

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique Et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

جامعة امحمد بوقرة بومرداس

Université M'Hamed Bougara – Boumerdès



Faculté des sciences

Département de Biologie

Filière : Sciences Alimentaires– Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Nutrition et science des aliments

Thème

ETUDE DU POTENTIEL ANTIOXYDANT DES GRAINES DE CAROUBE

Présenté par :

- ↪ M^{lle} REFFAI Samia
- ↪ DELHOUM Abderaouf

Date de soutenance :15/07/2021

Composition du jury :

M^{me}YOUYOU

MCB. Univ. DeBoumerdes

Présidente

M^{me} BENAMROUCHE S.

MCA. Univ. DeBoumerdes

Promotrice

M^{me}LEFKIR S.

MCB.Univ. DeBoumerdes

Examinatrice

Année Universitaire 2020-2021

Remerciements

Nous remercions d'abord le bon dieu de nous avoir donné le courage, La force et la santé pour accomplir ce modeste travail ;

Nous tenons à remercier :

M^{me} BENAMROUCHE S, celle qui nous a donné de son mieux, notre promotrice pour ses pertinents conseils et ses orientations une simple reconnaissance de ce que vous avez fait pour que notre mémoire ait sa naissance.

Nos remerciements s'adressent également aux membres de jury M^{me} BOUCHNAK et M^{me} LEFKIRS, qui ont accepté de lire et d'évaluer ce mémoire

A Tout le personnel de Laboratoire de Contrôle de qualité et conformité MADI pour leurs orientations et leurs conseils durant ce stage

Ainsi qu'à tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin dans l'élaboration de ce mémoire.

REFFAI Samia

Et

DELHOUM Abderaouf

Dédicaces

*C'est avec une profonde gratitude et de sincères mots, que je dédie
ce modeste travail de fin d'études à **ma maman chérie**, et **mon cher papa**.*

A mes chers :

*Sœurs **Karima** et **Ibtissam** ;*

*À Mes frères **Mourad** et **Farid** ;*

*À ma nièce **Anaïs** et Mon neveu : **Mohamed Yacine***

*A ma belle-sœur **Samiha***

*Ainsi qu'à tous **mes amis(es)***

*A tous **mes enseignants** tout au long de mes études.*

*Sans oublier **toutes les personnes** que je porte dans mon cœur.*

*Je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé
et de bonheur.*

Samia Reffai

Dédicaces

Que ce travail témoigne de mes respects :

À mes parents :

Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.

Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux,

Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.

À ma sœur Nesrine et à Mes frèreslamine et islam.

À ma belle-sœur Selma

À ma nièce Sarah Mélina

*À mes amis Yacine hamza Yacine meziane Hocine bedroakramwail
Hussam Faouzi Fatah kadirou anis Soraya yousra Sabah et manelavec
vous je n'en ai que de bons souvenirs.*

À tous mes enseignants ;

*Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon
profond respect et ma loyale considération.*

*À tous mes collègues ; Ils vont trouver ici le témoignage d'une
fidélité et d'une amitié infinie.*

DelhoumAbderaouf

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
<i>Chapitre I. Partie théorique.....</i>	4
I.1. Activité Anti-oxydante.....	4
I.1.1. Stress oxydant	4
I.1.2. Espèces réactives d'oxygène et espèces réactives azotées	4
I.1.3. Conséquences cellulaires du stress oxydant	7
I.1.4. Mécanisme de neutralisation des radicaux libres	8
I.2. Graines de caroube	9
I.2.1. Taxonomie et description botanique du caroubier	9
I.2.2. Anatomie du fruit et des graines.....	12
I.2.3. Composition des graines	13
I.2.4. Utilisation.....	18
I.2.5. Production mondiale et algérienne du caroubier	19
<i>Chapitre II. Matériels et méthodes</i>	21
II.1. Collecte et préparation des échantillons	21
II.2. Méthodes d'analyses utilisées.....	22
II.2.1. Détermination quantitative des composés phénoliques.....	22
II.2.2. Activité anti-oxydante	23
II.3. Etude statistique.....	24
<i>Chapitre III. Résultats et discussions.....</i>	26
III.1. Teneurs en composés phénoliques	26
III.2. Activité anti-oxydante.....	27
<i>Conclusion</i>	31
<i>Références Bibliographiques</i>	33
<i>Annexe</i>	41
<i>Résumé</i>	43

Liste des abréviations

DPPH : 1,1-diphenyl 1-2-picrylhydrazyl

EAG : Equivalent Acide Gallique

EAT : Equivalent Acide tannique.ERA

ERN : Espèces Réactives Azotées.

ERO : Espèces réactives d'oxygène.

EQ : Equivalent Qercetine.

RL : Radicaux Libres.

SOD : Super Oxyde Dismutase.

Liste des figures

Figure 1 : Balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants.	4
Figure 2: Production des radicaux libres oxygénés et azotés et autres ERO impliquées en biologie.....	5
Figure 3: Action des antioxydants enzymatiques au cours du métabolisme des dérivés d'ERO	8
Figure 4: Structure de quelques anti-oxydants.....	9
Figure 5: Photographie du caroubier.....	10
Figure 6: Photographiedes feuilles de caroubier.....	10
Figure 7: Fleurs de caroubier.	11
Figure 8: Fruits du caroubier (gousses vertes (a) et gousses murs (b))	11
Figure 9: Coupe longitudinale d'une gousse de caroube.	12
Figure 10: Graines du caroubier et leur poudre.....	12
Figure 11: Coupe transversale d'une graine de caroube.....	13
Figure 12: Principaux acides hydroxycinamiques (A) et hydroxybenzoïquen (B) de la caroube.	15
Figure 13: Structure de base des flavonoïdes.....	16
Figure14: Flavonoïdes aglycones de la caroube.	17
Figure 15: Flavonoïdes glycosylés identifiés dans la caroube.	17
Figure 16: Photographie des graines de caroube.....	21
Figure 17: Photographie des gousses de caroube.....	21

Liste des tableaux

Tableau 1: Origine et propriétés des espèces réactives de l'oxygène	6
Tableau 2: Origine et propriétés des espèces réactives azotées.	6
Tableau 3: Composition chimique de la caroube.	14
Tableau 4: Teneurs en composés phénoliques des graines de caroube.....	26
Tableau 5: Pouvoir réducteur et activité antioxydante contre le radical DPPH de l'extrait organique aqueux des graines de caroube et des standards (quercetineet acide gallique)	28

INTRODUCTION

Introduction

L'oxygène est une molécule indispensable à la vie. En effet, il permet l'apport d'énergie à l'être humain par son rôle d'accepteur final d'électron au sein de la mitochondrie mais il est fortement impliqué dans l'initiation du stress oxydant. Ce dernier correspond à un déséquilibre entre le taux de production des oxydants et celui de leur dégradation. Le stress oxydant peut être délétère et entraîner des pathologies variées dans certaines situations (l'athérosclérose, les cancers, le diabète de type 2, les maladies neurodégénératives, les rhumatismales et autres) (**Lahlou et Bourhim, 2009**). C'est pour cela que la recherche sur les antioxydants dans les plantes s'est beaucoup développée ces dernières années, afin de permettre de trouver les meilleurs antioxydants possibles dans l'espoir de protéger notre santé et même guérir ces différentes maladies.

Le caroubier est un arbre fruitier et forestier, originaire des zones arides et semi-arides de la méditerranée et de la péninsule arabique (**Mahdad, 2013**). Le caroubier est une essence agro-sylvo-pastorale offrant de nombreux avantages et intérêts socio-économique, écologique, industriel et ornementale indiscutable. Il est considéré comme l'un des arbres les plus performants puisque toutes ses parties (feuilles, fleurs, fruits, bois, écorces et racines) sont utiles et ont des valeurs dans plusieurs domaines (**Benmahioul et al., 2011**). Le caroubier est utilisé non seulement dans l'alimentation animale mais aussi dans la médecine et l'alimentation humaine. La farine de caroube est employée dans l'industrie pharmaceutique, principalement contre les troubles gastro-intestinaux (diarrhées) et contre la tuberculose pulmonaire et les affections des bronches (**Sallouh et Nouioui, 2019**). La farine est également employée surtout en agro-alimentaire comme ingrédient pour la préparation de certains produits, tels que les gâteaux, les bonbons, les crèmes glacées, les sauces et mayonnaise et comme substituant du cacao pour la fabrication du chocolat (**Serairi-Béji et al., 2000**). On tire de la caroube un autre produit essentiel qui est la gomme, extraite à partir de l'albumen des graines. Cette dernière est utilisée dans l'agro-alimentaire comme épaississant connu sous le code normalisé E410, elle substitue la pectine et la gélatine (**Benmahioul et al., 2011**).

En Algérie, le caroubier reste très négligé et n'a pas encore eu la place qu'il mérite dans les programmes de reboisement et ce, malgré les retombées socio-économiques que cette plante peut avoir à l'échelle nationale et surtout régionale et cela malgré l'engouement et l'intérêt qui lui sont portés depuis quelques décennies par les industriels. Peu d'études ont été

réalisées, jusqu'à présent, sur les graines de caroubes, notamment sur leurs propriétés anti oxydantes. Les thématiques traitées concernent particulièrement l'extraction et l'identification des gommés, l'analyse de la composition chimique, la détermination de la valeur énergétique et du potentiel antimicrobien de la pulpe du fruit. Notre intérêt pour ce produit vient suite à ces constatations et le présent travail consiste à combler le manque d'information sur les propriétés anti oxydantes des graines. Notre travail a un double objectif, d'une part il vise la valorisation du caroubier par la valorisation de ses graines et d'autres part recherche les puissants antioxydants possibles dans l'espoir de protéger notre santé et même guérir les différentes maladies.

Le présent travail est divisé en deux parties :

- Une partie théorique qui comporte des généralités et des définitions sur l'activité Anti-oxydante, ainsi des généralités sur le caroubier et des notions sur la composition chimique et anti oxydante de ses graines.
- Une partie pratique qui précise la démarche expérimentale et donne les méthodes d'analyses et les résultats correspondants.

CHAPITRE I : PARTIE THEORIQUE

I. Partie théorique

I.1. Activité Anti-oxydante

I.1.1. Stress oxydant

Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants. Ce déséquilibre peut être dû à un déficit nutritionnel en antioxydants, à une surproduction endogène ou à une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (Atamer, 2008).

La concentration des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est régulée par l'équilibre entre leur taux de production et leur taux d'élimination par les systèmes antioxydants. On dit que la balance antioxydants/pro-oxydants (balance rédox) est en équilibre. Le déséquilibre de la balance est provoqué soit par une production excessive d'ERO et/ou par une diminution des capacités Anti-oxydante (Figure1) (Migdal et Serres, 2011).

