, 2010**).

Les *polyphénols* sont des molécules aromatiques synthétisées par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales ;c'est pourquoi 80% des composés phénoliques sont essentiellement localisés dans les tissus épidermiques de la plante. Ce sont des phytoconstituants, généralement des pigments, responsables des tintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge...) (**UNUP, 1986**). Ces composés jouent aussi un rôle important dans la qualité alimentaire des fruits et déterminent aussi leurs saveurs (les *tannins* sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs) les *flavones* sont responsables de l'amertume des *Citrus* et peuvent donner naissance, par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée (**Dryune et al, 1999**).

Les *polyphénols* sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles des végétaux. Les principales sources du point de vue alimentaire sont les légumes à feuilles ,

les fruits et les boissons. (Resemy, 1998).

La figure 14 en-dessous nous montre quelques composés constituant cette famille.

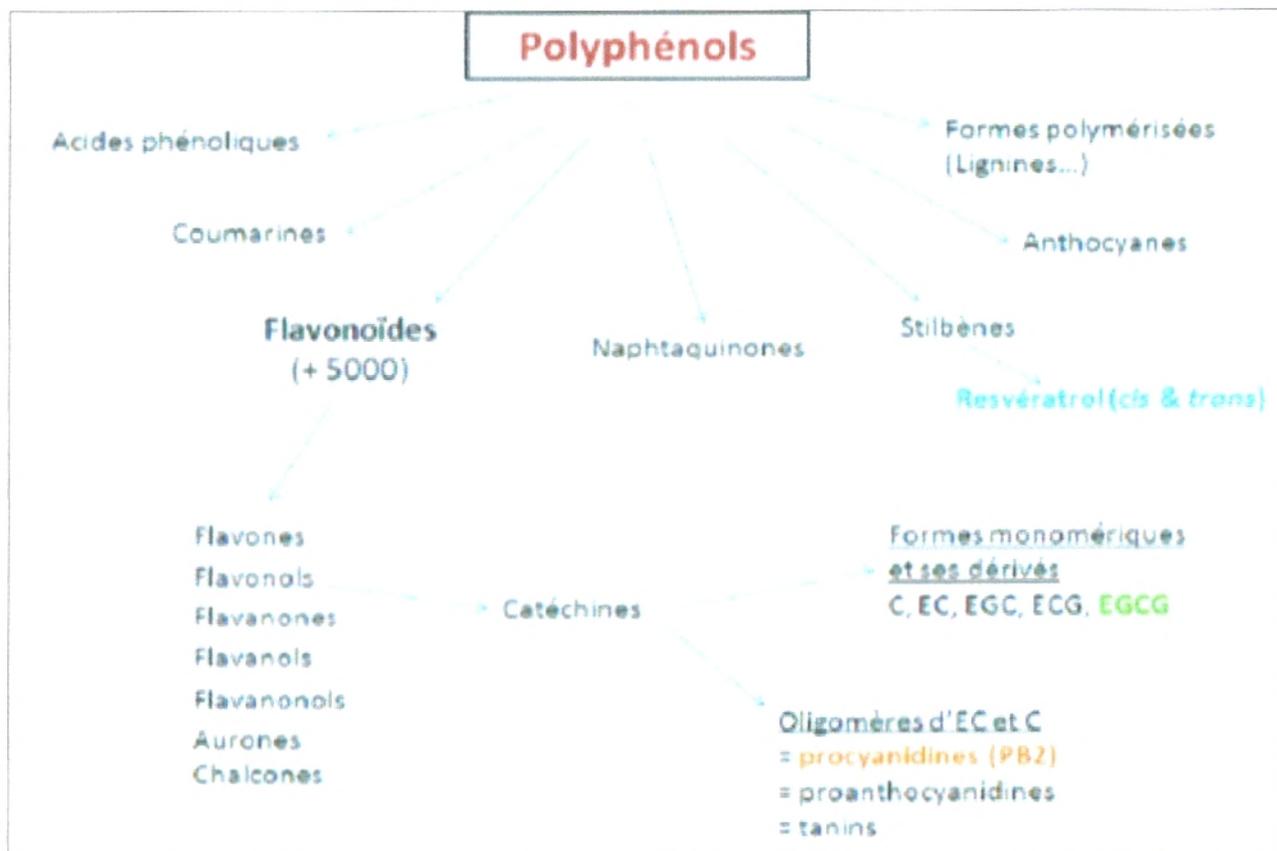


Figure 14: les différents polyphénols (Escarpa and Gonzalez, 2001).

(C=catéchine : EC = épicatechine : EGC= épicatechine gallate : EGCG= épigallocatechine gallate).

Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en *flavonoïdes* et *non flavonoïdes*).

3-A-1. Les flavonoïdes :

*Généralités:

Le nom flavonoïde proviendrait du terme flavedo, désignant la couche externe des écorces d'orange (Piquemal, 2008), cependant d'autres auteurs supposaient que le terme flavonoïde a été plutôt prêté du flavus ; (flavus=jaune) (Karaali et al, 2004 ; Malešev et Kuntić, 2007).

Les flavonoïdes ont été isolés par le scientifique **E.Chervreul en 1814**, mais ont été réellement découverts qu'en **1930** par **Albert Szent-Györgyui**, désignés sous le nom de vitamine P, en raison de leur efficacité à normaliser la perméabilité des vaisseaux sanguins, cette dénomination fut abandonnée lorsqu'on se rendit compte que ces substances ne correspondaient pas à la définition officielle des vitamines, il devient clair que ces substances appartiennent aux flavonoïdes (**Nijveldt et al, 2001**).

**Structure :*

Les flavonoïdes ont tous la même structure chimique de base, ils possèdent un squelette carboné de quinze atomes de carbones constitué de deux cycles aromatiques (A) et (B) qui sont reliés entre eux par une chaîne en C3 en formant ainsi l'hétérocycle (C) (**W- Erdman et al, 2007**). Généralement, la structure des flavonoïdes est représentée selon le système C6-C3-C6 (**Emerenciano et al, 2007**) en formant une structure de type diphenyle propane dont des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (**Narayana, 2001; Malešev et Kuntić, 2007**).

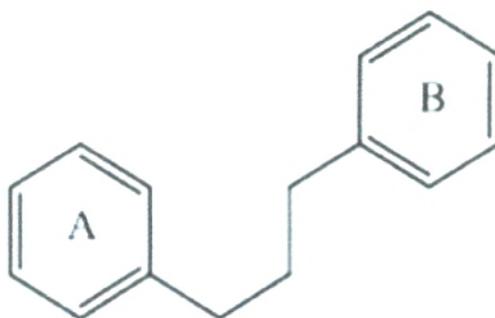
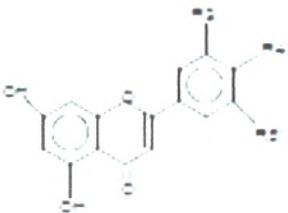
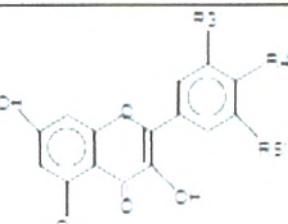
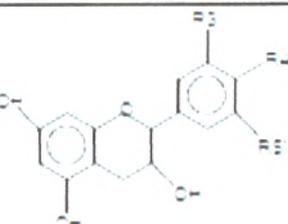
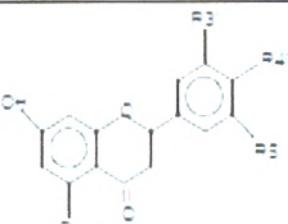
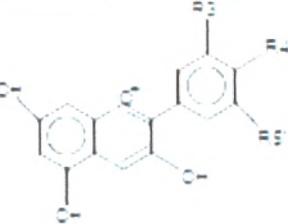
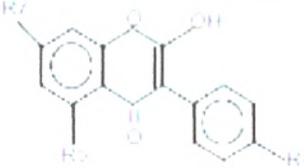


Figure 15 : Structure générale des flavonoïdes (François, 2010).

*Classification :

Tableau 4 : Principales classes des flavonoïdes (Narayana et al, 2001; W- Erdman et al, 2007).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH3	H	Diosmétine
Flavonols		H	OH	H	Kaempférol
		OH	OH	H	Quercétine
		OH	OH	OH	Myricétine
Flavanols		OH	OH	H	Catéchine
Flavanones		H	OH	H	Naringénine
		OH	OH	H	Ernodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphénidine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daïdezine

*Localisation:

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement, ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (**Hutzler et al, 1998**).

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (**Piquemal, 2008**), la répartition de ces composés montre des accumulations très localisées, généralement en relation avec une fonction physiologique ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires, tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense ont plutôt une localisation sous épidermique (**Boudet, 2000**).

* Distribution :

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fruits, graines, bois, pollens (**Verhoeven et al, 2002**), ils peuvent aussi être rencontrés dans certains boissons et chez certains fourrages (ex: trèfle) (**Urquiaga et Leighton, 2000**). Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement chez certains végétaux, on trouvera par exemple, les flavanones dans les agrumes, les isoflavones dans le soja, les anthocyanes et les flavonols ont eux une large distribution dans les fruits et les légumes tandis que les chalcones se retrouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs, sont considérés comme des pigments naturels au même titre que les chlorophylles et les caroténoïdes (**Lahouel, 2005 ; Piquemal, 2008**).

3-A-2. Les tanins :

Le terme tanin dérive de la capacité de tannage de la peau animale en la transformant en cuir. Les tanins sont un groupe des polyphénols à haut poids moléculaire. Ce sont des molécules fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives, réduisant ainsi la digestibilité des aliments. Ils

peuvent être liés à la cellulose et aux nombreux éléments minéraux (Alkurd et al ,2008) On distingue: les *tanins hydrolysables* et *condensés*.

3-A-3.Les non flavonoïdes :

Ce groupe comprend plusieurs composés parmi lesquels on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et le les xanthones ;

➤ Les acides phénoliques :

On distingue deux principales classes d'acide phénolique; les dérivés de l'acide benzoïque (Schéma 4) et les dérivés de l'acide cinnamique (Schéma 5).

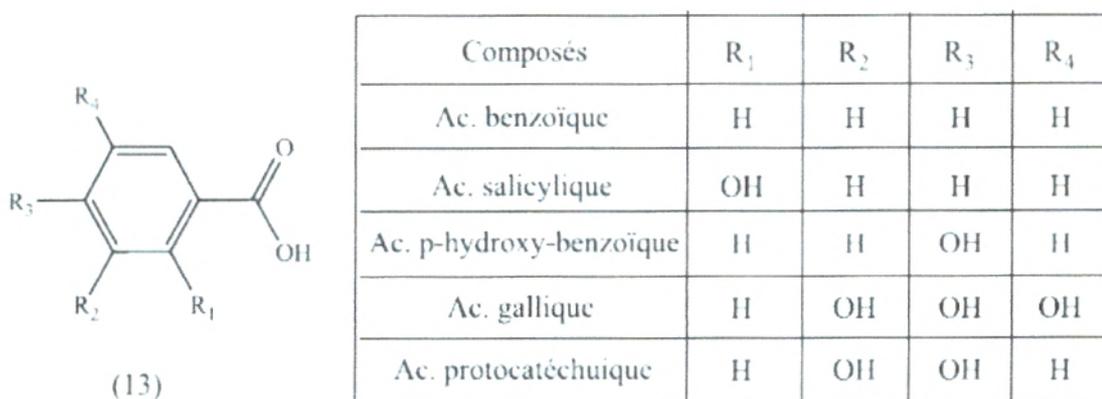


Figure 16 : Dérivés de l'acide benzoïque- formule générale (François, 2010).

