

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico-chimique

Mémoire de fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme de **Master.**

Option : Biochimie Appliquée.

Thème

**Teneur en composés phénoliques et activité
antioxydante d'extraits bruts du fruit de
caroubier (*Ceratonia siliqua L*)**

Réalisé par :

AICHIOU Karima

SAIDANI Leïla

Jury:

Président: M^r OUCHEMOUKH S

Promoteur : M^r ZAIDI F

Copromotrice: M^{me} MAHTOUT R

Examinatrices: M^{me} NATOURI N

M^{elle} MEZIANI S

2013-2014

Remerciement



On tient à remercier le bon Dieu le tout puissant d'avoir donné le courage et la volonté pour accomplir ce travail.

On tient particulièrement à remercier Monsieur le professeur ZAIDI FARID, pour son encadrement, son appui scientifique, pour sa disponibilité, ses conseil précieux pour l'achèvement de ce mémoire. Qu'il reçoit l'expression de notre vive gratitude.

Nos remerciements les plus profonds à notre Co-promotrice M^{me} : MAHTOUT Rosa. On remercie également Mr OUCHEMOUKH S .d'avoir accepté de présider le jury de notre soutenance ainsi que M^{me} NATOURI N et M^{elle} MEZIANI S, qui nos fait l'honneur de juger notre travail.

L'ensemble de personnel de laboratoire de Nutrition alimentaire (LILA, BIBA, SOUSSOU, WIZWIZ, MARIE, KARIMA, GHANIA, HOURIA, LOUIZA et SOUSSOU2) pour leurs entière disponibilité, coopération ainsi pour l'ambiance et les bonnes conditions qu'ils nous ont assuré.

Merci également à tous ceux qui contribué de prés ou de loin à l'élaboration de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de nos sincères reconnaissances.





Dédicace

Avec l'aide de Dieu le Tout puissant est enfin achevé ce travail ; le quel je dédie à toutes les personnes qui me sont chères ;

À ceux qui mon cœur depuis sa naissance ; n'a pu éprouver qu'amour et reconnaissance ;

À ceux qui ont donné un sens à mon existence, en m'offrant une éducation digne de confiance ;

À ceux qui m'ont soutenu nuit et jours et durant tout mon parcours ;

À vous mes chers parents ; Malika et El Hacem

À vous très chers sœur et frères surtout Ali , Nadjim , Nassim , alhocine et mazigh

À ma sœur Wahima et ses enfants Bilal, houssame et Tayeb et à son marie Djamel

À mon oncle Zahir et sa femme Fatima et ses enfants.

À ma meilleure amie Sarah et son époux Brahim

À celui qui ma encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles Mohad- Arezki

À tous mes amies.

Karima





Dédicaces

Je dédie ce modeste travail avec toute mon affection:

À la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie à mes parents qui m'ont apporté son soutien durant toute ma vie, pour ses efforts et sacrifices qui m'ont donné confiance et courage. Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

À mes très chères sœurs Samira, Djida et son mari Idir, Kahina et son mari Lyes

À Nana Saidia, Nana Malika

À notre rayon de soleil, mes frères : Samir et Noredinne.

À Mes grands parents

+ *À mon oncle et leurs familles*

À dada Hakim et sa famille

À mes chers neveux : Nassim, Yani, Ouassim.

À mes meilleures amies : Massissilia, Houria et leurs familles

À mes copines de chambre : Ghania, Loulou.

Très particulièrement à Namic.