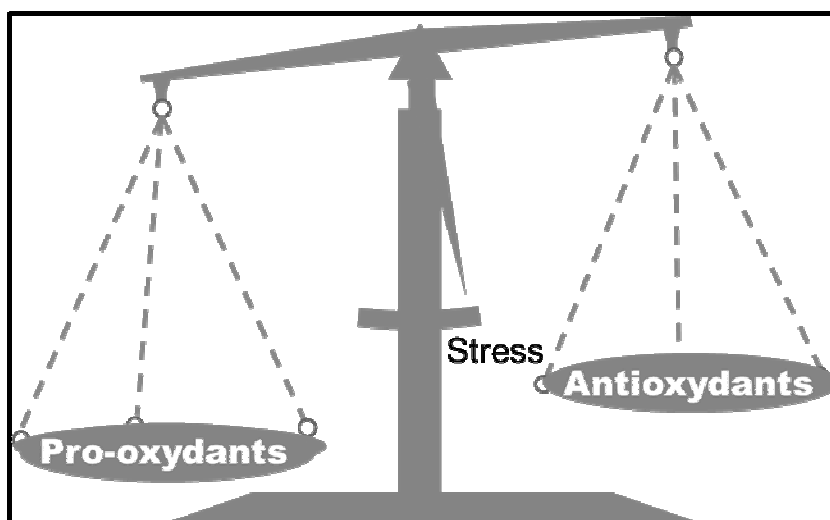


Figure1 : Balance d'équilibre entre les systèmes pro et antioxydants (Atamer,2008).

I.1.2. Espèces réactives d'oxygène et espèces réactives azotées

Les espèces réactives (pouvant être de nature radicalaire ou non) se divisent en deux catégories principales : d'une part les ERO et d'autre part les espèces réactives de l'azote (ERA). La figure 2 résume la production des radicaux libres oxygénés et azotés et les autres espèces réactives d'oxygène impliquées en biologie.

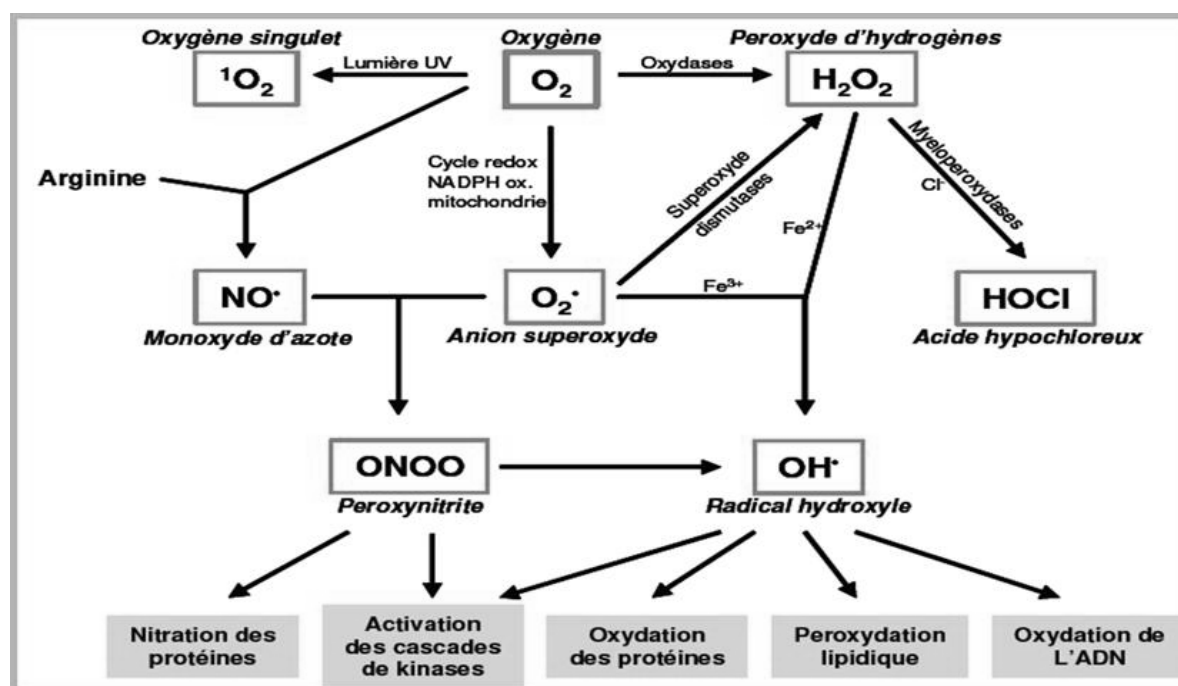


Figure2: Production des radicaux libres oxygénés et azotés et autres ERO impliqués en biologie (Fang et al., 2002).

I.1.2.1. Radicaux libres

Les radicaux libres constituent une proportion importante des ERO. Un radical libre est défini comme une espèce chimique (atome ou molécule) possédant un ou plusieurs électrons célibataires sur sa couche externe de valence lui conférant une grande instabilité et donc une grande réactivité (Lobo et al., 2010).

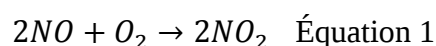
I.1.2.2. Espèces réactives de l'oxygène (ERO)

L'appellation espèces réactives de l'oxygène (ERO) inclut les radicaux libres de l'oxygène (Anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), les radicaux hydroxyles ($OH^\bullet$) et certains dérivés oxydés non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Tableau 1, page 6).

Ces espèces sont responsables, d'une manière directe ou indirecte, de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acides nucléiques, protéines, lipides...), pouvant affecter considérablement les mécanismes cellulaires (Badeau, 2006).

I.1.2.3. Espèces réactives azotées (ERA)

Les ERA sont produites lorsque l'oxyde nitrique (NO) rencontre des ERO (Auger et al., 2011). Le NO se transforme en dioxyde d'azote (NO_2) selon la réaction suivante :



Le dioxyde d'azote peut donner du trioxyde d'azote (N_2O_3) et aboutir à un ion nitrate stable (NO_3^-) (Favier 2003). Le monoxyde d'azote forme avec l'ion superoxyde le peroxynitrite

(ONOO). Ce dernier est responsable de l'oxydation de nombreuses molécules (protéines, lipides, acides nucléiques) (Tableau 2) (Crépel et Lemaire, 1995).

Tableau 1: Origine et propriétés des espèces réactives de l'oxygène (Migdal et Serres, 2011).

Espèce réactive	Réaction de formation	Propriétés
L'anion Superoxyde ($O_2^{\cdot -}$)	Formé par la réduction mono électrique de l'oxygène : addition d'un seul électron $O_2 + 1 e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$	C'est le radical le moins réactif mais le précurseur des autres ERO (Koechlin-Ramonatx, 2006)
Le Peroxyde d'Hydrogène (H_2O_2)	Le H_2O_2 est produit à partir de l'anion superoxyde : réaction catalysée par la superoxyde dismutase (Raccab, 2004).	Sa majeure partie de toxicité provient de sa capacité à générer le radical hydroxyle (OH°) (Gardès-Albert et al., 2003)
Le Radical Hydroxyle (OH°)	Formé par la réaction de Fenton à partir d' H_2O_2 en présence de métaux de transition (Goudablet al., 1997). $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^\circ + Fe^{3+} + OH^-$	Le OH° est le radical le plus dangereux pour l'organisme (Gardès-Albert et al., 2003).

Tableau 2: Origine et propriétés des espèces réactives azotées (Migdal et Serres, 2011).

Espèce réactive	Réaction de formation	Propriétés
Le monoxyde d'azote (NO)	Le NO est formé à partir de l'un des deux atomes d'azote terminal du groupement guanidine de la L'arginine, d'une part, et de l'oxygène moléculaire (O_2) d'autre part en présence de cofacteur : (NADH, H^+) la réaction est catalysée par les NO synthase (NOS) (Sabry et al., 1996).	Le NO est un radical libre qui est surtout réputé pour ses propriétés physiologiques (agit sur le tonus vasculaire) (Barouki, 2006).
Le peroxynitrite (ONOO $^-$)	En absence d'une quantité suffisante d'arginine, les NOS produisent de $O_2^{\cdot -}$ plutôt que du NO° . L' $O_2^{\cdot -}$ produit lie le NO° pour former du peroxynitrite (Massion et al., 2002).	Très réactif et sans doute responsable d'un stress oxydant. (Massion et al., 2002).

I.1.3. Conséquences cellulaires du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides) mais aussi, des lésions secondaires, dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés anormaux par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent aussi être des auto-anticorps créant une troisième vague d'attaque chimique (**Favier, 1995**).

I.1.3.1. Conséquences biologiques

Les conséquences sont extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines d'adhésion. Des stress moyens faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose. Des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates. De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant : mutation, carcinogénèse, malformation des fœtus, dépôt de protéines anormales, fibrose, formation d'auto-anticorps, dépôt de lipides oxydés...etc. (**Favier, 2003**).

I.1.3.2. Conséquences biochimiques

L'action du stress sur les acides gras concerne plutôt ceux des membranes cellulaires (acides gras poly-insaturés) qui sont plus sensibles à la peroxydation lipidique. Les conséquences de cet effet sont : la rigidification et la diminution de la perméabilité membranaire (**Cau et al., 2012**) ainsi que le dépôt des lipides oxydés dans les vaisseaux (**Delattre et al., 2007**).

Les acides nucléiques sont particulièrement sensibles à l'action des radicaux libres. L'attaque de l'ADN va entraîner la modification des bases puriques et pyrimidiques ou des cassures au niveau de la double hélice et des mutations ponctuelles, qui peuvent avoir de graves conséquences sur la synthèse des protéines et sur la transmission de l'intégrité du patrimoine génétique (**Thanan et al., 2014**).

Les protéines peuvent être attaquées par les radicaux libres même à des concentrations très élevées en antioxydants (vitamine E, vitamine C, ...etc.), alors que dans les mêmes conditions, le processus de lipo-péroxydation est presque supprimé (**Dean, 1991**). De plus, l'oxydation des protéines apparaît de façon précoce par rapport à la peroxydation lipidique ; non seulement, les protéines oxydées sont affectées dans leurs fonctions, mais également dans

leur structure. Par exemple, les protéines altérées ne sont plus reconnues par leurs récepteurs ou bien leurs activités enzymatiques sont diminuées (Davies, 1987).

I.1.4. Mécanisme de neutralisation des radicaux libres

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies Anti-oxydante pour contrôler le niveau des espèces réactives. Les radicaux libres produits lors d'une oxydation sont généralement neutralisés par des systèmes de défenses impliquant des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques.

Un antioxydant est toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration par rapport au substrat oxydable, retarde ou empêche de façon significative l'oxydation de ce même substrat. On distingue deux catégories d'anti-oxydants : les anti-oxydants enzymatiques (la super oxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase et la réductase) et les antioxydants non enzymatiques (composés phénolique, vitamine C, vitamine E, ...etc.)(Gutteridge et Halliwell, 2000).

I.1.4.1. Anti-oxydants enzymatiques

Les organismes développent des systèmes d'action antioxydant pour faire face aux ERO. Ces systèmes visent à éliminer les ERO et les catalyseurs de leur formation et augmentent l'activité des systèmes de réparation et éliminent les molécules endommagées (Zekri, 2017). La figure 3 résume l'action des antioxydants enzymatiques vis-à-vis des ERO.