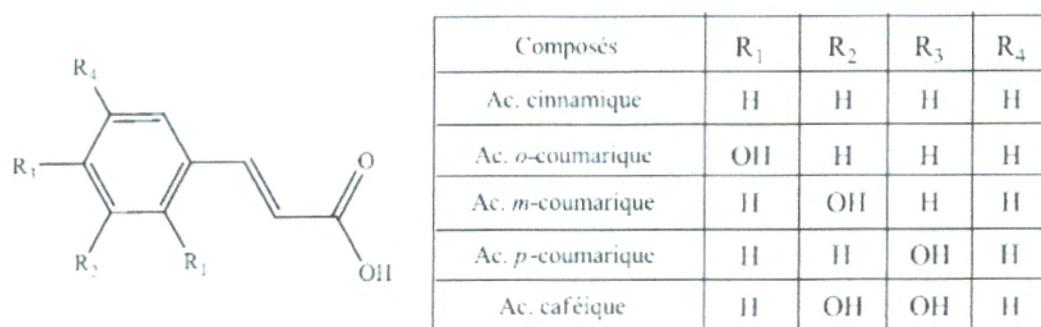


Figure 17 : Dérivés de l'acide cinnamique formule générale (François, 2010).

4-L'activité antioxydante des polyphénols :

L'activité antioxydante des polyphénols est due au caractère acide de la fonction phénol (donneur d'hydrogène) et à sa possibilité d'établir des liaisons hydrogènes. Cela lui confère la capacité de complexer les métaux, de se combiner à des molécules nucléophiles et de faire des réactions d'oxydoréduction (**Rice-Evans, 1995**). Leur possibilité de piéger les radicaux libres est due à leur fonction hydrogène.

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation.

5. Rôle et intérêt des composés phénoliques :

5-a- Chez les végétaux :

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes, résistance aux UV); soit directement dans la nature soit lors de la conservation après récolte de certains végétaux; dans les critères de qualité (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...) qui orientent les choix de l'homme dans sa consommation des organes végétaux (fruits, légumes, tubercules...) et des produits qui en dérivent par la transformation; dans les variations de certaines caractéristiques des végétaux lors des traitements technologiques (préparation des jus de fruits, des boissons fermentées...) pendant lesquels apparaissent fréquemment des brunissements enzymatiques qui modifient la qualité du produit fini (**Fleuriet et al, 2005 ; François, 2010**).

5-b- Chez les humains :

Le rôle des composés phénoliques est largement montré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes (**Fleuriet et al, 2005 ; François, 2010**). Spécifiquement, on attribue aux flavonoïdes des propriétés variées: veinotonique, antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, estrogénique et/

ou anti-estrogénique. Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires. Les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome. Ils sont aussi anxiolytiques et protèges nos artères contre l'athérosclérose et réduit la thrombose (caillots dans les artères).

(François, 2010).

5-c- Rôle antioxydant des polyphénols :

5-c- 1-Les radicaux libres:

Notre organisme produit en permanence des radicaux libres en réponse à des agressions environnementales (cigarettes, polluants, infections.....). Les radicaux libres sont des espèces chimiques très instables qui jouent un rôle dans l'action de certains traitements anticancéreux, de même qu'à l'origine du vieillissement. Leur structure comprend un électron célibataire qu'ils cherchent à appairer en attaquant et en endommageant les molécules voisines **(Robert, 2005)**. En réalité le radical libre vole un électron à une molécule stable qui à son tour deviendra un radical libre, induisant ainsi une création en chaîne. Cette chaîne de vols d'électrons est cumulative et explique plusieurs maladies **(Fortin, 2001-2003)**.

Dans les membranes cellulaires, ces composés néfastes provoquent des peroxydations lipidiques responsables de nombreux troubles liés ou non au cancer. Dans le noyau des cellules, ils coupent l'ADN, ce qui entraîne la mort cellulaire. C'est le plus souvent une molécule d'oxygène qui, directement ou par l'intermédiaire d'autres radicaux libres, donne les espèces radicalaires les plus réactives : le radical superoxyde et le radical hydroxyle. Le radical superoxyde peut être détoxiqué dans la cellule par une enzyme spécialisée, mais le radical hydroxyle ne l'est pas ; il est responsable des dommages moléculaires les plus importants. Les radicaux libres sont produits par des médicaments anticancéreux (comme la bléomycine ou la doxorubicine) ou par les rayonnements ionisants, ce qui détermine leur activité cytotoxique **(Robert 2005)**.

5-c- 2-Rôle antiradicalaire des polyphénols :

Les polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Ce principe a été utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments (**Masquelier, 2006**). Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux bon mauvais (qui peuvent être les deux), comme l'oxyde nitrique qui permet une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (**Florentin, 2004 ; Masquelier, 2006**). En raison de ces vertus, les composés phénoliques sont largement utilisés dans les domaines thérapeutiques et cosmétiques.

Chapitre 3: Matériels et méthodes.

1-Préparation du matériel biologique végétal :

Le matériel végétal constitué de gousses de caroubier mûres, a été collecté dans la région de Tlemcen qui appartient à l'étage bioclimatique semi aride dont la pluviométrie est 500 mm par an.

Au laboratoire, nous avons séparé la pulpe de la graine des gousses. Ensuite, les échantillons ont été broyés, séchés et conservés à l'abri de la lumière dans des flacons en verres pour des analyses ultérieures.

2- Détermination des métabolites secondaires :

2-a- Extractions sélectives : (Kumazawa et al, 2002) ;

La caroube étant riche en sucres simples, avant de procéder à l'extraction ; on laisse les gousses de caroube, écrasées et séchées préalablement, macérer pendant 12 heures dans de l'eau froide (3C°). Ce procédé, répété 2 fois, permet d'éliminer les oses présents ; c'est une méthode employée par **Kumazawa et al, (2002)** ; on procède par la suite aux extractions sélectives.

2-b-Extraction des phénols totaux : (Yu et Dahlgren, 2005) ;

- Une prise d'essai de 2g du matériel végétal dégraissé est macérée dans 100ml du mélange acétone/eau (70% v/v) pendant 24 heures, à température ambiante.
- Après filtration sous vide, le mélange acétone/eau, est évaporé à sec sous pression réduite à 45°C.
- Le résidu obtenu est récupéré avec 3ml de méthanol pur, pour les dosages ultérieurs.

3-c- Extraction des tanins : (Bruneton, 1999) ;

- 10g de matériel végétal broyé sont mis en présence de 180ml d'eau distillée et 100ml d'acétone ; l'ensemble est porté à une macération à froid (4°C) pendant 4 jours.
- Filtrer et extraire la solution deux fois avec 50ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides.
- Décanté et extraire la phase aqueuse une fois avec 50ml d'acétate d'éthyle (AE).

- Sécher la phase organique avec MgSO₄, ensuite évaporer le solvant à sec ; le résidu obtenu est pesé pour avoir le rendement.

$$R\% = \frac{[(\text{poids du ballon après évaporation} - \text{poids du ballon vide}) / \text{poids du matériel végétale}] \times 100.}{}$$

3-d- Extraction des flavonoïdes : (Merghem et al, 1995) ;

- 10g de matériel végétal sont placés dans 100ml de 80 ml méthanol /2ml eau, macération pendant 72 h,
- filtrer et évaporer le MeOH,
- Ajouter 100ml d'eau distillé bouillante,
- Décanté toute une nuit, récupérer la phase aqueuse,
- Ajouter l'acétate d'éthyle et évaporer.
- Ce dernier est évaporé à sec et pesé pour calculer le rendement des flavonoïdes.

3-Tests d'activité antioxydante :

3)-1- Test du radical DPPH :

- **Principe :**

Le **DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl)** est pratiquement, le radicale libre le plus stable. En solution (méthanol ou éthanol) le DPPH est caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515nm. En présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pale (forme d'hydrazine). Ce passage de la première forme à la deuxième, est accompagné d'une diminution de l'absorbance (**DO**) qui peut s'exprimer par le pourcentage de réduction du DPPH. Conventionnellement, une grande capacité de piégeage des radicaux libres est considérée comme une grande activité antioxydante (Lee et al, 2004).

- **Mode opératoire :**

L'activité antioxydante des polyphénols totaux a été mesuré en utilisant le radical libre stable le DPPH par la méthode de Sanchez Moreno et al, 2002.

- **Préparation des solutions de contrôle :**

- L'essai à blanc :**

Pour calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre) : 1,950ml de méthanol est additionnés à 50µl d'extrait phénolique à différentes concentrations et agiter le mélange.

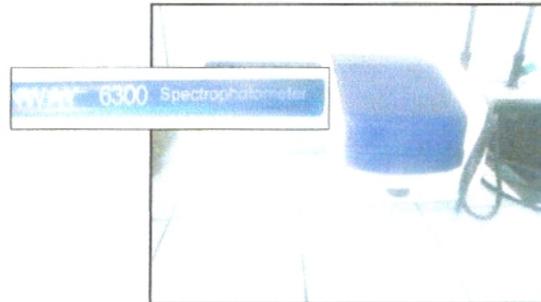


Figure 18: UV-VIS spectrophotomètre.

- La solution contrôle :**

Préparer 1,950ml de la solution méthanolique du DPPH (0,025g/l) dans un tube à essai et ajouter 50µl d'extrait polyphénolique à différentes concentrations ; ensuite laisser incuber à l'obscurité pendant 30 minutes ; puis lire l'absorbance du mélange à 515nm en utilisant un UV-VIS spectrophotomètre.

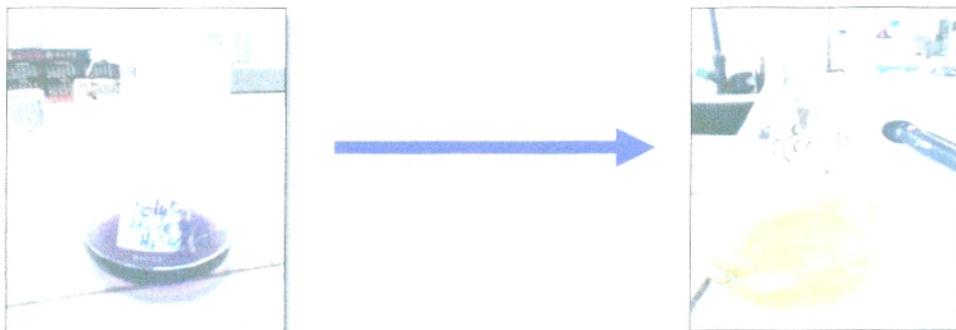


Figure 20 : Solution de DPPH après réaction avec l'extrait phénolique.

- **Expressions des résultats :**

Le pourcentage de réduction du DPPH par l'extrait phénolique est calculé selon la formule donnée par **Yen et Duh (1994)**.

$$\%R \text{ du DPPH} = (DO_{\text{contrôle}} - DO_{\text{échantillon}} / DO_{\text{contrôle}}) \times 100$$

%R du DPPH : Pourcentage de réduction ou d'inhibition du **DPPH**.

DO_{contrôle} : Densité optique du contrôle.

DO_{échantillon} : Densité optique de l'antioxydant.

A partir de la variation du pourcentage de réduction du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait phénolique, nous pourrions déterminer graphiquement l' IC_{50} qui est définie comme étant la concentration de l'antioxydant nécessaire pour réduire ou inhiber 50% du DPPH.

3)-2- Test de la réduction du fer,(Ferric reducing antioxydant power) : **FRAP:**

L'activité réductrice du fer de nos extraits est déterminée selon la méthode décrite par **Oyaizu (1986)**, basée sur la réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} .