LEILA



Liste des abréviations

Abs :Absorbance

AlCl₃ :Chlorure d'aluminium

BSA :Bovin Sérum albumin

BHT :butylhydroxytoluène

CAT :Catechine

C :atome de carbone

cCu-ZnSOD: SOD à cuivre zinc

DNS :Différence non significative

DPPH[°] :2,2'-diphenyl- picrylhydrazyl

DS :Différence significative

ERO :Espèces réactives de l'oxygène

EqAG :Equivalent Acide Galique

EqAT :Equivalent Acide Tannique

EqCAT :Equivalent Acide Catéchine

EqQ :Equivalent Quercitine

FeCl₂ :Chlorure ferreux

FeCl₃ :Chloride ferrique

Fe³⁺ :fer ferrique

Fe²⁺ :fer ferreux

ha :Hectare

H₂O₂ :peroxyde d'hydrogène

IC50 :Concentration inhibitrice de 50%

GPx:glutathion peroxydase

GR:glutathion réductase

GSH:glutathion réduite

GSSG :glutathion oxydée

Q :Quercetine

MS :Matière sèche

Mn-SOD:SOD à manganèse

NaCO₃ :carbonate de sodium

NaOH :Hydroxyde de sodium

NO :monoxyde d'azote

O₂^{•-} :anion super oxyde

OH[•] :radical hydroxyle

¹O₂:oxygène singulier

PP :Phénols Polymérisés

PTS :phénols totaux solubles

ROS :Réactive Oxygene Species

SDS/TEA : Sodium Dodecyl Sulfate /TriEthanol Amine

SOD :super oxyde dismutase

TCA :Acide Trichloracétique

TEA :Triéthanolanamine

UV :Ultra violet

Listes des Figures

N e Figure	Titre de la figure	N de page
1	L'arbre du caroubier	5
2	Les feuilles de caroubier	5
3	Les fleurs de caroubier	6
4	Les gousses vertes	6
5	les gousses Mûres	6
6	les graines et gousses de caroubier	6
7	Balance oxydants/ antioxydants en faveur d'un stress oxydatif	15
8	les systèmes de défense antioxydant contre les espèces réactives de l'oxygène	16
9	Classification des antioxydants	17
10	Les principaux acides hydroxybénzoïques	22
11	Les principaux acides hydroxycinamiques	22
12	Structure de base des flavonoïdes	23
13	Structure de quelle que tanins	25
14	Structure de base des coumarines	25
15	Structure de la lignane	26
16	Structure de la lignine	26
17	Piégeage des radicaux libres par les polyphénols	27
18	Sites de Chélation des métaux de transition par les flavonoïdes	28
19	Les différents types de liaison de polyphénols avec les protéines	29
20	Protocole d'extraction des polyphénols	32
21	Protocole de dosage des phénols totaux soluble	33
22	Réaction du Chlorure d'Aluminium avec les flavonooïdes	34

23	Protocole de dosage des flavonoïdes	34
24	Protocole de dosage des tannins hydrolysables	35
25	Réaction de la vanilline avec la catéchine	36
26	Protocole de dosage des tannins condensés	36
27	Protocole de dosage des phénols polymérisés par la méthode de précipitation par la BSA	37
28	Réduction du radical DPPH [°]	38
29	Activité antioxydante du radical DPPH	39
30	Activité antioxydante de pouvoir réducteur	40
31	activité antioxydante de peroxyde d'hydrogène H ₂ O ₂	41
32	activité antioxydant de chélation de fer ferreux	42
33	Teneur en phénols totaux solubles	44
33	Aptitude des PTS à se lier ou non en peotéines	45
34	teneur en flavonoides	46
35	teneur en tanins hydrolysables.	46
36	teneur en tanins condensés.	47
37	Activité anti-radicalaire du DPPH	48
38	Effet des différentes concentrations des extraits bruts sur l'activité anti radicalaire de DPPH	49
39	IC50 des différents échantillons contre le radical DPPH [°]	49
40	Le Pouvoir réducteur	49
41	Effet de différentes concentrations d'extraits bruts sur le pouvoir réducteur	52
42	Les concentrations réductrices de 50% de fer	53
43	Inhibition de peroxyde d'hydrogène	54
44	Chélation de fer ferreux	55

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
I	Classification de <i>Ceratonia siliqua. L</i>	4
II	production mondiale de caroubier	7
III	composition chimique de caroubier	9
IV	Principales sources de production des radicaux libres	13
V	les différentes activités antioxydant non enzymatiques	19
VI	Principales classes de composés phénoliques	21
VII	Principales classes de flavonoides	23
VIII	Propriétés biologiques des quelques poly phénols dans l'organisme	30
X	Matrice de corrélation entre teneur en composés phénoliques et activité antioxydantes	56

Table de matière

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Chapitre I : généralité sur le caroubier

I.1.Historique	3
I.2.Origine	3
I.3.Classification	3
I.4.Description	4
I.5.Production et usage	6
a)La production mondiale du caroubier	6
b) Intérêt et L'utilisation de caroubier	6
I.6.La composition chimique de caroubier	7
I.7.Effet thérapeutique.....	8