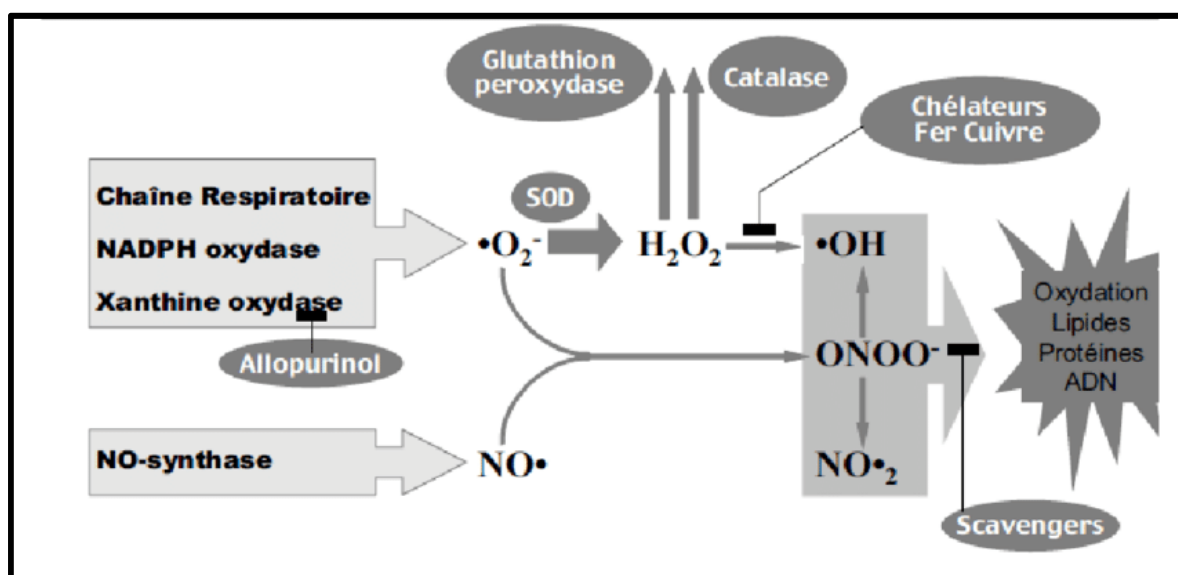


Figure 3: Action des antioxydants enzymatiques au cours du métabolisme des dérivés d'ERO (Chaouche, 2020)

I.1.4.2. Anti-oxydants non enzymatiques

Ce sont des antioxydants naturels capables de prévenir les dommages oxydatifs. Ils peuvent se comporter comme des piègeurs des radicaux libres. Ce type d'antioxydants possède un avantage considérable par rapport aux antioxydants enzymatiques. Du fait de leur petite taille, ils peuvent en effet pénétrer facilement au cœur des cellules et se localiser à proximité des cibles biologiques. Ce type d'antioxydants regroupe un grand nombre de substances hydrophiles ou lipophiles et ils sont en partie produits par l'organisme au cours de processus biosynthétiques. Les plus importants comprennent majoritairement l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E), les caroténoïdes (β -carotène (provitamine A)) et les composés phénoliques (Figure4) (McCallt et Frei, 1999).

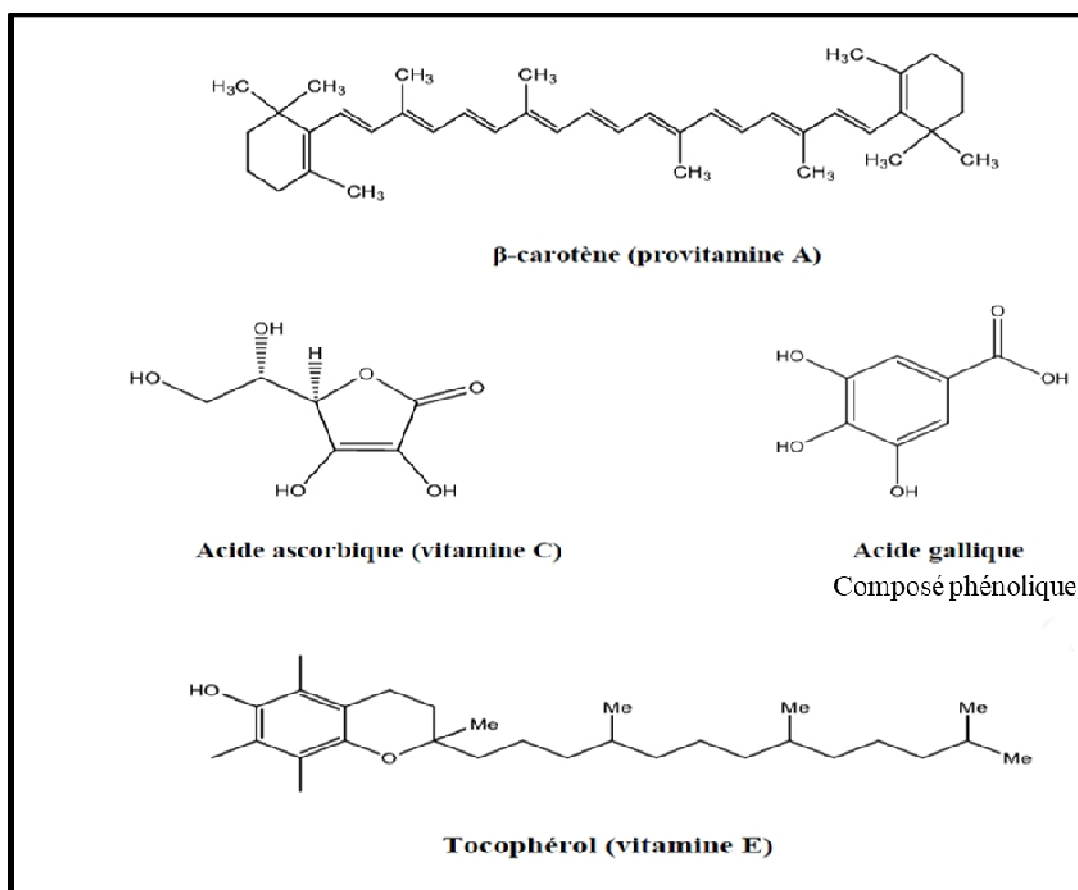


Figure4:Structure de quelques anti-oxydants (McCall et Frei, 1999)

I.2. Graines de caroube

I.2.1. Taxonomie et description botanique du caroubier

Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) appartient à la famille des *Fabaceae*, sous famille des *Caesalpinoïdæ* qui fait partie de l'ordre des *Fabales* et la classe des *Magnoliopsida* (Quezel et Santa, 1962). Le caroubier est un arbre de croissance lente et d'une

longévité dépassant souvent 200ans (**Rejeb et al.,1995 ; Batlle et al., 1997**).Il peut atteindre 7 à 20m de hauteur et une circonférence à la base du tronc de 2 à 3m. Il a une écorce lisse et grise lorsque la plante est jeune et brune rugueuse à l'âge adulte. Son bois de couleur rougeâtre est très dur (**Ait-Chitt et al., 2007**). Les racines de cette plante sont fortes et envahissantes et peuvent atteindre une taille allant de 8 à 15 m(Figure5) (**Correia et Martins-Loucao, 2005**).



Figure5: Photographie du caroubier.

Les feuilles persistantes, de longueur de 10 à 20 cm, se caractérisent par un pétiole sillonné sur la face interne et un rachis portant de 8 à 15 folioles, opposées, de 3 à 7 cm (Figure6).Elles sont coriaces, entières, ovales à elliptiques, paripennées, légèrement échancrées au sommet avec une couleur vert noir brillante à la face supérieure et vert pâle à la face inférieure. 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(**Ait-Chitt et al., 2007**).



Figure6: Photographies des feuilles de caroubier

Les fleurs sont petites et nombreuses, de 6 à 12 mm de long. Elles sont disposées en spirale le long de l'axe de l'inflorescence en grappes supportées sur des éperons de vieux bois et même sur le tronc. Ils sont pentamères et symétriques avec calice sans corolle placées sur un court pédoncule. Le calice est en forme de disque, vert rougeâtre et porte les nectars (Figure 7) (Tucker., 1992 ; Custodio et al., 2004). Le fruit du caroubier, appelé caroube, est une gousse indéhiscente à bords irréguliers, de forme allongée, rectiligne ou courbée, atteignant de 10 à 20 cm de longueur, de 1,5 à 3 cm de largeur et de 1 à 2,5 cm d'épaisseur (Figure 8). D'abord, Il est vert puis brun, et, au moment de la maturité, brun foncé à noir. Le nombre de fruit résultant de chaque inflorescence est variable selon la variété et il est généralement compris entre 1et 6 gousses (Melgarejo et Salazar, 2003).



Figure 7: Fleurs de caroubier (Custodio, 2004).



(a)



(b)

Figure8: Fruits du caroubier (gousses vertes (a)et gousses murs(b))
(Ait Chitt et al., 2007).

I.2.2. Anatomie du fruit et des graines

La gousse de caroube est composée de trois parties : l'épicarpe, le mésocarpe et les graines. Elle est séparée à l'intérieur par des cloisons pulpeuses transversales et renferme de 4 à 16 graines (Figure9)(Rejeb,1995 ; Ait Chitt et al.,2007).

- **L'épicarpe** ou **L'epicarp** est la partie la plus externe du fruit elle est de nature fibreuse et colorée.
- Le **mésocarpe** ou **Lapulpe**, est une partie charnue et riche en sucres. Il représente environ 70 à 95% du fruit entier ;
- **L'endocarpe** : est une partie fibreuse elle recouvre l'intérieur du fruit en le divisant en segments ou loges carpellaires où se situent les graines (**caja, 1985**).

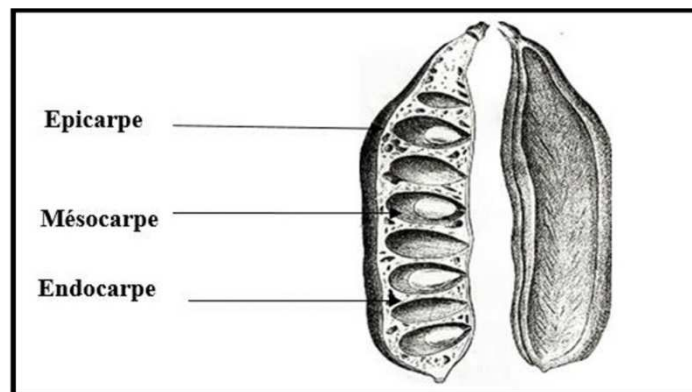


Figure9: Coupe longitudinale d'une gousse de caroube (Ait Chitt, 2009).

Les graines du caroubier sont petites et aplaties, d'une forme presque ovale, avec un pôle basal tronqué et écrasé en zone apicale (Figure10). Son tégument est lisse, dur, de couleur brune rougeâtre et brillant. Les graines présentent des dimensions de 8 à 10mm de long sur 6 à 8mm de largeur avec 3 à 5mm d'épaisseur (Albanell,1990).



Figure10: Graines du caroubier et leur poudre.