- **Mode opératoire :**

- 1ml de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5ml d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} à 1%.
- L'ensemble est incubé au bain marie à 50C° pendant 20 minutes ensuite ;
- 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction ;
- les tubes sont centrifugés à 3000 **t/min** pendant 10 minutes ;

- **Partie expérimentale :**

- 2,5ml du surnageant sont mélangé à 2,5 ml d'une solution de chlorure ferrique fraîchement préparés à 0,1%.
- La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil UV-VIS spectrophotomètre.
- Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.
- Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés (Hubert, 2006).

3)-3- Test du blanchiment du β -carotène:

L'activité antioxydante des extraits du *Cératonia siliqua* est mesurée selon la méthode de Khartal et al (2007). Dans ce test la capacité antioxydante est déterminée en mesurant l'inhibition de la dégradation oxydative de β -carotène (décoloration) par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

- **Mode opératoire :**

- 2 mg de β -carotène dissout dans 200 ml de chloroforme, On prend 4ml de cette solution, On ajoute 40 mg d'acide linoléique et 400 mg de Tween 40.
- On évapore le chloroforme à 40C° puis on ajoute 100 ml de H₂O₂ ultra pure puis agité vigoureusement.
- BHT ou BHA diluer dans du MeOH. On prépare une gamme de concentration de l'extrait qu'on dilue dans du MeOH.
- 3 ml de la solution de H₂O₂ et ajouter à 0,2 ml des extraits puis on mesure la DO à 470 nm puis on met au bain marie à 50C° pendant 2 Heures puis on remesure l'absorbance.
- La solution de BHT est prise comme contrôle positif, le contrôlé négatif contient 3 ml de l'émulsion (solution H₂O₂ +0,2 ml de MeOH), (Koleva et al, 2002).

- **Préparation des contrôles positifs :**
 - On dilue le **BHT** de manière à avoir une gamme de concentration de 1 ;...; 0,1mg/ml puis on prend 0.2ml de chaque concentration + 3 ml de l'émulsion.
- **Lecture :**
 - -On étalonne avec de **MeOH** pure ;
 - -Lire le contrôle négatif : alterner extrait puis **BHT**(les concentrations correspondent).
- **Expressions des résultats :**

$$\% = (D_{0B} - Ech_{120}) / (\text{blanc}_{120} - Ech_{120})$$

4)- L' EC₅₀ :

L'activité antioxydante de nos extraits est exprimée en EC₅₀, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il est défini comme :

- La concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH ,
- la concentration nécessaire pour réduire 50 % de l'activité du fer.

Ces EC₅₀ sont déterminés graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. La valeur de chaque EC₅₀ exprime la concentration de l'extrait exigée pour réduire 50% de DPPH en solution.

Remarque :

Toutes les courbes sont réalisées par logiciel **Origin 8**.

Chapitre 4 : Résultats et discussion.

1. L'extraction des polyphénols :

L'extraction des composés phénoliques des 2 parties (pulpes et graines) de *Cératonia siliqua*, a été réalisée par macération des échantillons suivie par une évaporation à sec. Les rendements que nous avons obtenus sont représentés dans le **tableau 5** :

Tableau 5 : Les rendements des polyphénols totaux de *Cératonia siliqua*.

	Pulpes			Graines		
	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Tannins	Polyphénols totaux	Flavonoïdes	Tannins
Rendements %	20	0,4	0,4	7,4	0,2	1,6

Remarque : Dans toutes les figures qui suivent la nomination des extraits :

PTp : polyphénols totaux des pulpes, **Fp** : Flavonoïdes des pulpes, **Tp** : Tannins des pulpes,

PTg : polyphénols totaux des graines, **Fg** : Flavonoïdes des graines, **Tg** : Tannins des graines.

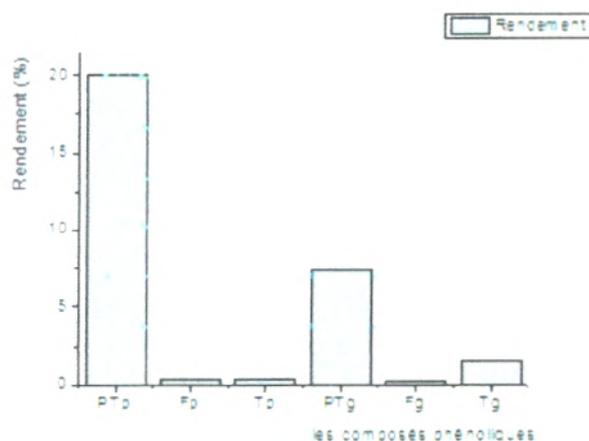


Figure 21 : Les rendements des composées phénoliques.

D'après ces résultats, On a enregistré un rendement très élevé en polyphénols totaux, par rapport aux Flavonoïdes et aux Tannins au niveau des pulpes. Les graines aussi contiennent une teneur importante en polyphénols totaux. En comparant les rendements des composées phénoliques de deux parties de la caroube, les polyphénols totaux des pulpes sont supérieurs à celle des graines, le rendement des Flavonoïdes des pulpes et des graines sont à peu près

égale. Concernant le rendement des tanins des graines est supérieur au rendement des tanins des pulpes. Les résultats obtenus concernant les rendements des composés phénoliques du *Cératonia siliqua* sont inférieurs à celle de Gaouar (2011).

2. La détermination de l'activité antioxydante :

L'activité antioxydante de nos extraits a été évaluée in vitro par trois tests chimiques différents : le test de piégeage du radical diphényl picryl hydrazyl (DPPH), la mesure du pouvoir réducteur (FRAP) et la technique de décoloration du β -carotène.

Les composés qui ont été testés par les 3 méthodes sont :

- Les polyphénols de la pulpe (**PTp**) et les polyphénols des graines(**PTg**) ;
- Les flavonoïdes de la pulpe (**Fp**) et les flavonoïdes des graines(**Fg**);
- Les tanins de la pulpe (**Tp**), et les tanins des graines(**Tg**);

2.1 .la détermination de l'activité antioxydante par la méthode DPPH :

Les valeurs obtenues du pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les composés phénoliques (polyphénol totaux , flavonoïde , tanins) des 2 parties (pulpes et graines) de *Cératonia siliqua* ont permis de tracer des courbes ayant une allure exponentielle avec présence d'une phase stationnaire qui signifie la réduction presque totale du DPPH en sa forme non radicalaire. Les courbes du pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les composés phénoliques de *Cératonia siliqua* sont représentées dans les figures 22 et 23.

❖ Pulpe :

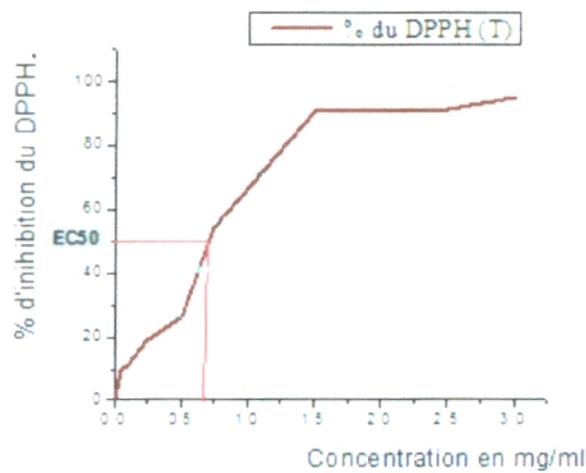
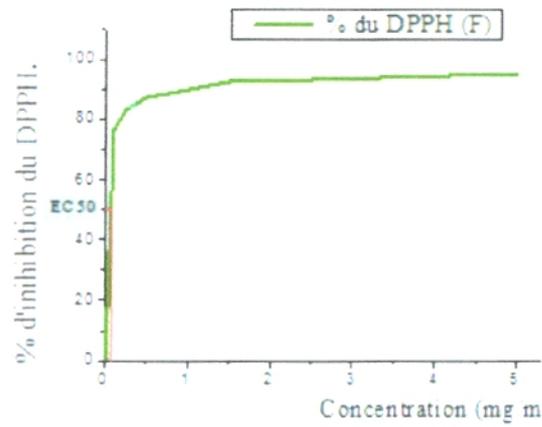
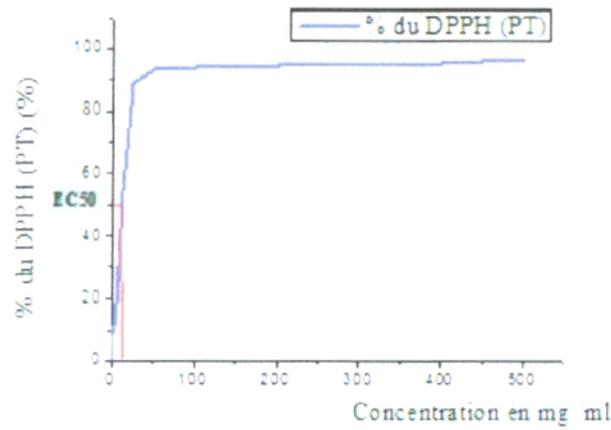


Figure 22 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits phénoliques de la pulpe de *Cératonia siliqua* L.

❖ Graine :

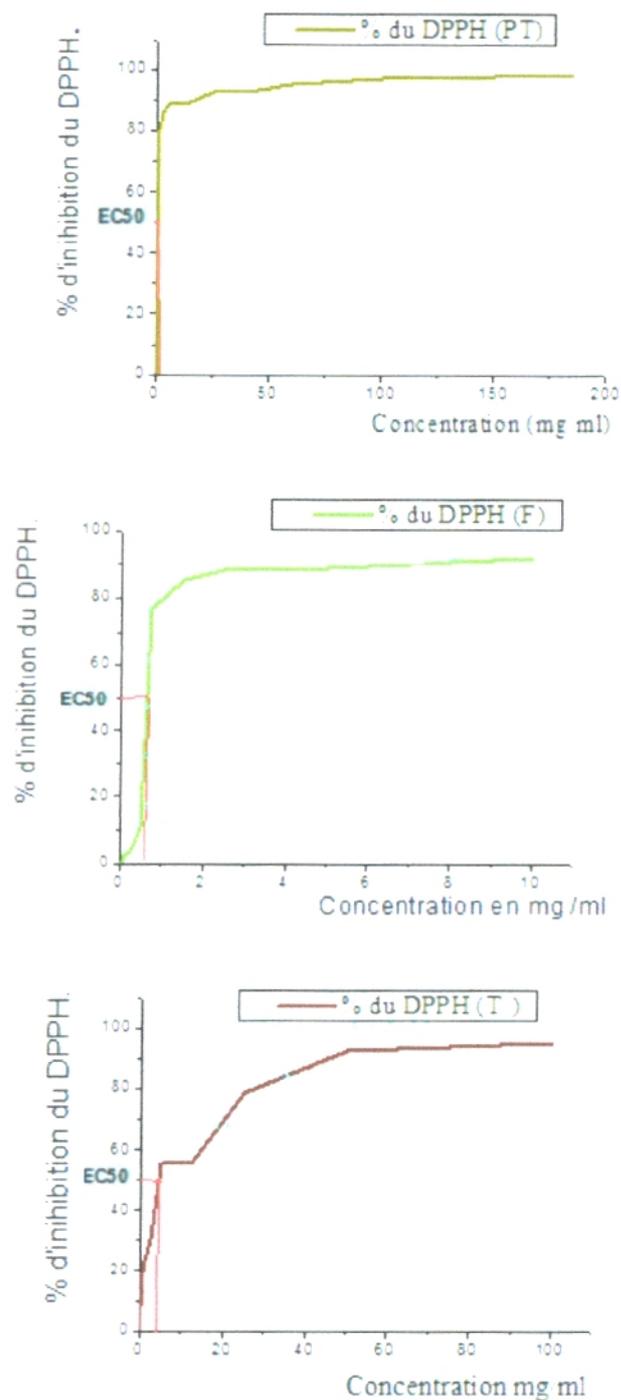


Figure 23 : Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations utilisées pour les extraits phénoliques de la graine de *Cératonia siliqua* L.