Chapitre II : Stress oxydant cellulaire et antioxydant

II.1.Les radicaux libres.....10

1. Définition.....	10
2. Nature des radicaux libres	10
2.1. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène	10
2.2. Les espèces libres non oxygénées	11
3. Production de radicaux libres	12
4. Rôles physiologiques des radicaux libres	12
5. Les cibles des radicaux libres	12

II.2.Le stress oxydant

1. origine de stress oxydant.....	14
-----------------------------------	----

2. les maladies liées aux stress oxydatif14
---	-----

II.3. Les systèmes de défense antioxydant

1. classification des antioxydantes.....	.15
1. Les antioxydants de synthese.....	.17
2. Les systèmes antioxydants d'origine naturelle17
2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques17
2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques18

Chapitre III : Les composés phénoliques

III.1. définition19
III.2. Classification des composés phénoliques19
III.2.1 Les composés phénoliques simples20
III.2.2. Les acides phénoliques.....	.20
a. Les acides hydroxy benzoïques.....	.21
b. Les acides hydroxy cinnamiques.....	.21
III.2.3 les flavonoides21
III.2.4 Les tanins23
a. Les tanins condensés (flavan-3-ols)23
b. Les tanins hydrolysables23
III.2.5. Les coumarines24
III.2.6. Les quinones24
III.2.7. Les stilbéne.....	.25
III.2.8. Lignanes25
III.2.9. Lignines25
III.3. Biosynthèse des composés phénoliques25
III.3.1. voie de l'acide shikimique26
III.3.2. la voie d'acétate malonate.....	.26
III.4. Mécanisme d'action des composés phénoliques26
III.4.1. piégeage des radicaux libres.....	.26
III.4.2. Chélation des métaux.....	.27
III.4.3. La complexation des protéines.....	.27

III.5. Intérêt des composés phénoliques28
III.5.1.Applications industrielles des polyphénols28
III.5.2.Chez les végétaux29
III.5.3.Chez les humains29

Partie pratique :

Chapitre I : Matériel et Méthodes

I.1.Matériel Végétal.....	30
I.1.1.Récolte	30
I.1.2.Conservation.....	30
1. Séchage.....	30
2. Broyage et Tamisage.....	30
I.2.Extraction et Dosage des composés phénoliques	30
I.2.1.Extraction	30
I.2.2.Dosage des composés phénoliques	30
1. Dosage des phénols totaux solubles	32
2. Dosage des flavonoïdes	33
3. Dosage des tanins hydrolysables.....	34
4. Dosage des tanins condensés	35
5. Dosage des phénols polymérisés.	36
I.4.Etude <i>in vitro</i> de l'activité antioxydants	37
I.4.1.pouvoir anti-radicalaire de DPPH	37
I.4.2.pouvoir réducteur du fer	39
I.4.3.Inhibition de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).....	40
I.4.4.Chélation de fer ferreux.....	41
I.5. analyse statistique des résultats.....	42

Chapitre II : résultats

II.1.teneur en composés phénoliques.....	43
II.1.1.Teneur en phénols totaux solubles	43
II.1.2.phénols polymérisés.....	44
II.1.3.Teneur en flavonoïdes.....	44
II.1.4.Teneur en tanins hydrolysables.....	45
II.1.5.Teneur en tanins condensés	46
II.2.Résultats de l'activité antioxydants <i>in vitro</i>	46
II.2.1.Activité anti-radicalaire du DPPH	46
1.Effet des extraits bruts sur l'activité antioxydante de DPPH.....	46
2.Effet de la concentration en extrait sur l'activité anti-radicalaire de DPPH	47
3. IC50 du DPPH	49
II.2.2.Pouvoir réducteur.....	49
1.Effet des extraits bruts sur le pouvoir réducteur.....	49
2.Effet de la concentration en extrait sur le pouvoir réducteur.....	50
3. IC50 du pouvoir réducteur	52
II.2.3.Inhibition de peroxyde d'hydrogène.....	52
II.2.4.Chélation du fer ferreux.....	53
II.2.5.Matrice de corrélation.....	54
Discussion générale.....	56
Conclusion.....	58
Références bibliographiques.	
Annexes.	
Résumé.	