La graine du caroubier est composée de trois parties (Figure11) :

- **Episperme** ou **tégument** : il recouvre la graine. Il est constitué principalement de la cellulose, de la lignine et des tanins. L'épisperme se compose de deux enveloppes distinctes, l'une externe appelée *testa*, colorée et dure et l'autre interne nommée *tegmen* qui est plus blanche et moue. Le tégument représente 30 à 33% de la graine.

- **Endosperme** ou **albumen** : Il se situe sous l'épisperme et constitue le tissu de réserve pour la germination de l'embryon. Économiquement, c'est la partie la plus intéressante de la graine grâce à sa teneur élevée en galacto-mannane ou gomme de caroube. L'endosperme représente 42 à 46% de la graine.

- **Germe** ou **embryon (radicelle)** : Il représente 23 à 25 % de la graine (Melgarejo et Salazar, 2003).

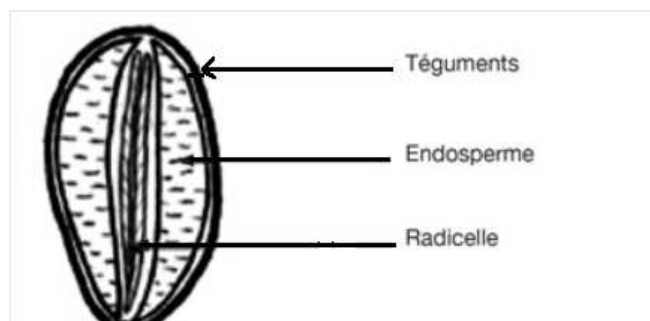


Figure11: Coupe transversale d'une graine de caroube (Melgarejo et Salazar, 2003).

I.2.3. Composition des graines

I.2.3.1. Composition chimique

La caroube est pauvre en minéraux, en fibres et en protéines, par contre elle contient une quantité appréciable de lipides (Bouzouita et al., 2007) (Tableau3). La gomme de caroube issue de l'endosperme constitue le tiers du poids total de la graine. Cent kilogrammes de graines de caroube produisent en moyenne 20 kilogrammes de gomme sèche pure (Jones, 1953). Les gommes de caroube sont formées par un enchaînement linéaire d'unités β -D mannose liées en (1-4) avec des branchements constitués d'une seule unité α -D galactose liée en (1-6). La gomme de caroube comporte en moyenne une unité galactose pour quatre mannoses alors que ce rapport est de 1 à 2 pour la gomme guar et d'environ 1 à 3 pour la gomme tara.

Tableau 3: Composition chimique de la caroube (Gillet et al., 2014 ; Goulas et al.,2016).

La pulpe 90% (Ayaz et al., 2007 ; Goulas et al., 2016).	La graine 10% (Gillet, 2014)
Glucide 48 à 58%	L'enveloppe tégumentaire (Cuticule) 30-35%
Protéines 1-2%	
Matières grasses 0.5-0.7%	
Cellulose et hémicellulose 18%	L'endosperme (albumen) 40 -50%
Minéraux (Ca. Mg. K. P)	
Pectines et fibres 30-40%	L'embryon (germe) 15-30%
Poly phénols 16-20%	

I.2.3.2. Composés phénoliques de la caroube

La caroube est importante en raison de sa teneur élevée en hydrates de carbone et en antioxydants. Les antioxydants les plus connus sont les polyphénols. Ces derniers constituent 2 à 20%, de la matière sèche et sont essentiellement des tanins condensés, des flavonoïdes et des ellagitannins (Owen et al.,2003 ; Makris et Kefalas,2004).

I.2.3.2.1. Définition

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux. Ils appartiennent à leur métabolisme secondaire et participent à leur défense contre les agressions environnementales (Mmiddleton,2000). Ils possèdent au moins un noyau phénolique à six carbones, lié au moins à un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Bruneton,1999). La biosynthèse des polyphénols est assurée par deux voies principales : La voie du Shikimate, responsable de la synthèse des acides aminés phénylalanine et tyrosine et après transamination et désamination aboutit aux acides cinnamiques (Knaggs, 2003). Également la voie du polyacétate (condensation de molécules d'acétylCoenzyme) qui aboutit à des composés tels que les naphthoquinones (Bruneton,1999 ; NaczketShahidi,2004).

Ce sont des molécules hydrosolubles, ils ont divers effets sur la physiologie végétale de part leurs actions antibactérienne et antifongique. Ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes, etc...) et indirectement à la reproduction. (Klenow et al., 2009).

I.2.3.2.2. Classification

La classification des polyphénols est basée sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux. On peut distinguer deux grands groupes : les composés phénoliques simples et les composés phénoliques complexes (Boros, 2010).

I.2.2.3.2.1 Composés phénoliques simples

a. Acides phénoliques

Ce sont des composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. Ils sont représentés par deux sous-classes, les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque ($C_6 - C_1$) et de l'acide hydroxycinnamique ($C_6 - C_3$) (Figure 12) (Thompson et Mottola, 1984).

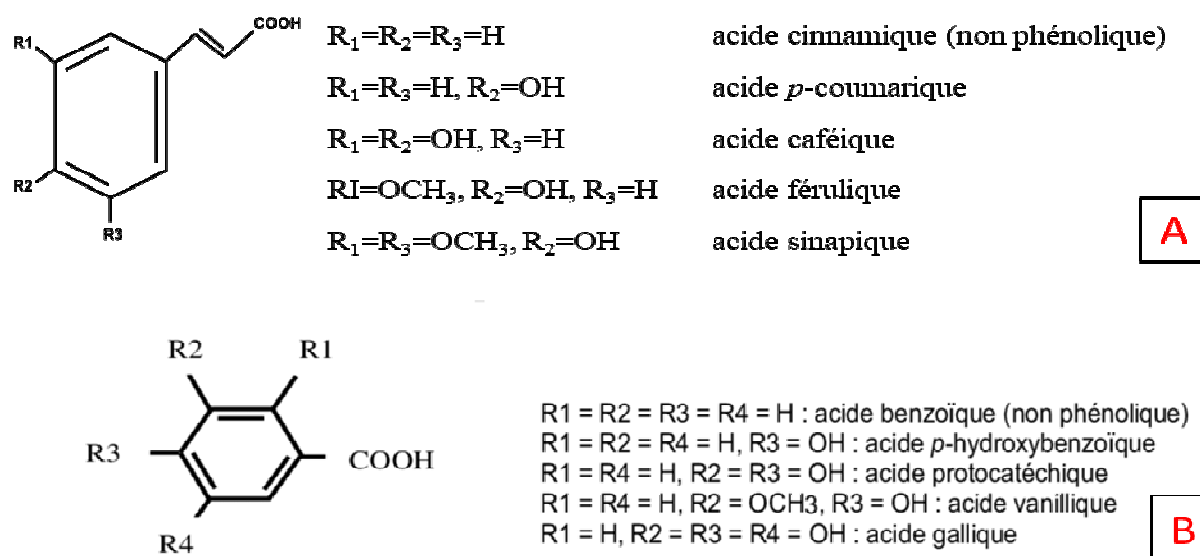


Figure 12: Principaux acides hydroxycinnamiques(A) et hydroxybenzoïques(B) de la caroube (Harborne, 1989 ; Macheix et al., 1990 ; Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

○ **Activité Anti-oxydante des acides phénoliques :** les acides phénoliques agissent comme donneurs de protons ou d'électrons et chélatent les métaux de transition. La position et le degré d'hydroxylation ainsi que, la méthylation du cycle aromatique sont des facteurs importants qui déterminent l'activité Anti-oxydante des acides cinnamiques et de leurs dérivés (Harborne, 1989).

b. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés possédant un squelette de base à quinze atomes de carbone, constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C₆-C₃-C₆(Figure13) (Souza, 2004).

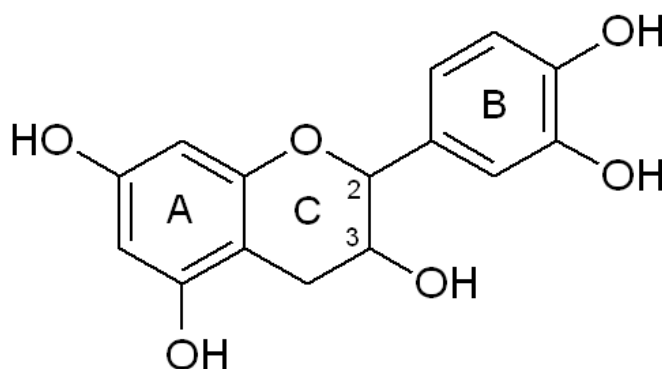


Figure 13: Structure de base des flavonoïdes (Souza, 2004).

Les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les flavanols et les anthocyanidines (Pietta, 2000; Gramza et Korczak, 2005). Les flavonoïdes se rencontrent sous forme libre (aglycone) et/ou sous forme glycosylée (Sakihama et al., 2002 ; Ghedira, 2005). Les flavonoïdes aglycones de la caroube sont représentés par les flavones (apigénine, chrysoéryol ou lutéoline 3',5'-diméthylether, tricétine 3',5'-diméthylether, lutéoline), les flavonols (quercétine, isorhamnétine ou quercétine 3'-méthylether, myricétine, kaempférol), les flavanones (naringénine) et les isoflavones (génistéine) (Owen et al., 2003) (Figure 14).

Les flavonoïdes se rencontrent également sous formes O- et C-hétérosides. Ils agissent généralement des motifs flavonol et flavone qui sont substitués par un glucide en position 3 et 5, respectivement. La partie osidique consiste en un résidu de D-glucose, D-galactose, D-allose ou pentose (L-arabinose, L-rhamnose, D-xylose) (Bruneton, 1999). Les flavonoïdes glycosylés identifiés dans la caroube (Figure 15) sont représentés par le kaempférol-3-O- α -L-rhamnoside, la quercétine-3-O- α -L-rhamnoside, la quercétine arabinoside, la myricétine-3-O- α -L-rhamnoside et la myricétine glucoside (Owen et al., 2003).

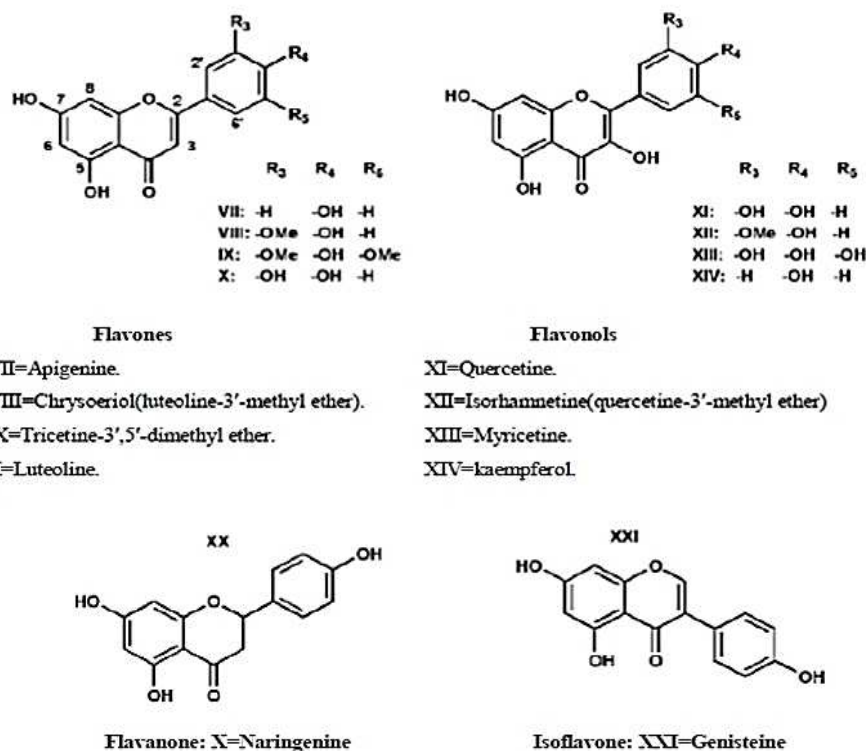


Figure14: Flavonoïdes aglycones de la caroube (El Gharra, 2009).