Les courbes montrent une augmentation du pourcentage de réduction du DPPH proportionnelle aux concentrations des extraits phénoliques. A partir de ces courbes nous

pouvons déterminer les pourcentages d'inhibition obtenus en fonction des concentrations utilisées, ainsi la valeur d'EC₅₀ de chaque extrait.

On constate que tous les extrait phénoliques possèdent une activité antiradicalaire considérable contre le radical DPPH, Ces résultats sont différents à ceux de l'Ouici (2012).

Tableau 6 : Les rendements de DPPH des composés phénoliques du *Cératonia siliqua*.

Composés phénoliques	Les rendements trouvés dans le présent travail.	Quantités trouvés par Ouici (2012)
PTP	96,8%	96,02%
PTG	98,66%	91,37%
FP	95,49	94,99
FG	91,79%	et 95,16%
TP	94,97%	98,97%
TG	95,36%	96,88%

Les valeurs des EC₅₀ trouvées pour tous les extraits testés sont représentées dans le tableau 7 et dans la figure 24.

Tableau 7: Valeurs d'EC50 trouvées pour les extraits des deux parties de la plante :

	Pulpes			Graines		
	PT	F	T	P T	F	T
EC ₅₀ mg/ml	9,77	0,07	0,71	0,56	0,64	4,41

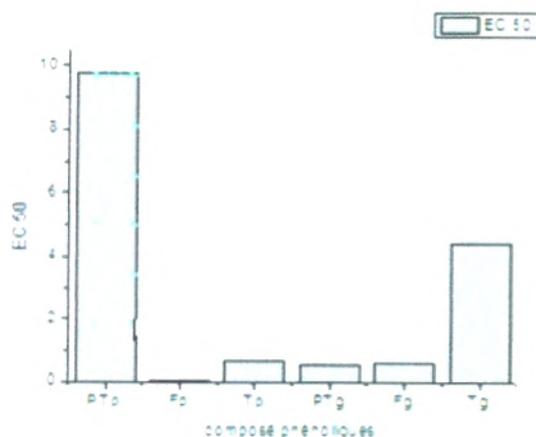


Figure 24 : Valeurs d'EC₅₀ des différents extraits en mg/ml.

Tous les EC₅₀ sont très basses, comprises entre 0 et 9 mg/ml. [Plus la valeur d'EC₅₀ est petite, plus l'activité de l'extrait testé est grande (**Pokorny et al, 2001**)]. Suivant ce paramètre, les capacités de piégeage du radical sont classées dans l'ordre : Les flavonoïdes des pulpes (**Fp**) > les polyphénols des graines (**PTg**) > Flavonoïdes des graines (**Fg**) > Les tanins de la pulpe (**Tp**) > les tanins des graines (**Tg**) > les polyphénols des pulpes (**PTp**). Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que les extraits du *Cératonia siliqua* possèdent une activité antiradicalaire selon les concentrations utilisées.

Les résultats obtenus concernant l'EC₅₀ des polyphénols des graines se rapprochent de celle de l'**Ouici (2012)**, avec un EC₅₀ de 0,48 mg/ml et l'EC₅₀ des autres composés phénoliques sont différents à nos résultats.

2. 2.La détermination de l'activité antioxydante par la méthode FRAP :

C'est une analyse de l'activité antioxydante qui est rapide, reproductible, et facile à exécuter (**Benzie et Strain, 1996**). Cette méthode est basée sur la capacité des polyphénols à réduire le fer ferrique Fe³⁺ en fer ferreux Fe²⁺. La puissance de réduction est l'un des mécanismes antioxydants (**Karagozler et al, 2008**). Par conséquent, Fe²⁺ est évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm (**Chung et al, 2002**).

Les valeurs obtenues de la mesure de la densité optique ont permis de tracer des courbes pour chaque extrait. Les résultats représentés dans les **figures 25 et 26**, nous ont montré que

la capacité de réduction est proportionnelle à l'augmentation de la concentration de nos échantillons (Ozturk *et al*, 2007 ; Su *et al*, 2008 ; Liuk *et al*, 2009). L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

❖ Pulpe :

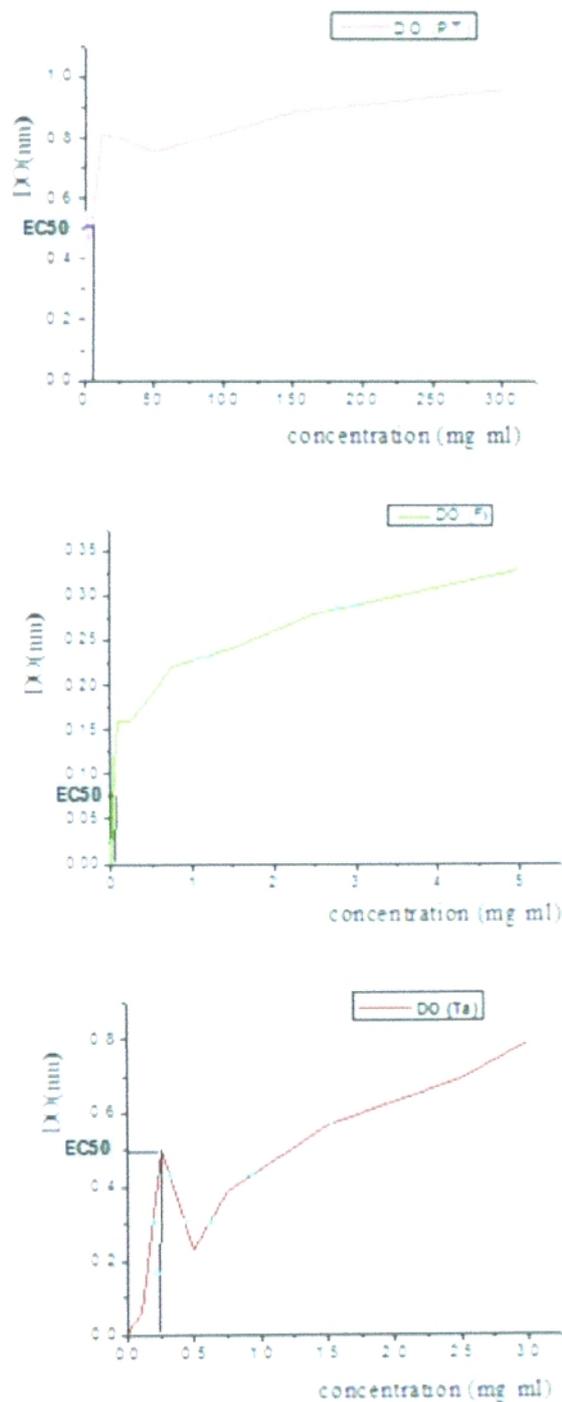


Figure 25: Pouvoir réducteur (FRAP) des 3 extraits phénoliques de la pulpe Cératonia siliqua L.

❖ Graine :

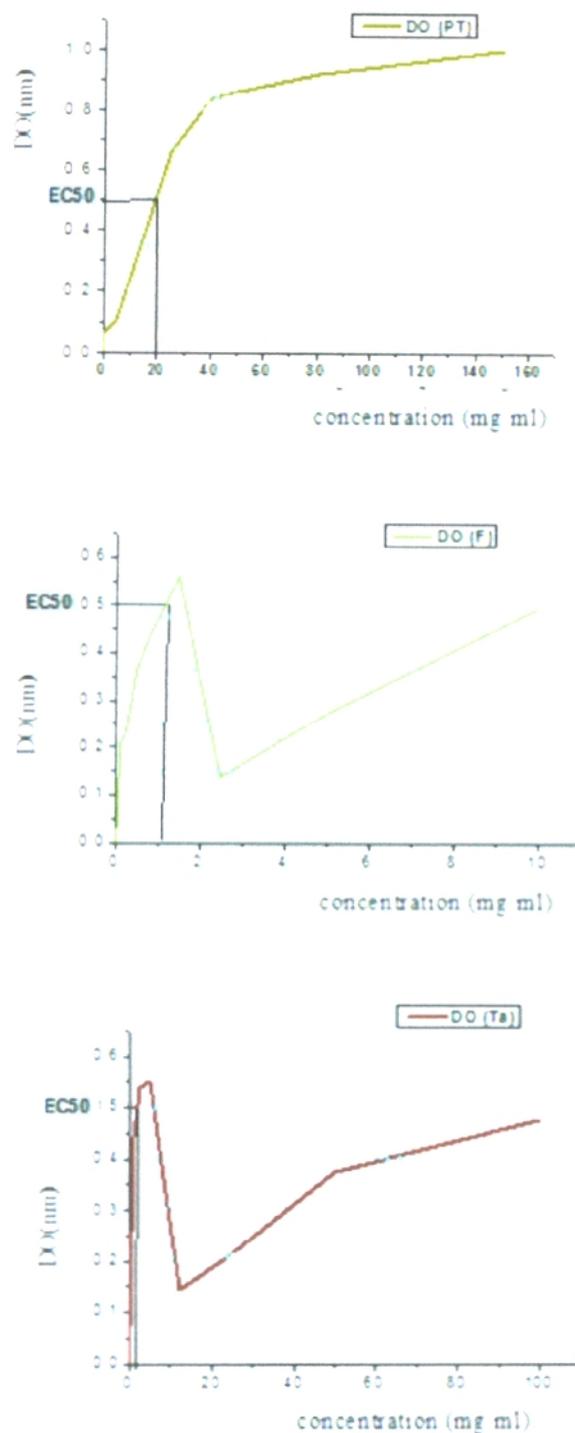


Figure 26: Pouvoir réducteur (FRAP) des 3 extraits phénoliques des graines.

A partir de ces courbes nous pouvons déterminer la valeur d'EC₅₀ de chaque extrait qui est défini comme la concentration nécessaire pour réduire 50 % du fer. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 8** puis illustrés sous forme d'histogramme dans **la figure 27**.

Tableau 8 : Valeurs des EC₅₀ trouvées pour les extraits des deux parties de la plante :

	Pulpes			Graines		
	Polyphénols Totaux	Flavonoïdes	Tanins	Polyphénols Totaux	Flavonoïdes	Tanins
EC ₅₀ mg/ml	5,42	0,027	0,25	19,21	0,50	2,38

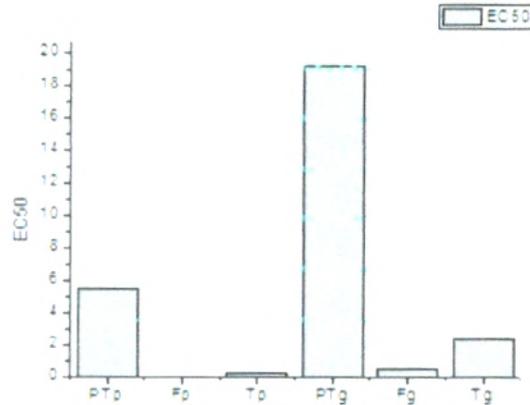


Figure 27 : Valeurs des EC₅₀ des différents extraits en mg/ml.