Introduction

Introduction

Depuis la nuit des temps, les hommes se sont soignés avec les plantes qu'ils avaient à leur disposition contre les maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria. Ni le hasard, ni la religion et ni la superstition qui a guidé la médecine traditionnelle à employer une plante plutôt qu'une autre. Certainement, c'est l'expérience où les gents apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes (**Iserin, 2001**).

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves), décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus (**Iserin, 2001**).

L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires des végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400'000 espèces végétales connues ont été étudiées sur les plans phytochimiques, biologiques et pharmacologique, et que chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs milliers de constituants différents (**HOSTETTMANN, 1982 ; ABDOLLAHI, 2003**).

La toxicité de l'oxygène est liée à sa structure moléculaire biradicalaire, chimiquement instable, permettant des réarrangements électroniques sur la couche orbitale externe le rendant plus actif. Ainsi, l'oxygène moléculaire peut se transformer dans l'organisme en oxygène singulet et en anion superoxyde. Ces substances hautement réactives engendrent à leur tour d'autres espèces réactives oxygénées (ERO) de nature radicalaire ou non radicalaire (**Rock, 2003**) pouvant induire des dommages oxydatifs souvent irréversibles au niveau d'un grand nombre de molécules biologiques comme les enzymes, les protéines, l'ADN, ... (**Berger, 2006**).

Afin d'empêcher les ERO d'exercer de façon incontrôlée leurs effets délétères, l'organisme dispose d'un vaste réseau de défense : les antioxydants (**Moffarts et al., 2005**). Il existe deux sources de défenses antioxydantes : l'une est apportée par l'alimentation sous forme de fruits, de légumes et de boissons riches en vitamines C et E, caroténoïdes, polyphénols, tandis que l'autre (glutathion peroxydase, catalase, ...) est d'origine endogène (**Pincemail et al., 2004**).

L'Algérie recèle d'un patrimoine végétal important par sa richesse et sa diversité dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts-plateaux, la steppe et les oasis sahariennes

: on y trouve plus de 3000 espèces végétales. Parmi ces ressources naturelles les plantes aromatiques et médicinales occupent une large place et jouent un grand rôle dans l'économie nationale. Elles sont utilisées dans différents domaines : industrie alimentaire, conserverie, pharmaceutique, et phytothérapie (**Duraffourd et al., 1997**).

La caroube est le fruit de *Ceratonia siliqua*, se développant dans les régions méditerranéennes et appartenant à la famille des légumineuses. Plusieurs études ont montré que la caroube présente de nombreuses propriétés biologiques dont les activités anti-microbienne (**Henis et al., 1964**), antidiurétique (**Würsch 1979 ; Bremness, 1996 ; Santos et al., 2005**), antioxydante et hypocholestérolémiante (**Gruendel et al., 2006 ; Klenow et al., 2007**).

La production mondiale annuelle, essentiellement méditerranéenne, est estimée à 310 000 tonnes, dont une bonne partie est fournie par l'Espagne suivie de l'Italie, du Portugal du Maroc et de l'Algérie (**FAOSTAT, 2010**).

La caroube suscite actuellement beaucoup d'intérêt en Algérie, les industriels se disputent le marché international, en vue de son exportation sous forme de farine tirée de la pulpe et des graines pour leur culture agricole.

Par ailleurs, cet arbre est d'une importance économique considérable ; ses gousses, plus riches en sucre que la canne à sucre et la betterave sucrière, sont utilisées en industrie agroalimentaire et pharmacologique, notamment comme antidiarrhéique, leur richesse en fibres leur confère des vertus hypocholestérolémiantes et hypoglycémiantes ; les composés phénoliques qu'elles contiennent sont à l'origine de leur propriété antioxydante (**Hariri et al., 2009**).

L'objectif de ce modeste travail est le dosage des antioxydants et l'estimation de l'activité antioxydante de la caroube. Pour cela la présente étude comprend deux parties principales :

La première partie est une synthèse bibliographique comportant une description de la caroube et ses antioxydants.