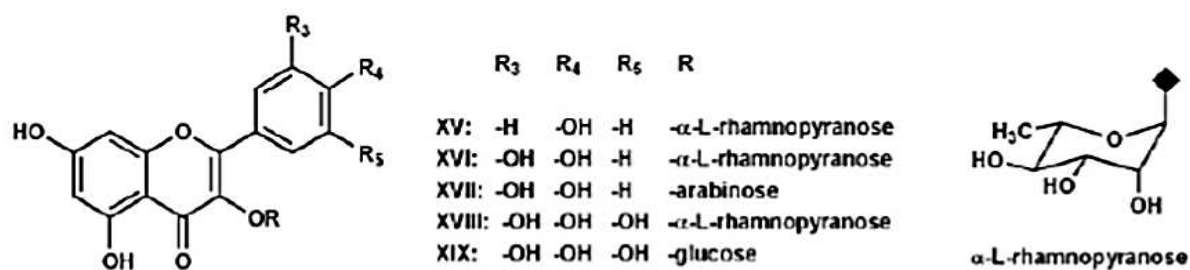


Figure 15: Flavonoïdes glycosylés identifiés dans la caroube (Manach et al., 2004).

○ **Activité Anti-oxydante des flavonoïdes** : les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant : par capture directe des radicaux, par chélation des métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton) et par inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ERO (Oikawa et al., 2001).

I.2.2.3.2.2 Composés phénoliques complexes

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles (Karamac et Pegg, 2009). Sur le plan structural, les tanins sont divisés en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Monteiro et al., 2007).

a. Tanins hydrolysables :

Ce sont des esters du D-glucose et de l'acide gallique ou de ses dérivés, en particulier l'acide ellagique. Ces substances sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique (tannase) (Nagata et al., 1992).

b. Tannins condensés :

Les tanins condensés ou pro-anthocyanidols résultent de la polymérisation de molécules élémentaires de flavanes (flavanes ol-3, flavane ol-4, flavane diol – 3,4). Ils sont désignés aussi sous le nom de tanins « catéchiques » (Bruneton., 1997). En s'hydrolysant, les tannins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénoliques comme c'est le cas pour les tanins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines (Andersen et Markham, 2006).

○ **Activité Anti-oxydante des tanins** : Le potentiel antioxydant des tanins est lié à leur capacité à piéger les RL, l'inhibition des enzymes oxydantes et la fixation des ions métalliques intervenant dans la réaction de fenton et la production des espèces réactives (Oikawa et al., 2001).

I.2.4. Utilisation

Les graines de caroube sont bien appréciées et recherchées pour leurs qualités et multiples usages industriels. L'utilisation possible, dans l'industrie alimentaire, de polyphénol antioxydant contenu naturellement dans l'enveloppe tégumentaire a soulevé d'énormes intérêts au même titre que la production industrielle de gomme de caroube (Batista et al., 1996 ; Makris et Kafalas, 2004). La gomme issue de l'endosperme constitue le 1/3 du poids

total de graine. Cette gomme mucilagineuse est utilisée dans plusieurs produits commerciaux comme agent stabilisateur, épaississeur, agglomérant et gélifiant (**Batle, 1997**). En plus, elle est utilisée en industrie alimentaire pour la fabrication d'un grand nombre de denrées alimentaires : crème glacée, soupe, sauce, biscuit, tourte, confiserie, produits de boulangerie et nourriture des animaux. Par ailleurs, son application dans les domaines techniques est large. Elle est utilisée en imprimerie, photographie, textile, matière plastique, encre, cirage, matière adhésive et pharmaceutique et cosmétique (**Batle et al., 1990**).

I.2.5. Production mondiale et algérienne du caroubier

Selon les statistiques de la **FAO (2020)**, la production mondiale totale de la caroube est estimée à 144.960 tonnes en 2018. La superficie récoltée est de 42.866 ha avec un rendement annuel de 33.817 hg/ha pour l'année 2018.

En Algérie, le caroubier occupe une superficie de 789 ha produisant 2.880 tonnes avec un rendement de 36.507 hg/ha pour l'année 2018. L'Algérie a enregistré une diminution de 40,35 % par rapport à l'année précédente (**FAO, 2020**).

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

II. Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire de recherche : Technologies Douces, Valorisation, Physicochimie des matériaux biologiques et Biodiversité à l'université de Boumerdès et au laboratoire MADI situé à Corso-Boumerdès.

II.1. Collecte et préparation des échantillons

Le matériel végétal, constitué de gousses de caroubier mûres, a été collecté dans une forêt à Bouzagza (région située à la wilaya de Boumerdès). La récolte a été faite d'une manière aléatoire à partir de plusieurs arbres en mois d'Aout 2020 (Figures 16 et 17).

Au laboratoire, nous avons séparé les pulpes des graines. Ces dernières ont été broyées, et conservées à l'abri de la lumière dans des flacons en verres fumés pour des analyses ultérieures.



Figure 16: Photographie des graines de caroube



Figure 17: Photographie des gousses de caroube

II.2. Méthodes d'analyses utilisées

II.2.1. Détermination quantitative des composés phénoliques

II.2.1.1. Extraction

10g de poudre sont extraits par macération au moyen de 100 ml de solvant (mélange de solvant V/V : méthanol 80% et acétone 70%) à la température ambiante pendant 24 heures sous agitation magnétique. L'extrait est filtré puis concentré dans une étuve dotée d'aération à 40 °C jusqu'à évaporation complète du solvant organique puis reconstituer dans du méthanol pur.

II.2.1.2. Dosage des poly phénols totaux

Le dosage des composés phénoliques a été réalisé par la méthode de (**Meyers et al., 2003**). 100 μ l d'extrait sont mélangés avec 750 μ l de carbonate de sodium et 750 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu. Après 2 heures d'incubation (à la température ambiante et à l'obscurité) les absorbances sont mesurées à 750 nm. La courbe d'étalonnage est préparée de la même manière que l'extrait, en utilisant l'acide gallique comme standard (Annexe Fig. 1). La concentration moyenne de l'extrait en polyphénols totaux est exprimée en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/g MS).

II.2.1.3. Dosage des flavonoïdes et des flavonols

Les teneurs en flavonoïdes sont déterminées selon la méthode de (**Bahorun et al., 1996**). 1ml d'extrait est mélangé avec 1ml d'une solution méthanolique de chlorure d'aluminium hydraté (AlCl_3 , 6 H_2O). Après 10 min de réaction à la température ambiante et à l'obscurité, les absorbances sont mesurées à 430 nm. La concentration en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage préparée de la même manière que l'extrait, en utilisant la quercétine comme standard (Annexe ; Fig. 2). La teneur moyenne en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

Les teneurs en flavonols sont déterminées selon la méthode de (**Kumaran et Karunakaran, 2007**). 1ml d'extrait est mélangé avec 1ml d'une solution éthanolique de chlorure d'aluminium hydraté et 1.5 ml d'acétate de sodium. Après 02h30 de réaction à 20°C et à l'obscurité, les absorbances sont mesurées à 440 nm. La concentration en flavonols est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage préparée de la même manière que l'extrait,

en utilisant la quercétine comme standard (Annexe ; Fig. 3). La teneur moyenne en flavonols est exprimée en milligramme équivalent de quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/g MS).

II.2.1.4. Tanins hydrolysables

Les teneurs en tanins hydrolysables sont déterminées selon la méthode de (**Mole et Waterman, 1987**). La méthode repose sur l'aptitude des tanins à réagir avec le chlorure ferrique et former un complexe de couleur rouge violette.

1ml d'extrait est mélangé avec 3,5ml de réactif de chlorure ferrique. Les absorbances sont mesurées à 660 nm, 15 secondes après l'addition du réactif.

La courbe d'étalonnage est préparée de la même manière que l'extrait, en utilisant l'acide tannique comme standard (Annexe, Fig. 4). La concentration moyenne de l'extrait en tanins hydrolysables est exprimée en milligramme équivalent d'acide tannique par gramme de matière sèche (mg EAT/g MS).

II.2.2. Activité Anti-oxydante

II.2.2.1. Méthode au DPPH

900 µl de la solution d'extraits(1mg/ml) ou standards (quercétine et acide gallique à 40µg/ml) sont ajoutés à 900 µl DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif, contenant uniquement la solution de DPPH, est mesurée à 517 nm (**Brand-Williams et al., 1995**). L'activité anti radicalaire est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité scavenger (\%)} = [1 - (\text{Abs échantillon}) / \text{Abs contrôle}] \times 100.$$

II.2.2.2. Méthode au ferricyanure

500 µl des solutions d'extraits (1 mg/ml) ou standards (quercétine et acide gallique à 20µg/ml) sont mélangés avec 1.25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium (K₃Fe(CN)₆) et 1.25 ml d'un tampon phosphate (0.2M, pH 6,6). Le mélange est incubé à 50°C pendant 20 min. Après refroidissement, 1.25 ml d'une solution d'acide trichloroacétique sont ajoutés. La solution est centrifugée à 3000 t/min pendant 10 min. Le surnageant (1.25 ml) est mélangé à 1.25ml d'eau distillée puis 250 µl de chlorure de fer. L'absorbance est mesurée à 700 nm(**Oyaizu, 1986**).

II.3. Etude statistique

L'analyse statistique des résultats est réalisée au moyen du logiciel STATISTICA 5.5 et le degré de signification est pris à la probabilité $p \leq 0.05$. Nous avons procédé à une analyse de la variance à un facteur suivie d'un test de Tukey. Toutes les données représentent la moyenne des trois essais $\pm$ écart type.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSIONS

III. Résultats et discussions

III.1. Teneurs en composés phénoliques

Les résultats du tableau 4 montrent que les teneurs en polyphénols totaux des graines de caroube analysées sont estimées à 283,68mgEAG/g. Les résultats montrent également que la teneur en flavonoides est quatre à cinq fois plus élevée que celle des tanins hydrolysables (12,65mg EQ/g contre 2,79mg EAT/g) et que la classe des flavonols représente le quart des flavonoides totaux.