Nous remarquons que la capacité à réduire le fer est variable entre les différents extraits phénoliques, elle est beaucoup plus importante dans l'extrait des flavonoïdes des pulpes **Fp** (EC₅₀ = 0,027 mg/ml) suivi de l'extrait des tanins des pulpes **Tp** et les flavonoïdes des grains **Fg** (EC₅₀ = 0,25 mg/ml et EC₅₀ = 0,50mg/ml respectivement) par rapport aux autres extraits qui représentent une très faible activité. Nous pouvons classer la puissance de réduction de fer des différents extraits comme suit: **Fp** > **Tp** > **Fg** > **Tg** > **PTp** > **PTg**.

Nous pouvons déduire que tous les extraits de *Cératonia siliqua L* ont la capacité de réduire le fer. La capacité réductrice d'un composé peut servir comme un indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (Yang et al, 2008). Beaucoup de publications ont indiqué qu'il y a une corrélation directe entre les activités antioxydantes et la puissance de réduction des composants de quelques plantes (Yildirim et al, 2001).

2.3. La détermination de l'activité antioxydante par la méthode B-Carotène :

Les résultats obtenues des composés phénoliques (polyphénol totaux : **PT**, flavonoïde : **F**, tanins : **Ta**) des 02 parties de *Cératonia siliqua* (pulpe et graines) sont représentés dans les figures 28 et 29.

❖ Pulpe :

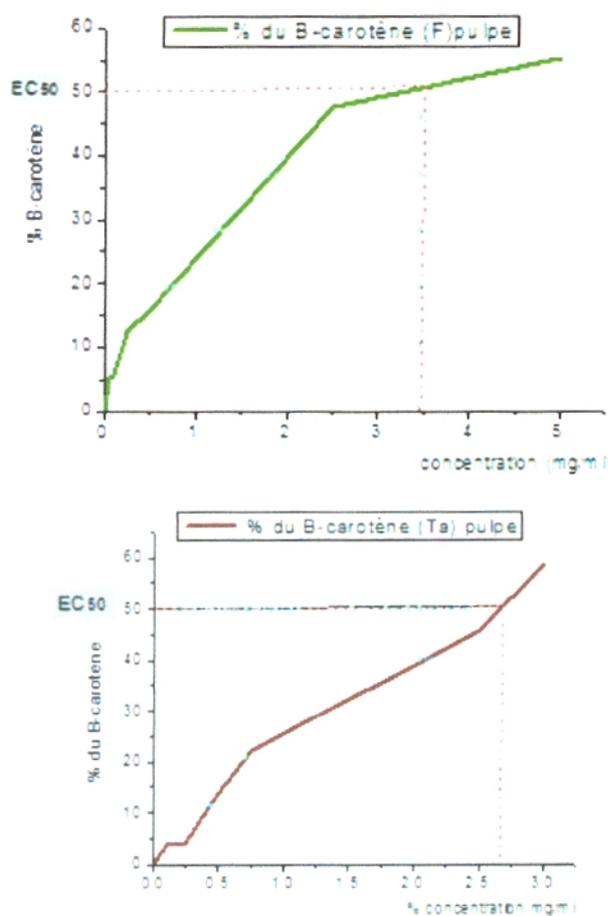


Figure 28 : L'Activité antioxydante relative des extraits phénoliques de la pulpe du B-carotène (les valeurs sont la moyenne de 2 mesures).

❖ Graine :

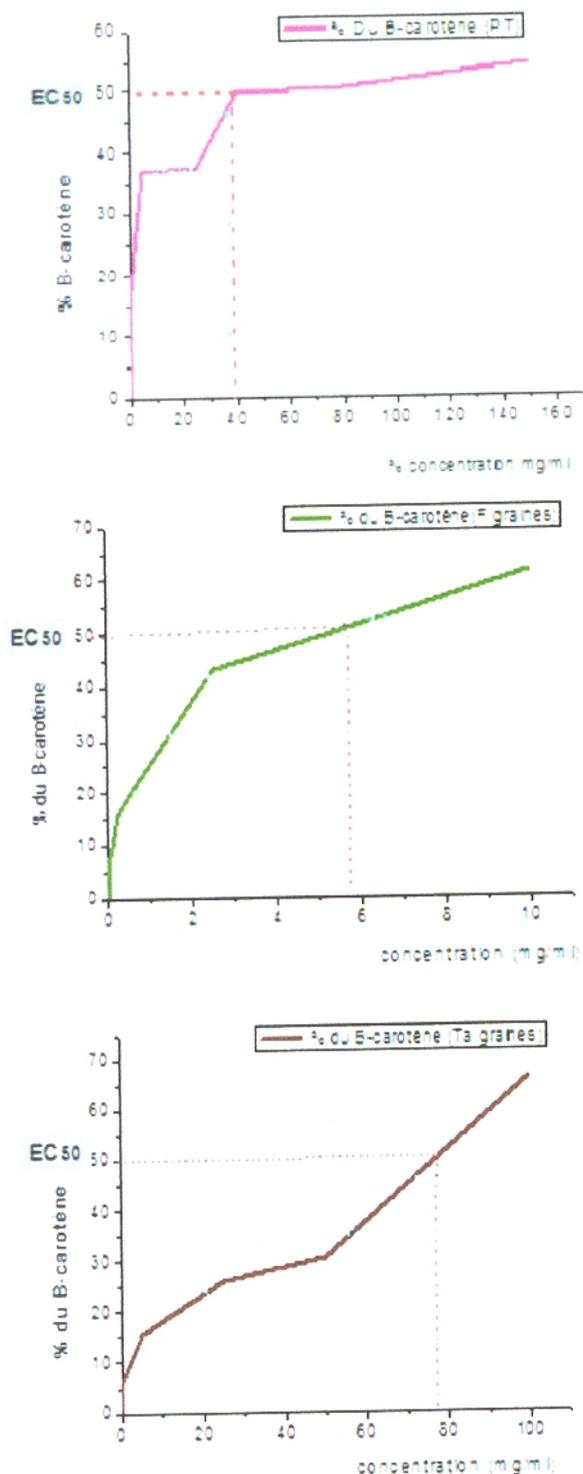


Figure 29 : les pourcentages des extraits phénoliques des graines du B- carotène (les valeurs sont la moyenne de 2 mesures).

Les courbes montrent une augmentation du pourcentage l'inhibition de la dégradation oxydative de β -carotène (décoloration) proportionnelle aux concentrations des extraits phénoliques.

D'après ces résultats, nous avons remarqué que les extraits phénoliques des graines et des pulpes testées inhibent d'une manière efficace la dégradation oxydative du β -carotène (décoloration) avec un pourcentage qui atteint 54,65% pour les polyphénols totaux et 61,44% pour les flavonoïdes et 66,45% pour les tannins à des concentrations de 150 mg/ml ;

10 mg/ml ; 100 mg/ml respectivement dans les graines, et de 31, 28% pour les polyphénols totaux et 55,18% pour les tannins et 58, 57% pour les flavonoïdes à des concentrations de 300 mg/ml ; 5mg/ml ; 3mg /ml respectivement dans les pulpes, (**Voir Annexes**).

A partir de ces courbes nous pouvons déterminer la valeur d'EC₅₀ de chaque extrait qui est défini comme la concentration nécessaire pour réduire 50 % du β -carotène. Les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau 9** puis illustrés sous forme d'histogramme dans la **figure 30**.

Tableau 9 : valeurs des EC₅₀ trouvées pour les extraits des deux parties de la plante :

	Pulpes			Graines		
	Polyphénols Totaux	Flavonoïdes	Tanins	Polyphénols Totaux	Flavonoïdes	Tanins
EC ₅₀ mg/ml	—	3,38	2,68	39,63	5,51	77,90

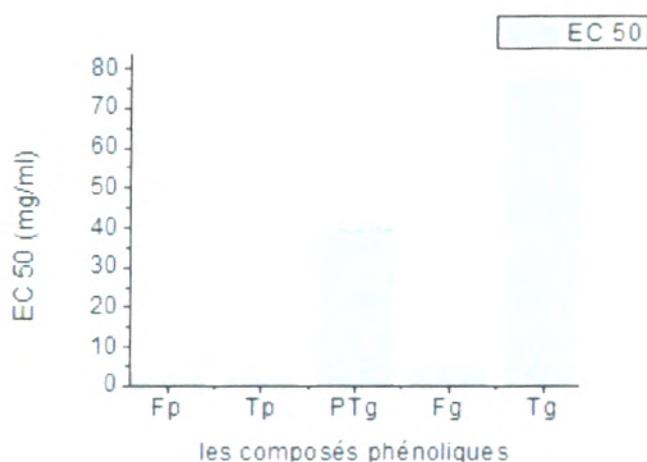


Figure 30 : Valeurs des EC₅₀ des différents extraits en mg/ml.

Nous remarquons que la capacité d'oxyder le β -carotène est variable entre les différents extraits phénoliques, elle est beaucoup plus importante dans l'extrait des tanins des pulpes (**Tp**) (EC₅₀ = 2,68 mg/ml) suivi de l'extrait des flavonoïdes des pulpes(**Fp**) et les flavonoïdes des grains(**Fg**) (EC₅₀ = 3,38 mg/ml et EC₅₀ = 5,51mg/ml respectivement) par

rapport aux autres extraits : polyphénol totaux (**PT**) et tanins (**T**) des graines, qui représentent une très faible activité. Nous pouvons classer la puissance de réduction de B-carotène des différents extraits comme suit: **Tp** > **Fp** > **Fg** > **PTG** > **T**.

Selon **Liyana-Pathriana et Shahidi (2006)**, un extrait qui inhibe ou retarde le blanchissement du **β-carotène** peut être décrit comme un piègeur de radicaux libres et comme un antioxydant primaire. A cet effet les travaux de **Bastida et al. (2009)** ont démontré que l'extrait phénolique de caroube pourrait être utilisé comme antioxydant contre l'altération des lipides de la viande de porc lors de la congélation.

3. Comparaison entre des trois méthodes :

À partir des résultats trouvés de la détermination de l'activité antioxydante par les trois méthodes, nous avons observés que chaque méthode a son propre résultat.

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation et la nature diversifiée des antioxydants, avec des composants à la fois hydrophiles et hydrophobes, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise. Le plus souvent il faut combiner les réponses de tests différents et complémentaires pour avoir une indication sur la capacité antioxydante de l'échantillon à tester (**Tabart et al, 2009 ; Provost et al, 1999 ; Hua Li et al, 2008**).

Conclusion

Le présent travail effectué sur *Cératonia siliqua* a permis de montrer que :

- ✚ Notre plante contient des quantités importantes en composés phénoliques, avec dominance en polyphénols totaux des pulpes (20%).
- ✚ L'évaluation des activités antioxydantes révèle que tous les extraits des composés phénoliques des deux parties de *Cératonia siliqua* testés par les trois méthodes manifestent une activité importante.
 - par la méthode DPPH, les 2 extraits phénoliques des pulpes et des graines ont un pourcentage élevé pour inhiber le DPPH. Toutes les valeurs obtenues sont supérieures à 90% et une activité antioxydante comprises entre 0 et 9 mg/ml pour tous les extraits phénoliques. Ces résultats confirment que les composés phénoliques des pulpes et des graines du *Cératonia siliqua L* ont la capacité de piéger les radicaux libres.
 - Les résultats enregistrés avec la méthode FRAP sont excellente, Tous les extraits phénoliques étudiés ont la capacité de réduire le fer qui augmente en fonction de la concentration, et l'activité antioxydante obtenue par cette méthode est plus importante que la méthode de DPPH sauf dans les PTG, Ou on enregistre une activité antioxydante faible.
 - Le test de blanchissement de la **β -carotène** a révélé que les extraits phénoliques des graines et des pulpes testées inhibent d'une manière efficace la dégradation oxydative de **β -carotène** (décoloration). Nous avons remarqués que les extraits phénoliques de la pulpe ont un pourcentage élevé pour inhiber la dégradation de **β -carotène** avec des activités antioxydantes beaucoup plus importante dans l'extrait des tanins des pulpes (**Fp**), ($EC_{50} = 2,68$ mg/ml).
- ✚ Concernant les méthodes de la détermination de l'activité antioxydante, il n'y a pas une méthode universelle par laquelle l'activité antioxydante peut être mesurée quantitativement d'une façon bien précise.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in-vitro* ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances et source naturelle biologiquement active. Des essais

complémentaires *in-vivo* seront nécessaires et devront pouvoir confirmer les performances mises en évidence.