Tableau 4: Teneurs en composés phénoliques des graines de caroube

Total phenol (mg EAG/g)	Flavonoids (mg EQ /g)	Flavonols (mg EQ /g)	Tanins hydrolysables (mg EAT/g)
283,68	12,65	3,23	2,79
±	±	±	±

EAG : Equivalent Acide Gallique, EQ : Equivalent Qercetine, EAT : Equivalent Acide tannique.

Les résultats des dosages phytochimiques obtenus pour notre échantillon de graines de caroube sont largement supérieurs à ceux trouvés par **Mekhoukhe et al. (2018)**, **Fidan et al. (2020)** et **Ben Ayache et al. (2020)**. Ces derniers rapportent des teneurs beaucoup plus faibles en polyphénols totaux et en flavonoides (12.24mg/g, 1.33mg/g, 9mg/g et 1.76mg/g, 0.30mg, 6mg/g, contre 283.68mg/g et 12.65mg/g, respectivement). Alors qu'une différence minime des résultats est constatée avec **Mekhoukhe et al. (2018)** pour les teneurs en flavonols, en faveur de notre échantillon (3,23mg/g et 2,97mg/g, respectivement). Notre résultat enregistré pour les tanins hydrolysables dépasse de loin ceux d'**Avallone et al. (1997)** et **Gaouar (2011)**. Ces derniers rapportent des teneurs de 0.95mg/g et de 0,04mg/g, respectivement. Cependant, la teneur en tanins hydrolysables obtenue pour notre échantillon analysé (2,79 mg/g) s'avère faible par rapport à celle rapportée par **Ben Ayache et al. (2020)** (6mg/g) et intermédiaire entre celles enregistrées pour les tanins totaux et condensées (4.29mg/g et 0.53 mg/g, respectivement) (**Mekhoukhe et al., 2018**). Cette différence de résultats peut être expliquée selon **Ebrahim et al. (2007)** et **Lee et al. (2003)**, par plusieurs facteurs tels que : le

climat, l'environnement (la zone géographique, la sécheresse, la nature du sol, les agressions et les maladies..., etc.), le facteur génétique, le cultivar, la période de récolte, le stade de développement, ainsi que les méthodes de conservation, d'extraction et de quantification de ces substances. Selon **Ydjedd et al. (2017)**, la solubilité des composés phénoliques dépend de leur degré de polymérisation, le solvant utilisé, et leur interaction avec d'autres composants de la matrice cellulaire ainsi que la formation de complexes insolubles.

La comparaison de nos résultats avec les données bibliographiques montre que les graines de caroube sont très riches en polyphénols totaux, en flavonoides et en tanins hydrolysables, par rapport à la partie comestible (la pulpe de caroube). Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenu par d'autres chercheurs. Selon **Avallone et al. (1997)**, la pulpe contient une quantité significativement plus élevée de polyphénols, de proanthocyanides, d'ellagitanins et de gallotannins par rapport à la graine, seules des traces de polyphénols (0,66mg/g), de proanthocyanidines (0,19 mg/g), et des ellagitanins (0,04 mg/g) ont été détectées. Aucun gallotannin n'a été trouvé dans les graines. Selon **El Kahkahi (2015)**, les taux de phénols totaux et de flavonoides sont plus importants dans la pulpe que dans la graine (5,36 mg/g contre 3,74mg/g et 0,4 mg/g contre 0.23mg/g, respectivement) alors qu'une similitude d'extraction des tanins hydrolysables a été enregistrée pour la pulpe et les graines (0.05mg/g). Cette différence de teneur peut être expliquée par la provenance géographique, la méthode d'extraction, la variété et surtout le degré de maturité des gousses. En effet plus les gousses vertes deviennent mûres, plus la teneur en composés phénoliques diminue. Cette diminution pourrait être expliquée par la conversion des composés phénoliques solubles en composés phénoliques insolubles. Ces derniers peuvent se lier facilement aux polysaccharides de la paroi cellulaire. Elle pourrait être aussi due, probablement, à l'oxydation de ces composés par les enzymes comme la polyphénoloxydase (PPO) (**Benchikh et al.,2016**).

III.2. Activité Anti-oxydante

Le potentiel antioxydant des graines a été estimé en utilisant deux méthodes :la méthode de réduction du ferricyanure de potassium et le piégeage du radical stable DPPH (Tableau 5).

La présence d'agents réducteurs dans les extraits induit une réduction des ions ferriques (Fe^{+3}) en ions ferreux (Fe^{+2}). Cette réduction est mesurée par l'intensité de la couleur bleu-vert qui en résulte. Il absorbe à une longueur d'onde de 700 nm. Une augmentation de l'absorbance indique un pouvoir réducteur élevé.

Tableau 5: Pouvoir réducteur et activité antioxydante contre le radical DPPH de l'extrait organique aqueux des graines de caroube et des standards (quercétine et acide gallique)

Pouvoir réducteur (Absorbances à 700nm)		Activité scavenger contre le radical DPPH	
Graines de caroube (1mg/ml)	0,120±0,019 ^c	Graines de caroube (1mg/ml)	38,69±2,66 ^c
Acide gallique (20µg/ml)	0,297±0,07 ^b	Acide gallique (40µg/ml)	92±0,55 ^a
Quercétine (20µg/ml)	0,447±0,17 ^a	Quercétine (40µg/ml)	64±0,27 ^b

DPPH : 1,1-diphenyl 1-2-picrylhydrazyl. Les valeurs portant des lettres différentes pour chaque paramètre analysé présentent des différences significatives ($P \leq 0,05$). Les résultats sont classés par ordre décroissant : $a > b > c$.

L'analyse du pouvoir réducteur de l'extrait organique aqueux des graines de caroube à la concentration de 1mg/ml conduit à une absorbance de 0,120 (Tableau 5). Cette absorbance est significativement faible ($p \leq 0,05$) en comparaison avec celles de l'acide gallique et de la quercétine testés à 20µg/ml. Comme on peut le voir d'après les résultats, c'est la quercétine qui a significativement ($p \leq 0,05$) l'absorbance la plus élevée et donc le pouvoir réducteur le plus prononcé suivie par l'acide gallique. Notre résultat semble être très inférieur à ceux constatés par **Benayache et al. (2020)**, pour les extraits aqueux des graines et de la pulpe de caroube. Ces derniers rapportent respectivement des IC_{50} de l'ordre de 0.73mg/ml et de 0.66mg/ml.

Le modèle piègeur du radical DPPH est largement utilisé comme méthode pour évaluer l'activité antioxydante dans une période relativement courte par rapport à d'autres méthodes. Comme indiqué sur le tableau 5, l'activité anti-radicalaire pour notre extrait étudié (à la concentration de 1mg/ml) est estimée à 38,69%. Cette dernière est significativement très inférieure ($p \leq 0,05$) à celles des étalons testés (acide gallique (92%) et quercétine (64%)). Notre résultat est très inférieur en comparaison à ceux trouvés par **Benayache et al. (2020)**. Ces derniers ont enregistré des IC_{50} de l'ordre de 1.04mg/ml et de 0.86mg/ml pour les extraits aqueux de la pulpe et des graines respectivement. Le même résultat est constaté en comparant notre résultat avec les données de **Ydjedd et al. (2017)**, ces derniers ont constaté des pouvoirs scavengers beaucoup plus importants avec des IC_{50} allant de 0.49µg/ml à 0.95µg/ml pour la pulpe de caroube. De ces résultats ressort une proportionnalité inverse entre la teneur en

composés phénoliques et le potentiel antioxydant de l'extrait qui peut révéler l'importance d'autres groupes phénol, non extraits ou complexés par d'autres composants de la matrice cellulaire ou oxydés, dans la capacité de piégeage des radicaux libres. Tel a été déjà signalé par **Albano et Miguel (2011)** pour des extraits de plusieurs plantes cultivées au Portugal.

CONCLUSION

Conclusion

Le présent travail a comme objectif l'étude du potentiel antioxydant des graines de caroube. Pour cela, une caractérisation phytochimique au moyen des méthodes colorimétriques et une évaluation du potentiel antioxydant par des tests antioxydants *in vitro* ont été entrepris. Le travail a comme optique la valorisation du caroubier par la valorisation de ses graines.

L'analyse de la composition chimique des graines de caroube montre leurs richesses en polyphénols totaux (283,68 mg EAG/g), en flavonoïdes (12,65 mg EQ /g) et en flavonols (3.23 mg EQ /g). Les résultats montrent également que la teneur en flavonoides est quatre à cinq fois plus élevée que celle des tanins hydrolysables (12,65mg EQ/g contre 2,79mg EAT/g) et que la classe des flavonols représente le quart des flavonoides totaux.

Le potentiel antioxydant a été étudié en utilisant deux méthodes : la réduction du radical libre 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) et la méthode de réduction du fer (FRAP). L'analyse du pouvoir réducteur des graines de caroube à la concentration de 1mg/ml montre une absorbance faible donc un pouvoir réducteur discret en comparaison avec les standards (l'acide gallique et la quercétine) testés à 20µg/ml. Le modèle piègeur du radical DPPH confirme cette faible activité Anti-oxydante (estimée à 38,69% d'inhibition) en comparaison à celles des étalons testés (acide gallique (92%) et quercétine (64%)).

Il serait intéressant de continuer ce travail par :

- L'étude du potentiel antioxydant des graines en appliquant d'autres tests antioxydants (ABTS, DPPH, Pouvoir réducteur au molybdate, ...etc.),
- Le dosage des différents antioxydants et composés bioactifs (vitamines, caroténoïdes, fibres, gommes...etc.)
- L'étude de la valeur nutritionnelle et énergétique des graines de caroube et essais de formulation de compléments alimentaires destinés à l'alimentation animale.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

<i>Références bibliographiques</i>

1. Abi Azar, R. 2007. Complexations des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier. Propriétés technologiques des coagulum obtenus, Agro paris tech Ecole Doctorale Abies, Thèse de doctorat.
2. Ait Chitt M., Belmir M. et Lazrak A. 2007. Production des plantes sélectionnées et greffées du caroubier. Transfert de technologie en Agriculture, N°1 53, IAV Rabat, pp.1 -4.
3. Albanell E, Caja G, Plaixats J. 1991. Characterization of Spanish carob pod and nutritive value of carob kibbles, Cahiers Options Méditerranéennes. 16: 135- 136.
4. Albano, S.M. and M.G. Miguel. 2011. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. Ind. Crop. Prod., 33: 338-343.
5. Andersen Y.M., Markham K.R. 2006. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications. Ed. CRC, Taylor & Francis, Boca Raton, FL. 553-616.
6. Atamer A, Bilici A, Yenice N, Selek S, Ilhan N, Atamer Y .2008. The importance of paraoxonase I activity, nitric oxide and lipid peroxidation in hepatosteatosis. J In Med Res 36:771-776.
7. Auger.I ,2011. Thèse : nouveaux auto-anticorps dans la polyarthrite rhumatoïde.
8. Avallone R., Plessi M., Baraldi M. and Monzani A. 1997. Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and tannins, Journal of food composition and analysis, Vol.10, pp: 166-172.
9. Ayaz F.A, Torun H., Ayaz S., Correia P.J, Alaiz M., Sanz C., Gruz J., Strnad M. 2007. Determination Of Chemical Composition Of Anatolian Carob Pod(*Ceratonia Siliqua* L.): Sugars, Amino And Organic Acids, Minerals And Phenolic Compounds, Journal of food quality , vol. 30, No6, pp. 1040- 1055.
10. Ba K., Tine E., Destain J., Cisse N., Onart P., 2010. Etude comparative des composés phénoliques, du pouvoir anti-oxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt. Biotechnol. Agron. Soc. J., 14, 131–139.
11. Badeau M. 2006. Effet d'un antioxydant, le tempol, sur les actions métaboliques vasculaires de l'insuline chez le rat insulino-résistant avec un surplus de poids, 127 p. Mémoire présenté dans le cadre du programme de maîtrise en physiologie endocrinologie : Québec : l'Université Laval.
12. Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J.C., Pinkas M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from

- hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *ArzneimForsch.*, 46, 1086–1108.
13. Barouki R. Stress oxydant et vieillissement, *Med. Sci.*, 2006, 22, 266-272.
 14. Batista, M.T., Amaral, M.T., Proenca Da Cunha, A., 1996. Carob fruits as source of natural oxidants. In: *Proceedings of the Communication in Third International Carob Symposium*, Tavira, Portugal, June, pp. 19–23.
 15. Batlle I. & al., 1997. Carob tree *Ceratonia siliqua* L., Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17, *Gatersleben: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research*, Rome: *Int Plant Gen Res. Institute*, pp. 92.
 16. Ben Ayache ,EmnaBehijaSaafi , FathiEmhemmed , Guido Flamini ,LotfiAchour 1 and Christian D. Muller, 2020 .Biological Activities of Aqueous Extracts from Carob Plant (*Ceratonia siliqua* L.) by Antioxidant,Analgesic and Proapoptotic Properties Evaluation
 17. Benchikh Y., Paris C., Louaileche H., Charbonne C., Ghoul M., Chebil L. 2016. Comparative characterization of green and ripe carob (*Ceratonia siliqua* L.): physicochemical attributes and phenolic profile. *SDRP Journal of Food Science and Technology*.1 :7.
 18. Benmahioul, B., Kaid-Harche, M., &Daguin, F. 2011. Le caroubier, une espe ce me diterrane enne a usages multiples. *Fore t me diterraneenne*, 32(1), 51-58.
 19. Biner B, Gubbuk H., Karhan M., Aksu M. et Pekmezci M. 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.
 20. Bouzouita N., A. Khaldi, S. Zgoulli, L. Chebil, R. Chekki, M.M. Chaabouni and P. Thonart, 2007. The analysis of crude and purified locust bean gum: A comparison of samples from different carob tree populations in Tunisia *FoodChemistry* Vol. 101, N°4, pp. 1508-1515.
 21. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Sci.Technol.*, 28(1), 25–30.
 22. Bruneton. J. 1999. Flavonoïdes. In : *Pharmacognosie, Phytochimie : Plantes médicinales*. Ed. 3 : *Technique et Documentation*. Paris. 10-353p.
 23. CAJA G. 1985. La Garrofa: Composición, procesado y usosagroindustriales. *Jornadas de la Garrofa*. LLiria, Valencia.
 24. Cau SB, Carneiro FS, Tostes RC. 2012. Differential modulation of nitric oxide synthases in aging : Therapeutic opportunities. *Front Physiol* 3:218. doi: 10.3389/fphys.
 25. Crépel, F ; Lemaire, G, 1984. Le monoxyde d’azote.*MedSci (Paris)*, 1995. Vol. 11, N° 12; p.1639-42.

26. Custódio L., Carneiro M.F. & Romano A., 2005. Microsporogenesis and another culture in carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Sci. Hortic.*, 104, 65-77.
27. Davies, RL, 1987. Évaluation préliminaire des haricots Narbon (*Vicianarbonensis*) pour les porcs. In : Georg D., Légumineuses à grains pour les zones à faible pluviométrie. Adélaïde : Dept. Agric. Sud de l'Australie : 39-410.
28. Dean, R.T., Gieseg, S., Davies, M.J., 1993. Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends BiochemSci* 18, 437-441.
29. Delattre J, Thérond P, Bonnefont-Rousselot D. 2005. Oxydative stress in the othersclerotic process. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisé* .21 :144-150.
30. Ebrahimi N.S., Hadian J., Mirjalili M.H., Sonboli A., Yousef zadi., 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phonological stages. *Food chemistry*. 110, pp: 927-931.
31. El Kahkahi R.a.b.c, Zouhair R.a, Diouri M.a, AitChitt, M.c and Errakhi, R.a 2017. Morphological and biochemical characterization of Moroccocarobtree.
32. FAOSTAT. 2020. <http://faostat.fao.org/>.
33. Favier A. 2003. Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Mécanismes biochimiques. L'actualité Chimique*. 108-115.
34. Favier A., Cadet J., 1995. Kalaryanaman R., Fontecave M., Pierre J.-L., *Analysis of Free Radicals in Biological Systems*, Birkhauser, New-York.
35. Fidan et al; 2020, Evaluation of chemical composition, antioxidant potential and functional properties of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seeds.
36. Gaouar N. 2010. « Etude de la valeur nutritive de la caroube de différentes variétés Algériennes ». Diplôme de Magister en Agronomie. Université Abou Beker Belkaid. Tlemcen.
37. Gardès-Albert M, Dominique Bonnefont-Rousselot, Zohreh Abedinzadeh Z et Daniel Jore D. 2003. Espèces réactives de l'oxygène : Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*. pp : 91-96.
38. Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 4: 162-169.
39. Gillet S, Simon M, 2004. Synthèse bibliographique de l'influence du procédé d'extraction et de purification sur les caractéristiques et les propriétés d'une gomme de caroube. *Biotechnologie, argonomie, société et Environnement*, 18(1) ,97.
40. Goudable, J., Favier, A. 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants *Nutrition clinique et métabolisme*, 11, 115-120.

41. Gramza et Korczak J. 2005. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science and Technology* .16: 351– 358.
42. Gutteridge J., Halliwell B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899, (1), 136–147.
43. Gutteridge JM, Halliwell, B, 2000. Free radicals and antioxydats in the year: a historical look to the future. *Ann N Y AcadSci* 899:136-147.
44. Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Charlier C., Chapelle J. P. 2007. Le stress oxydant. 62 (10) : 628-638.
45. Harborne J.B. 1989. Plant Science Laboratories, University of Reading, Whiteknights, Reading, RG6 2AS, UK., Academic Press, Londres, 283-323.
46. Jones D. K., 1953. Carob culture in Cyprus. FAO 53/2/1225. FOA. Rome.
47. Karamać M., Pegg R.B.2009. Limitations of the tetra-methylmurexide assay for investigating the Fe (II) chelation activity of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(14): 6425-6431.
48. Klenow S., Jahns F., Pool-Zobel B.L., Glei M. 2009. Does an extract of carob (*Ceratonia siliqua* L.) have chemopreventive potential related to oxidative stress and drug metabolism in human colon cells, *J. Agric Food Chem.*, vol.57, N°7, pp:2999-3004.
49. Knaggs A.R. 2003. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports* ; 20: 119-136.
50. Koechlin-ramonatxo, C, 2006. Oxygene, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr Clin Metabol* 20, 165-177.
51. Kumaran A., Karunakaran R. J., 2009. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem.*, 100 (1), 356–361.
52. LAHLOU FZ et BOURHIM N, 2009. “Contribution à l’étude de l’effet antioxydant du thé vert (*Camellia sinensis*) et du romarin (*rosmarinus officinalis*) contre le stress oxydatif induit chez la souris 3rd international SMBBM ” Congress Marrakech April 20-24th, 183-187.
53. Lee K.W., Kim Y.J., Lee H.J., Lee C.Y. 2003. Cocoa has more phenolic Phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Food Chemistry*. 51, pp: 7292-7295
54. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *PharmacognRev* 4, 118–126.

55. Mahdad Mustapha Yacine, 2013. Situation et perspectives d'amélioration du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) dans le Nord-ouest de l'Algérie, université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.
56. Makris. D.P.; Kefalas. P. 2004. Carob Pod as a source of polyphenolic Antioxidants. *Food Technol. Biotechnol.* Vol. 42, N° 2, pp. 105–108.
57. Massion P, Preiser J-C, Balligand J-L. 2002. Les espèces réactives de l'azote : bénéfiques ou délétères. *Nutr Clin Métabolisme*, 16:248–252.
58. McCall, M. R. et B. Frei, 1999. "Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans" *Free Radical Biology and Medicine* 26(7-8): 1034-1053.
59. McCall, M. R. et B. Frei 1999. "Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?" *Free Radical Biology and Medicine* 26(7-8): 1034-1053.
60. Mekhoukhe.A., Kicher.H., Ladjouzi1. A., Medouni.H., Brahmi.F., Medouni.S., Khodir.M. 2018. Antioxidant activity of carob seeds and chemical composition of their bean gum by-products.
61. Melgarejo P. & Salazar D.M., 2003. Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas. Vol. II. Mundi-Prensa. España, pp. 19-162.
62. Meyers K. J., Watkins C. B., Pritts M. P., Liu R. H., 2003. Antioxydant and antiproliferative activities of strawberries, *J. Agric. Food Chem.*, 51(23), 6887–6892.
63. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC, 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*, 52:673-751.
64. Migdal C, Serres M. 2011. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris)*, 27(4), p 405-412.
65. Mole S., Waterman P.G., 1987. A critical analysis of techniques for measuring tanins in ecological studies. II. Techniques for biochemically defining tanins. *Oecologia*, 72, 148-156.
66. Monteiro M., Farah A., Perrone D., Trugo L.C., Donangelo C. 2007. Chlorogenic acid compound from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. *Journal of Nutrition*. 137: 2196-2201.
67. Naczek, M. et Shahidi, F. 2004. Extraction et analyse des composés phénoliques dans les aliments. *Journal of Chromatography*, 1054, 95-111.
68. Nadezhda. P, Ivanka. P, Ivan. I, Rumen.M, Raina. H, Manol .O, Vania.N. 2017. Nutritional and antioxidant potential of carob (*Ceratonia siliqua*) flour and evaluation of functional properties of its polysaccharide fraction.