En fin, Cette étude valide scientifiquement l'usage traditionnel de ces plantes dans les traitements de diverses maladies et aussi dans l'alimentation et révèle leur intérêt dans le cadre d'une exploitation en biotechnologie.

Références bibliographiques.



- **Aafi A., (1996)** : Note technique sur le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.). Centre Nationale de la Recherche Forestière. Rabat (Maroc). 10p.
- **Ait Chitt M. et al, (Juin, 2007)** : Production de plants sélectionnés et greffés de caroubier. Transfert de technologie en agriculture. N° 153/IAV Rabat ,p 1-4.
- **Albanell E. et al, (1991)**: Characterization of Spanish carob pod and nutritive value of carob kibbles, *Options Méditerranéennes* N°16, pp. 135- 136.
- **Alkurd A., et al 2008**: Tannin Contents of Selected Plants Used in Jordan. *Jordan Journal of Agricultural Sciences* 4: 265 - 274.



- **Baum N., (1989)** : Arbres et arbustes de l’Egypte ancienne, pp. 354.
- **Bastida S., et al, (2009)**: Antioxidant activity of Carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage, *Food Chemistry* Vol. 116, N° 3, pp. 748-754.
- **Battle I. and 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 Resources Institute. Rome. Italy.
- **Baytop T., (1984)**: Therapy with medicinal plant in Turkey (Past and Present), Publication of the Istanbul University, N°: 3255, Istanbul.
- **Benzie I.F.F. et Strain J.J., (1996)**: The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant power” the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70–76.
- **Berrougui H., (2007)** : Le caroubier (*Ceratonia siliqua*.L) ,une richesse nationale aux vertus médicinales ,*Maghreb Canada Express* Vol.5,N° 9.
- **Belaizi M. et al, (1994)** : Régénération des plantes? Ed. AUPEL-UREF.J.L. Eurotex. Paris. P: 227-232.

References bibliographiques.

- **Biner B. et al, (2007):** Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua L.*) in Turkey, Food Chemistry N°100, pp.1453-1455.
- **Blilil H .et Boussafi S., (2011) :** Contribution à l'élaboration d'un jus de caroube : analyses physicochimiques et stabilité-évaluation sensorielle.
- **Boudet A. M., (2000) :**L'usine chimique. 9^{ème} conférence de l'université de tous les savoirs.France. p1-16.
- **Boudjellal K., (2009) :** Etude de l' activité biologique des extraits du fruit de l' Elaeagnus angustifolia L. magister en biologie.
- **Boudy P., (1950) :** Economie forestière Nord-Africain, Tome II : Monographie et traitement des essences forestières, Ed. Larose, Paris, pp.443-445.
- **Brandt K. et al, (2001):** does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods? J Sci Food Agric 81, 924-931.
- **Bruneton J., (1999) :**Pharmacologie-Phytochimie-Plantes médicinales, Tech.et Doc.Ed. Lavoisier (3° Edition), Paris.



-
- **Calixto F.S. and J. Canellas, (1982):** Components of nutritional interest in carob pods *Ceratonia siliqua* , Journal of the Science of Food Agriculture N°33, pp. 1319–1323.
 - **Charles M. Benbrook, Ph.D.,(2005):** Chercheur principal The Organic Center.
 - **Chung Y-C. et al,(2002):** Antioxidative activity and safety of the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50, 2454–2458.
 - **Coit, (1967):**Carob varieties for the semi-arid southwest, Fruit Varieties. Hort. Digest N°21, pp. 5–9.



-
- **Dai G.H. et al, (1995):** Phytophatology, 85 (1995) 149-154.

- **Da Silva Pinto, M. et al, (2008):** Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananasa* Duch), *Food Chemistry*, 107: 1629-1635.
- **Dauguet J.C. et Foucher J.P.,(1982):** Les flavonoïdes de *Arbutus unedo* L.(Ericacées), *Plants médicinales et phytothérapie*, vol. 16, N° 3, pp. 185-191.
- **Druyne T., (1999):** Condensed vegetable tannins :biodiversity in structure and biological activities.*Biochemical Systematics and ecology.* : 27.(4): 445-459.



-
- **Emerenciano V. P.et al, (2007):** Selforganising maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae : a classification of tribes using *flavonoid data*. *Journal of brazilian chemical society.*, 18 (5) : 891-899.
 - **Epifano F.et al, (2007):**Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry* 68:939 - 953.
 - **Escarpa and Gonzalez,2001:** Optimisation strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources.
J.Chromatogr.A.,2000.897(1-2):161-70.



-
- **FAOSTAT, (2010):**www.fao.org.
 - **Fleuriet A. et al, (2005):** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.
 - **Ferguson I. K., (1980):** The pollen morphology of *Ceratonia* (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Kew bull.* 35(2):273-277., pls 6-7.
 - **Fournier P., (1977):**Les quatre flores de la France (générale, alpine, méditerranéenne littorale) *Lechevalier* .Paris.
 - **François N.M., (2010) :** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques , spécialité: chimie organique , l'Université Paul Verlaine-Metz.

- -Florentin E ., (2004) : fruits et légumes, polyphénols et santé.



-
- **Gaouar N., (2011)** : Etude de la valeur nutritive de la caroube de différentes variétés Algériennes. Mémoire de Magister en Agronomie . Université de Tlemcen.
 - **Ghrabi Z., (1996)** : *Ceratonia siliqua L.* Legumino-Caesalpinaceae Ministère de l'Environnement et de l'Aménagement du Territoire 1996 : Plantes Naturelles du Sud. A Guide to Medicinal Plants in North Africa.
 - **Gharnit N., (2003)** : Caractérisation et essai de régénération in vivo du caroubier (*Ceratonia siliqua L.*) originaire de la province de Chefchaouen .



-
- **Hanane El Hajaji et al, (2011)**: *Journal Arabian of chemistry* 4 (2011) 321.
 - **Hartmann T., (2007)**: From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831 - 2846.
 - **Hariri A., et al, (2009)** : mise en oeuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube, *rev. microbiol. ind. san et environn.* pp. 37-55.
 - **Hillcoat D. et al, (1980)**: A new species of *Ceratonia* (Leguminocea-Caesalpinioideae) from Arabia and the Somali Republic. *Kew bull.* 35(2):261-271.
 - **Hubert J., (2006)** : Caractérisation biochimique et propriétés biologique des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines, Thèse pour l'obtention du Diplôme de Doctorat à L'institut Nationale Polytechnique de Toulouse, Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Biologiques.
 - **Hutzler P. et al, (1998)**: Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of experimental botany.* 49 (323): 953-965.
 - **Hua Li et al, (2008)**: Comparative Study of Antioxidant Activity of Grape (*Vitis vinifera*) Seed Powder Assessed by Different Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16 (6), 67-73.



-
- **Irwin H. S. and Barneby R. C., (1981):** Cassieae. Pp. 97-106 in *Advances in Legume Systematic*. Vol. 1 (R. M. Polhill and P. H. Raven, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, England.



-
- **Johnson S. et al, (1988):** *Application of LBC in food and pet food systems*. Pp. 577-587 in *Proceedings of the II International Carob Symposium (P. Fito and A. Mulet, eds.)*. Valencia, Spain.



-
- **Katim Alaoui et al, (2010) :** *Rec. Nat. Prod.* 4:4 (2010) 193-204
 - **Karaali A. et al, (2004):** Flavonoids in fruit and vegetables : their impact on food quality, nutrition and health–STREP or CA. European commission's the 6th framework programme for research. Istanbul technical university. *Turkey*.
 - **Karagozler, A.; Erdag, B.; Calmaz Emek, Y., (2008):** Antioxydant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*, *Food Chemistry*, 111: 400-407.
 - **Kaur C. et Kapoor H-C., (2002):** Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables .*Food Sci. Technol*, 37:153-161
 - **Konaté I., (2007) :** Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L) et des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées. Thèse de doctorat en Biotechnologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V-agdal Faculté des sciences Rabat .
 - **Koleva et al,(2002).**
 - **Khartal N. et al, (2007):** Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure .*Food Chemistry*, 100:584-589.
 - **Kumazawa S. et al, (2002):** Antioxidant Activity of Polyphenols in Carob Pods. *J. Agric. Food Chem.*, Vol.50. N°2, pp. 373–377.



- **Lahouel M., (2005)** : Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat de l'université Mentouri de Constantine.
- **Lavallée P., (1962)**: Le Caroubier, son utilisation dans l'alimentation du bétail en Algérie et en Tunisie. Alger, 47 p.
- **Lee. J. H et al, (2004)**: Réactif oxygen species.aging ?and oxydativenutraceutical /Comprehensive review in food .safety,3,20-33.
- **Leroy A., (1929)** : Elevage rationnel des animaux domestiques. Hachette ed., 448p.
- **Linskens H. and Scholten W., (1980)**; The flower of carob. Potug. Acta. Bilo. (A) XVI (1-4):95-102.
- **Liuk L. et al , (2009)**: Determination of polyphenolic content and antioxydant activity of Kudingcha made from Ilex kudingcha C.J. Tseng, Food chemistry, 112: 35-4.
- **Liyana-P. et al, (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.



- **Maisuthisakul, P. et al, (2007)**: Assessment of phenolic content and free radical scavenging capacity of some that indigenous plants, Food Chemistry, 100: 1409-1418.
- **Makris D. P. et Kefalas P., (2004)**: Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidant. Food Technol. Biotechnol. 42: 105- 108.
- **Masquelier J., (2006)**: Flavay, for a healthy mind body: (site). More from 50 years of Research Reveals the Health benefits of Flavay.
- **Memrah M., (2011)** : Etude de la valeur nutritive de la caroube (*ceratonia siliqua* L). Université de Tlemcen.
- **Molineux P., (2004)**: The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J-Sci.Technol, 26:211-219

- **Manthey, J.A. et Guthrie N., (2002):** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 - 5837–5843.
- **Messina M., Barnes S., (1991):** *Journal of the National Cancer Institute* 83 - 541–546.
- **Mukthar H. et al, (1992):** *Preventive Medicine* 21 -351– 360.
- **Kumazawa et al, 2002.**



-
- **Nabli A. (1989),** Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisienne, I. Éléments de botanique et de phyto-écologie, MAB-FST-Laboratoire de botanique fondamentale et appliquée, pp. 247.
 - **Narayana K. R et al,(2001):** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology., 33 : 2-16.*
 - **Neukom H., (1988):** Carob bean gum: properties and application. Pp. 551- 555 in *Proceedings of the II International Carob Symposium* (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain.
 - **Nijveldt R. J. et al (2001):** Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American journal of clinical nutrition., 74 : 418-425.*



-
- **Ortiz P. L., Arista M. and Talavera S., (1996):** Produccion de nectar y frecuencia de polinizadores en *Ceratonia siliqua* L. (Caesalpinaceae). *Anales del Jardin Botanico de Madrid* 54:540-546.
 - **Orphanos P. I. and Papaconstantinou J., (1969):** The carob varieties of Cyprus, *Tech. Bull. 5. Cyprus Agricultural Research Institute, Ministry of Agriculture and Natural Resource, Nicosia.*
 - **Ouici Asma , (2012) :** Pouvoir antioxydant des polyphénols du fruit de caroubier (*ceratonia siliqua* l), Mémoire Master en Biologie; Option physiopathologie
 - **Oyaizu.M., (1986):** Studies en products of browning reaction prepared from glucose amine, *Japanese Journal of Nutrition*, 44:307-315.
 - **Owen, R. et al, (2003):** *Food and Chemical Toxicology* 41 (2003) 1727– 1738.

- **Ozturk M. et al ,(2007):** Antioxidant activity of stem and root extracts of rhubarb (*Rheum ribes*): an edible medicinal plant, *Food Chemistry*, 106: 1264-1270.



-
- **Passos de Carvalho J. (1988):** Carob pollination aspects. Pp. 281-291 in *Proceedings of the II International Carob Symposium* (P. Fito and A. Mulet, eds.). Valencia, Spain.
 - **Piquemal G., (2008) :** Les flavonoïdes (en ligne) : http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215.
 - **Pokorny J. et al, (2001):**Antioxydants in food, Practical applications. Woolhead Publishing Limited. ISBN: 185573-463X.
 - **Puhan Z. and Wielinga M. W., (1996):** Products derived from carob pods with particular emphasis on carob bean gum (CBG). Report Technical Committee of INEC (unpublished).
 - **Provost et al,(1999) :** Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47,425-431.



-
- **Quezel P. et Santa S., (1963) :** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (tome1), Editions du centre national de la recherche scientifique, pp.557.



-
- **Ramon-Laca et Maabberley D .J.,(2004):**The ecological status of the carob-tree(*Ceratonia siliqua*, légumineusae)in the Mediterranean.*Botanical Journal of the Linnean Society*,114:431-436.
 - **Rebour H., (1968) :** fruits Méditerranéen, la maison rustique Paris, 330pp.
 - **Rejeb M.N.,(1995) :**Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration. Dans: *Quel avenir pour l'amélioration des plantes?* Edit. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris. pp: 79-85.

References bibliographiques.

- **Rejeb M. N. et al, (1991)** :Physiologie du caroubier (*Ceratonia siliqua L.*) en Tunisie. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides, Group d'Etude de l'Arbre, Paris, France. P:417-426.
- **Rejeb M. N.,(1989)** : Mécanismes physiologiques d'adaptation à la sécheresse du Caroubier, *Rev Res Amélior Prod Milieu Aride I*, pp.47-55.
- **Résémy C., (1998)** : Les légumes et fruits sources de micronutriments protecteurs.
- **Retana J.et al, (1990)**: Importancia de los insectos en la polinizacion del algarrobo. *Bol. San. Veg. Plagas*, 16:143-150.
- **Retana J., et al, (1994)**:Flowering phenology of carob, *Ceratonia siliqua L.* (Caesalpinaceae). *J. Hort. Sci.* 69(1):97-103.
- **Rice-Evans C., (1955)**:Plant polyphénols :free radical scavengers or chain-breaking antioxydants ?*Biochem.Soc.Symp.*,1955,61:103_16.
- **Résémy C., (1998)** : Les légumes et fruits sources de micronutriments protecteurs.
- **Rice-Evans et al (1995)**: *Free Radical Research 22 (1995) 377–383.*



-
- **Sebastian K. T. and McComb J. A., (1986)**: A micropropagation system for carob (*Ceratonia siliqua L.*). *Scientia Hort.* 28:127-131.
 - **Sbay H. et Abourouh M., (2006)** : Apport des espèces à usages multiples pour le développement durable : cas du pin pignon et du caroubier, Centre de Recherche Forestière Haut-Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification, Rabat, pp.1-9
 - **Sbay, H., (2008)**:Le caroubier au Maroc, Un arbre d'avenir. CRF Collection Maroc Nature.
 - **Sfakiotakis E. M., (1978)**: Germination in vitro of carob (*Ceratonia siliqua L.*) pollen. *Z. Pflanzenphysiol.* 89:443-447.
 - **Saidi R. et al, (2007)** :Micropropagation du caroubier (*cératonia siliqua*) par culture des bourgeons axillaires issues de jeunes plantules. *Bull.Soc. Pharm. Bordeaux*, 2007, 146,113-129.
 - **Sanchez M., Review C.,(2002)**: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in food and biological systems, *Food Sci. Tech. Int.* Vol.8, N°3, pp. 121-137.

References bibliographiques.

- **Saura-Calixto F. J., (1987) :** Dtermination de la composición química de algarroba (Ceratonia siliqua), Azúcares, taninos, pectinas y aminoácidos. Anales de Bromatologia., XXXIX: 81- 93.
- **Su M.S. et al , (2008) :** Antioxydant activities of vtrus herbal product extracts, Food Chemistry, 111: 892-896.



-
- **Tabart J. et al, (2009):** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. Food Chemistry, 113, 1226-1233.
 - **Tahiri A. et al, (2009) :** Symposium sur les composes phénoliques, 17 et 18 décembre , Agadir –Maroc.
 - **Tichor RJ, (1958):**Report to the gouvernement of Cyprus on Carob production. Rome FAO.58/10/79IO.
 - **Tous j. and Baltte I., (1990):** El algarrobo. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.



-
- **UNUP, (1986):** The United Nations university press. Food and Press nutrition bulletin.



-
- **Verhoeven M. E. et al,(2002) :** Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthesis pathway. *Journal of experimental botany.*, 53 (377) : 209 -210.
 - **Vardar Y. et al, (1972):** Preliminary results on the chemical composition of the Turkish carob beans, Qual. Plant Mater, vol. XXI N°4, pp. 318- 327.



-
- **Whiteley L.O., Klurfeld D.M., (2000):** Nutrition and Cancer 36 -131–149.
 - **Wursh et al ;(1984):** the tannins granules from ripe carob pod .Lebensm.-Wiss.u.- Technol., 17:351_351.

- **W –Erdman J. et al, (2007):**Flavonoids and heart health : Proceeding of the ILSI North America flavonoids workshop, may 31-june 1, 2005, Washington. *Journal of Nutrition.*, **137** (3 supp1): 718 s-737 s.



- **Yamagishi, M., et al,(2000) :** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 - 5074–5078.
- **Yanishlieva N-V-I et Marinova E-M., (1995):**Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chemistry*, **54**:337-382.
- **Yakhlef A., (2010) :** etude de l'activite biologique des extraits de feuilles de thymus vulgaris l. et laurus nobilis l ,université el hadj lakhdar –batna–magister en biochimie appliquée.
- **Yang J ., Guo J ., Yuan J., (2008):**In vitro antioxidant properties of rutin .*LWT*, **41**:1060-1066
- **Yen G., Duh P. D., (1994):**Scavenging effects of methanolic extract of peanut hulls on free radical and active oxygen species, *J. Agri. Food tech.* N°42, pp.629-636.
- **Yildirim, A. et al ,(2001):** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 4083-4089
- **Yu Z, Dahlgren R.A., (2005):** Evaluation of methods for measuring polyphenols in copper foliage, *J.Chem.Ecol.* N°26, pp.2119-2140.



- **Zouhair O., (1996) :** Le caroubier: situation actuelle et perspectives d'avenir, Document interne, Eaux et forêts, Maroc, pp 22.
-

Sites des Images:

- http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://p5.storage.canalblog.com/51/31/338481/80917460_o.jpg&imgrefurl=http://graindecel.canalblog.com/archives/2012/11/10/25547909.html&usg=__k5_q3ddrggFCTAKILWQhZh1VJ_Q=&h=1431&w=2048&sz=742&hl=fr&start=15&zoom=1&tbnid=4inAYn0MOXZnMM:&tbnh=105&tbnw=150&ei=doViUZyzBsfE4gSs7YGoBQ&prev=/search%3Fq%3Dle%2Bcaroubier%26hl%3Dfr%26gbv%3D2%26tbn%3Disch&itbs=1&sa=X&ved=0CEgQrQMwDg
 - http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://krapooarboricole.files.wordpress.com/2010/09/caroub-2.jpg&imgrefurl=http://krapooarboricole.wordpress.com/2010/09/23/le-caroubier-de-kritsa-crete-grece/&usg=__GIKZHdKtb-LfbqsrJk0U_mHt6o=&h=900&w=1200&sz=492&hl=fr&start=30&zoom=1&tbnid=0OG2K6taF3_b7M:&tbnh=113&tbnw=150&ei=m4ViUf_ANaGn4ATQqoD4BQ&prev=/search%3Fq%3Dle%2Bcaroubier%26start%3D20%26hl%3Dfr%26sa%3DN%26gbv%3D2%26tbn%3Disch&itbs=1&sa=X&ved=0CD4QrQMwCTgU
 - http://www.google.fr/imgres?imgurl=http://www.florealpes.com/photos/ceratonia_2.jpg&imgrefurl=http://www.florealpes.com/fiche_ceratonia.php%3Fphotonum%3D2%26PHPSESSID%3D2f09bf54d2cc72f514d8c801eadf54c9&usg=__9omhY6b8yVqY3uXj0KXOvH6nk-o=&h=600&w=438&sz=70&hl=fr&start=57&zoom=1&tbnid=WDC0LNwALdYcyM:&tbnh=135&tbnw=99&ei=vYViUavoBI6u4QT-woDABg&prev=/search%3Fq%3Dle%2Bcaroubier%26start%3D40%26hl%3Dfr%26sa%3DN%26gbv%3D2%26tbn%3Disch&itbs=1&sa=X&ved=0CEwQrQMwEDgo
 - http://en.wikipedia.org/wiki/Ceratonia_siliqua
-

Annexes

Tableau1 : Concentration et Pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait du tanins pulpes de caroube.

concentration mg/ml	%d'inhibition du DPPH des tanins pulpes %
0	0
0,05	9,99
0,1	11,05
0,25	19,39
0,5	26,27
0,75	54,59
1,5	90,46
2,5	91,26
3	94,97

Tableau 2 : Concentration et Pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait des Flavonoïdes pulpes de caroube.

Concentration mg/ml	%D'inhibition du DPPH Flavonoïdes pulpes %
0	0
0,05	0,36
0,1	76,83
0,25	83,18
0,5	87,16
0,75	88,74
1,5	92,45
2,5	93,38
5	95,49

Tableau3 : Concentration et Pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait du poluhénols totaux pulpes de caroube.

Concentration mg/ml	%d'inhibition du DPPH du poluhénols totaux pulpes %
0	0
1	5,6
1,5	8,53
2,5	11,13
5	18,4
12,5	53,86
25	88,8
50	93,33
100	93,86
200	94,66
300	94,66
400	95,2
500	96,8

Tableau 4: Concentration et Pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait du poluhénols totaux graines de caroube.

Concentration mg/ml	%d'inhibition du DPPH du poluhénols totaux graines %
0	0
1	79,73
1,5	82,4
2,5	85,86
5	88,8
12,5	88,53
25	92,8
40	92,8
60	94,93
100	97,33
150	97,86
185	98,66

Tableau 5: Concentration et Pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait du Flavonoïdes graines de caroube.