69. Nadia ZEKRI, 2017. Étude phytochimique et Activités Biologiques des Huiles Essentielles et des Extraits des *M. pulegium* (L.), *M. suaveolens* (Ehrh.) et *M. spicata* (L.) du Moyen-Atlas Marocain.
70. Nadia ZEKRI, 2017. Étude phytochimique et Activités Biologiques des Huiles Essentielles et des Extraits des *M. pulegium* (L.), *M. suaveolens* (Ehrh.) et *M. spicata* (L.) du Moyen-Atlas Marocain
71. Nagata T., Hayatsu M., Kosuge N.1992. Identification of aluminium forms in tea leaves by Al NMR. *Phytochemistry*. 31(4): 1215-1218.
72. Oikawa S., Hirokawa I., Hirakawa K., Kawanishi S. 2001. Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol. *Carcinogenesis*, 22, 1239-1245.
73. Owen R.W. Haubner R. Hull W.E. Erben G. Spiegelhalder B. Bartsch H. Haber B. 2003. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. *Food and Chemical Toxicology*.41 :1727–1738.
74. Owen. R.W.; Haubne. R.; Hull. W.E.; Erben. G.; Spiegelhalder. B.; Bartsch. H.; Habe. B. 2003. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre, *Food and Chemical Toxicology* Vol. 41, N°12, pp. 1727- 1738.
75. Oyaizu M., 1986.Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine, *JPN. J. Nutr.*, 44 (6), 307–315.
76. Pietta P. G, 2000. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 63 : 1035-1042.
77. Quezel P. et S. Santa, 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales (tome1), Editions du centre national de la recherche scientifique, pp.557.
78. Raccab D. 2004. Épidémiologie et physiopathologie des complications dégénératives du diabète sucré. *E!vfC-Endocrinologie*. 1 : 29-42.
79. 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 LibbeyEurotext. Paris. Pp : 79-85.
80. Sabry S, Dinh-Xuan A.1996.Le monoxyde d'azote : un médiateur ubiquitaire. *Arch Pédiatrie* 1996, 3: S275–S277.
81. Sakihama Y., Cohen M. F., Grace S. C. et YamasakiH.2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants.*Toxicology* .177 :67–80

82. Sallouh M. & Nouioui I. 2019. Etude de quelques propriétés chimiques et biologiques de la caroube Algérienne.
83. Serairi-Beji R., Mekki-Zouiten L., Tekaya-Manoubi L., Loueslati M.H., Guemira F. & Ben Mansour., 2000. Can carob powder be used with oral rehydration solution for the treatment of acute diarrhea. *Med. Top.* 60: 125.
84. Thanan, R., Oikawa, S., Hiraku, Y., Ohnishi, S., Ma, N., Pinlaor, S, 2014. Le stress oxydatif et ses rôles importants dans les maladies
85. Thompsen J. C., Mottola H. A. 1984. Kinetics of the complexation of iron (II) with ferrozine. *Analytical Chemistry.* 56(4): 755-757.
86. Tucker S., 1992. The developmental basis for sexual expression in *Ceratoniasiliqua* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cassieae). *Am. J. Bot.*, 79, 318-327.
87. VlasiosGoulas., Eva Georgiou.2020. Utilization of Carob Fruit as Sources of Phenolic Compounds with Antioxidant Potential:Extraction Optimization and Application in Food Models.
88. Ydjedd, S.,Chaalal, M., Richard, G., Kati, D.E., López-Nicolás, R., Fauconnier, M. L. and Louaileche, H.2017. Assessment of antioxidant potential of phenolic compounds fractions of Algerian *Ceratoniasiliqua* L. 2017.Pods during ripening stages. *International Food Research Journal* 24(5): 2041-2049.
89. Yolanda S.M., Edgar E.T., Soria-Ruiz J., 2008.Característicasfisicoquímicas y contenidosdecarotenoides en maíces (*Zeamays* L.) amarilloscultivados en el Estado de México MEXICO.

ANNEXE

Annexe

Courbes d'étalonnages des dosages phyto-chimiques

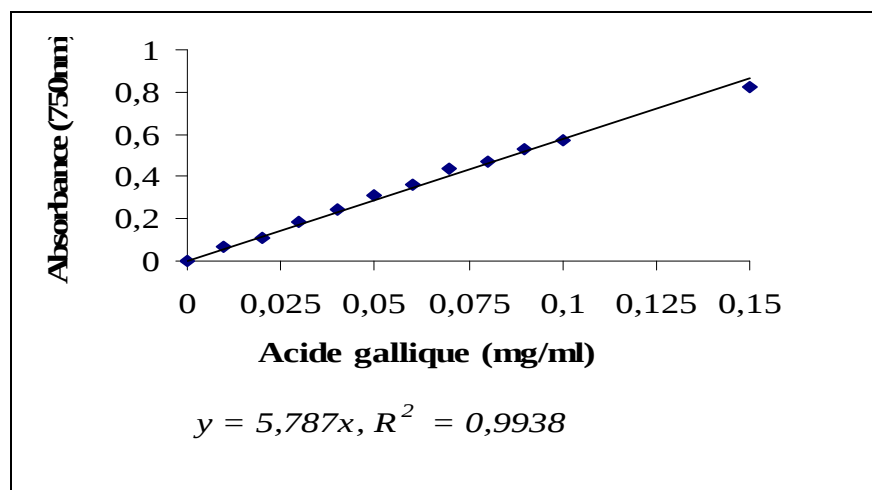


Fig.1 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des phénols totaux

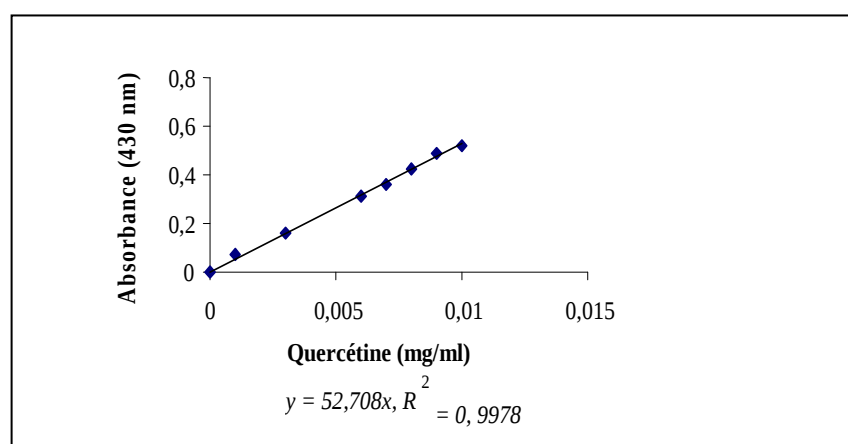


Fig.2 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

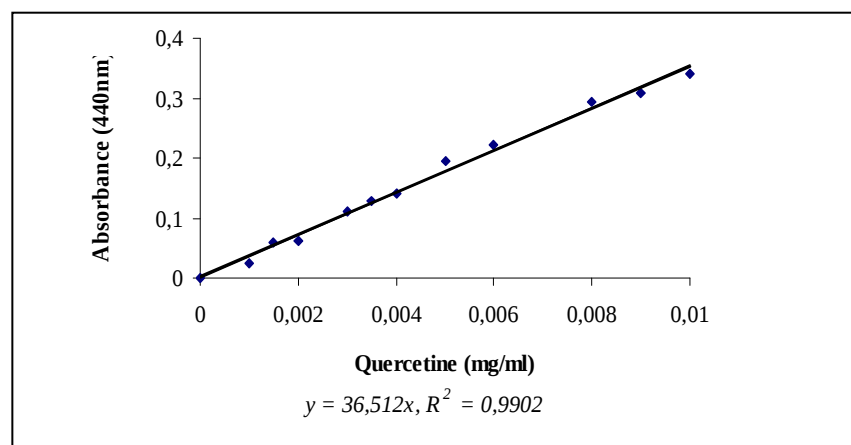


Fig.3 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonols.

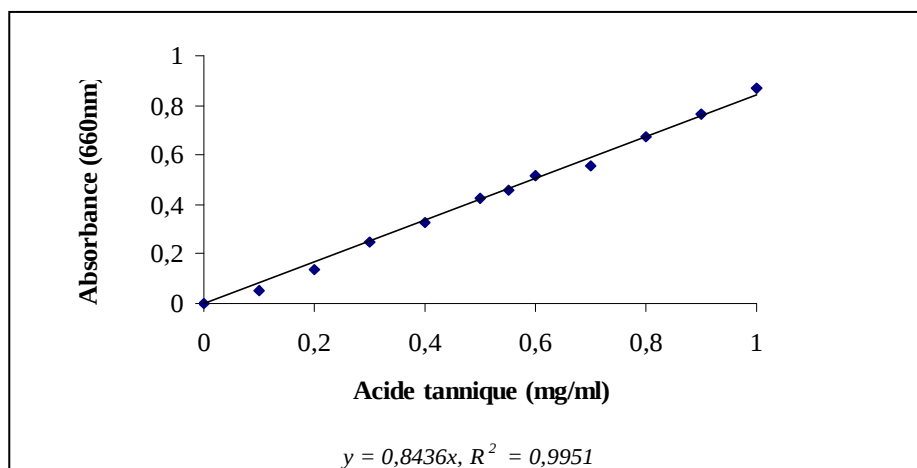


Fig. 4 : Courbe d'étalonnage pour le dosage des tanins hydrolysables.

Résumé

L'objectif de notre étude est la valorisation de la caroube par l'étude du potentiel antioxydant de ses graines. Les résultats obtenus à l'issue de ce travail montrent que les graines de caroube analysées sont riches en polyphénols totaux (283,68 mg EAG/g), en flavonoïdes totaux (12,65 mg EQ /g) avec une teneur modérée en flavonols (3,23 mg EQ /g) et en tanins hydrolysables (2,79 mg EAT/g). Le potentiel antioxydant a été étudié en utilisant deux méthodes : la réduction du radical libre 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) et la méthode de réduction du fer (FRAP). Les résultats montrent que les graines de caroube montrent un potentiel antioxydant discret en comparaison avec les étalons testés (acide gallique et quercétine).

Mots clés : Activité Anti-oxydante, caroube, graines, polyphénols.

Abstract

The objective of our study is to enhance the value of carob by the study of the antioxidant potential of its seeds. The results obtained at the end of this work show that the carob seeds analyzed are rich in total polyphenols (283,68 mg EAG/g), in total flavonoids (12,65 mg EQ /g) with a moderate content of flavonols (3,23 mg EQ /g) and in hydrolyzable tannins (2,79 mg EAT/g). The antioxidant potential has been studied using two methods: the reduction of free radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) and the iron reduction method (FRAP). The results show that carob seeds show discreet antioxidant potential in comparison with the standards tested (gallic acid and quercetin).

Keywords: Antioxidant activity, carob, seeds, polyphenols.

ملخص

تهدف دراستنا الى تثمين ثمار الخروب وذلك من خلال دراسة قدرة مضادات الأكسدة للبذور. حيث أظهرت نتائج التجارب المخبرية في هذا العمل أن بذور ثمار الخروب التي تم تحليلها غنية بالبوليفينول الكلي (283,68 مغ EAG\غرام)، ومركب الفلافونويد الكلي (12,65 مغ EQ \ غرام)، مع كمية متوسطة من مركب الفلافونول (3,23 مغ EAG\غرام)، وفي التانينات القابل للتحلل بالماء (2,79 مغ EAT\غرام). تمت دراسة قدرة مضادات الأكسدة باستخدام طريقتين: إرجاع الجذر " 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) وطريقة إرجاع الحديد (FRAP). نستخلص من نتائج هذا العمل أن بذور الخروب تحتوي على قدرة مضادة للأكسدة متميزة مقارنة بالعينات المرجعية التي تم اختبارها (حمض الجاليكوكيرسيتين).

الكلمات المفتاحية: مضادات الأكسدة، الخروب، البذور، البوليفينول.