Concentration mg/ml	% D'inhibition du DPPH Flavonoïdes graines %
0	0
0,05	0,59
0,1	2,31
0,25	3,63
0,5	10,65
0,75	76,9
1,5	85,3
2,5	88,61
5	88,88
10	91,79

Tableau 6: Concentration et Pourcentage d'inhibition de DPPH de l'extrait du Tanins graines de caroube.

Concentration mg/ml	%D'inhibition du DPPH (Tanins graines) %
0	0
0,05	6,41
0,1	8
0,5	18,72
1	22,83
2,5	30,24
5	55,26
12,5	55,26
25	78,42
50	92,72
100	95,36

FRAP :

Tableau 6: Concentration et DO de l'extrait du Tanins graines de caroube.

concentration mg/ml	DO polyphénols T pulpe nm
0	0
0,05	0,13
0,1	0,46
1	0,48
5	0,557
12,5	0,752
25	0,799
50	0,811
150	0,884
300	0,959

Tableau 7: Concentration et DO de l'extrait des flavonoïdes pulpe de caroube.

concentration mg/ml	DO flavonoïdes pulpe nm
0	0
0,05	0,11
0,1	0,16
0,25	0,16
0,5	0,19
0,75	0,22
1,5	0,24
2,5	0,28
5	0,33

Tableau 8: Concentration et DO de l'extrait des Tanins pulpe de caroube.

concentration mg/ml	DO Tannins pulpes nm
0	0
0,05	0,032
0,1	0,059
0,25	0,509
0,5	0,23
0,75	0,39
1,5	0,57
2,5	0,69
3	0,79

FRAP : Graines .

Tableau 9: Concentration et DO de l'extrait des P T graines de caroube.

concentration mg/ml	DO polyphénols T graines nm
0	0
0,025	0,044
0,05	0,06
0,1	0,064
1	0,072
5	0,101
25	0,66
40	0,842
80	0,918
150	0,998

Tableau 9: Concentration et DO de l'extrait des Flavonoïdes graines de caroube.

Concentration mg/ml	DO Flavonoïdes graines nm
0	0
0,05	0,06
0,1	0,21
0,25	0,23
0,5	0,36
0,75	0,43
1,5	0,56
2,5	0,138
5	0,274
10	0,496

Tableau 10: Concentration et DO de l'extrait des Tanins graines de caroube.

concentration mg/ml	DO Tanins graines %
0	0
0,05	0,02
0,1	0,073
1	0,44
2,5	0,54
5	0,55
12,5	0,143
25	0,214
50	0,375
100	0,478

B-Carotène :**Tableau 11: Concentrations et pourcentages du B-carotène de l'extrait des PT pulpe de caroube.**

concentrations mg/ml	%du B-carotène PTP %
0	0
0,05	8,2
0,1	8,21
5	19,2
25	21,63
150	22,09
300	31,28

Tableau 12: Concentrations et pourcentages du B-carotène de l'extrait des flavonoïdes pulpe de caroube.

concentration mg/ml	%du B-carotène (F P) %
0	0
0,05	5,3
0,1	5,51
0,25	12,6
0,5	15,72
0,75	20,16
2,5	47,65
5	55,18

Tableau 13: Concentrations et pourcentages du B-carotène de l'extrait des Tannins pulpe de caroube.

concentrations mg/ml	%du B-carotène Tannins pulpe %
0	0
0,1	3,74
0,25	4,28
0,5	13,55
0,75	22,09
2,5	45,65
3	58,57

Tableau 1 4: Concentrations et pourcentages du B-carotène de l'extrait des Tannins pulpe de caroube.

concentration ml/mg	% DU B-carotène (PT graines)
0	0
0,05	17,4
5	36,73
25	37,67
40	49,81
80	50,37
150	54,65

Tableau 1 5: Concentrations et pourcentages du B-carotène de l'extrait Flavonoïdes graines de caroube.

concentration mg/ml	%du B-carotène (F graines)
0	0
0,05	8,06
0,25	16,01
0,5	19,54
2,5	43,34
5	49,24
10	61,44

Tableau 16: Concentrations et pourcentages du B-carotène de l'extrait des Tannins graines de caroube.

concentration mg/ml	%du B - carotène (Ta graines)
0	0
0,1	6,37
1	7,9
5	15,72
25	25,97
50	30,73
100	66,45

RESUME

Notre choix d'étude s'est porté sur une plante originaire de la méditerranée nommé Caroubier (*Cratonia siliqua*) appartenant à la famille des *fabacées*. Les pulpes et les graines de caroube de la région de Tlemcen ont fait l'objet de notre étude, dans le but de déterminer les rendements et l'activité anti-oxydante des composés phénoliques. Ces derniers ont des rendements de : 20% pour les polyphénols totaux ; 0,4% pour les flavonoïdes et les tannins dans les pulpes, les rendements des composés phénoliques des graines sont : 7,4% pour les polyphénols totaux ; 0,2% pour les flavonoïdes et 1,6% pour les tannins. L'activité anti-oxydante de deux parties (pulpes et graines) du caroubier a été évaluée, *in vitro*, par 3 tests différents qui sont : le test de piégeage du radical libre DPPH, Test de la réduction du fer FRAP et le test de décoloration du β -carotène. Les résultats de l'activité anti-oxydante obtenus avec le test de DPPH est de d'EC₅₀ = 9,77 mg/ml ; 0,07 mg/ml ; 0,71 mg/ml ; pour les polyphénols totaux ; les flavonoïdes ; les tannins des pulpes successivement et l'EC₅₀ des graines = 0,56 mg/ml ; 0,64 mg/ml ; 4,41 mg/ml. Avec le test de FRAP on a enregistré des valeurs de l'activité anti-oxydante d'EC₅₀ = 5,42 mg/ml ; 0,027 mg/ml ; 0,25 mg/ml pour les polyphénols totaux ; les flavonoïdes ; les tannins des pulpes successivement et pour les graines : 19,21 mg/ml ; 0,50 mg/ml ; 2,38 mg/ml. Par le test de β -carotène, nous avons remarqué que les extraits phénoliques des graines et des pulpes testées inhibent d'une manière efficace la dégradation oxydative de β -carotène et l'activité antioxydante enregistré par ce test est de 3,38 mg/ml pour les flavonoïdes et 2,68 mg/ml pour les tannins dans les pulpes, pour les graines : 39,63 mg/ml pour les polyphénols totaux ; 5,51 mg/ml pour les Flavonoïdes ; 77,90 mg/ml pour les tanins. A partir de ces résultats, on peut dire que tous les extraits des composés phénoliques des pulpes et des graines ont une activité anti-oxydante importante, donc ces composés ont la capacité de piéger les radicaux libres.

Mots clés : Caroubier (*Cratonia siliqua*), pulpes, graines, Activité anti-oxydante, DPPH, FRAP, β -carotène.

المخلص

تركز خيارنا على دراسة شجرة اصلها البحر الأبيض المتوسط، يدعى الخروب (سغونيا سليكا) تنتمي إلى العائلة البقوليات. كانت بذور ولب الخروب لمنطقة تلمسان موضوع دراستنا من أجل تحديد الربح والنشاط المضاد للأكسدة لمركبات الفينول. عائدات هذا الأخير: 20% البوليفينول الإجمالي، الفلافونويد والعفص بنسبة 0,4% بالنسبة لللب، والمحاصيل من المركبات الفينولية البذور هي: 7,4% البوليفينول الإجمالي، 0,2% للمركبات الفلافونويد والعفص بنسبة 1,6%. وتم تقييم النشاط المضادة للأكسدة من جزئين (اللب، خفض اختبار الحديد DPPH والبذور) من شجرة الخروب في المختبر من قبل ثلاثة اختبارات مختلفة هي: اختبار الجذور الحرة = 9,77 ملغ / مل، EC₅₀ هو DPPH-كاروتين. نتائج النشاط المضادة للأكسدة التي تم الحصول عليها مع اختبار β وتلون FRAP تم تسجيلها = 0,56 ملغ / مل، EC₅₀ 0,07 ملغ / مل، 0,71 ملغ / مل للبوليفينول لإجمالي، الفلافونويد؛ العفص تباعا لللب والبذور = 0,64 ملغ / مل، 4,41 ملغ / مل، EC₅₀ قيم مضادة الأكسدة FRAP 0,25 ملغ / مل، 0,027 ملغ / مل، 0,25 ملغ / مل مع اختبار كاروتين، β ، 2,38 ملغ / مل باختبار إجمالي البوليفينول، الفلافونويد، اللب العفص تباعا والبذور: 19,21 ملغ / مل، 0,50 ملغ / مل، ونتائج β وجدنا أن المستخلصات الفينولية من البذور واللب التي تم اختبارها أنها تمنع بشكل فعال في تدهور التأكسدي من ملغ / مل، 0,71 ملغ / مل، 2,68 ملغ / مل للفلافونويد، EC₅₀ = 3,38 الملغ / مل للنشاط المضادة للأكسدة التي تم الحصول عليها بهذا الاختبار هي ملغ / مل للعفص من هذه 77,90 ملغ / مل للفلافونويد، 5,51 ملغ / مل البوليفينول الإجمالي، EC₅₀ = 39,63 الملغ / مل للعفص لللب والبذور النتائج، يمكننا القول أن جميع مستخلصات من المركبات الفينولية في اللب والبذور لها نشاط مضاد للأكسدة هامة، ولذلك فإن هذه المركبات لديها القدرة على كس الجذور الحرة.

كلمات البحث: الخروب (سغونيا سليكا)، البذور-اللب، النشاط المضاد للأكسدة، DPPH، FRAP، β - كاروتين.

Summary:

Our choice of study is focused on a plant native to the mediterranean named Carob (*Cratonia siliqua*) belonging to the family Fabaceae. Pulp and carob the Tlemcen region has been the subject of our study in order to determine the yield and antioxidant activity of phenolic compounds. The latter yields: 20% for total polyphenols, 0.4% flavonoids and tannins pulp, yields of phenolic compounds seeds are: 7.4% for total polyphenols, 0.2% for flavonoids and 1.6% for tannins. The antioxidant activity of two parts (pulp and seeds) of the carob tree was assessed *in vitro* by three different tests are: the test of free radical scavenging DPPH test reduced iron FRAP and test discoloration of β -carotene. The results of the antioxidant activity obtained with the DPPH test is EC₅₀ = 9,77 mg/ml ; 0,07 mg/ml ; 0,71 mg/ml for total polyphenols, flavonoids; tannins successively pulps and seeds EC₅₀ = 0,56 mg/ml ; 0,64 mg/ml ; 4,41 mg/ml. With the FRAP test was recorded values of the anti-oxidative EC₅₀ = 5,42 mg/ml ; 0,027 mg/ml ; 0,25 mg/ml for total polyphenols, flavonoids, tannins pulps successively and seeds: 19,21 mg/ml ; 0,50 mg/ml ; 2,38 mg/ml. The test β -carotene, we found that the phenolic extracts of seeds and pulp tested effectively inhibit the oxidative degradation of β -carotene and the antioxidant activity register by that test is 3,38 mg/ml for flavonoids and 2,68 mg/ml for tannins pulps, grains : 39,63 mg/ml for total polyphenols; 5,51 mg/ml for flavonoids; and 77,90 mg/ml for tannins. From these results, we can say that all extracts of phenolic compounds in pulp and seeds have significant antioxidant activity, therefore these compounds have the ability to scavenge free radicals.

Keywords: Carob (*Cratonia siliqua*) , Pulp , seeds, antioxidant activity, DPPH, FRAP, β -carotene.