La deuxième partie du travail est expérimentale, elle est consacrée à :

- Extraction et teneur en composés phénoliques de chacun des différentes parties de caroubier (gousse, pulpe, graine).
- L'évaluation *in vitro* de l'effet antioxydant des extraits lyophilisés, selon quatre testes
 1. Test du piégeage du radical libre DPPH°.
 2. Pouvoir réducteur du fer.
 3. Inhibition de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).
 4. Chélation de fer ferreux.

Chapitre I

Généralités sur le caroubier.

I. Généralités sur le Caroubier

Le mot "Caroubier" venant de l'arabe *al kharroube*, est connu sous le nom scientifique de *Ceratonia siliqua* L. qui désigne en grec *keratia* (*Ceratonia*) signifiant « petite corne » et le nom d'espèce *siliqua*, désigne en latin une silique ou gousse.

I.1. Historique :

Le caroubier est un arbre apprécié depuis des milliers d'années par les habitants des pays méditerranéens pour sa chair farineuse et sucrée. (**Batlle et Tous, 1997 ; Gharnit, 2003 ; Berrougui, 2007**). Qui a été cultivé par les Égyptiens qui utilisaient la farine de caroube pour rigidifier les bandelettes de leurs momies. Il fut également utilisé par les berbères du Maroc pour ses vertus médicinales : grâce à sa teneur élevée en fibres, son fruit (la caroube) était dissout dans un liquide chaud pour stopper les diarrhées. Puis par les Arabes de l'Afrique du Nord, en Grèce et en Italie, en Espagne et au Portugal (**Rejeb, 1995 ; Gharnit, 2003**), ensuite il a été introduit en Amérique du Sud, du Nord et en Australie par les Espagnols. Actuellement le caroubier se trouve aussi aux Philippines, en Iran, en Afrique du sud et en Inde (**Berrougui, 2007**).

I.2. Origine

Le centre d'origine de *Ceratonia siliqua* L n'est pas clair. Il a été placé par (**Vavilov, 1951**) dans la région de la Méditerranée orientale (Turquie et la Syrie). Cependant, (**Schweinfurth, 1894**) considéré comme caroube originaire des pays montagneux du sud de l'Arabie (Yémen). Plus récemment, il a été considéré par (**Zohary, 1973**) comme provenant de la flore indo-Malaisienne, groupé avec *Olea*, *Laurus*, *Myrtus*, et d'autres plantes.

I.3. Classification

Tableau I : Classification de *Ceratonia siliqua*. L (**Quezel et Santa, 1963**)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobinta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae (légumineuses)
Sous-famille	Caesalpinioïdae
Genre	<i>Ceratonia</i> L
Espèce	<i>Ceratonia siliqua</i> L.

I.4. Description

Le caroubier (*Ceratonia siliqua L.*), appartenant à la grande famille des légumineuses mesurant généralement cinq mètres de hauteur et pouvant atteindre exceptionnellement quinze mètres, cultivé depuis longtemps qui peut vivre jusqu'à 500 ans, pour ses produits dévers mais aussi pour sa résistance au manque d'eau donc le caroubier présente une bonne résistance à la sécheresse par ce qu'il a de fortes racines qui pénètrent dans le sol, pour atteindre une profondeur de 18 m ou même plus (Aafi, 1996 ; Gharnit, 2003) et une écorce lisse et grise lorsque la plante est jeune ; et brune et rugueuse à l'âge adulte. Son bois de couleur rougeâtre est très dur (figure1).



Figure 1: L'arbre du caroubier (Rejeb et al., 1991)

Ses feuilles sont de couleur verte, persistantes, coriaces, alternes, de 10 à 20 cm de long, elles sont composées de 4 à 10 folioles, avec ou sans foliole terminale (Figure2). Il perd ses feuilles tous les 2 ans, au mois de juillet (Aafi, 1996 ; Gharnit, 2004) .



Figure2 : Les feuilles de caroubier

Et ses fleurs sont groupés en grappes pédonculées, de couleur pourpre et parfois rougeâtre, qui apparaissent sur vieux bois et parfois sur le tronc (Figure3). La morphologie

Généralités sur le caroubier

florale du caroubier est très complexe. La floraison a lieu de aout à novembre et la maturation à la fin de printemps de l'année suivante (**Battle et Tous, 1997 ; Gharnit,2004**).



Figure3 : Les fleurs de caroubier

Le caroubier donne naissance à des longues et épaisses gousses, appelé caroube, de 10 à 20cm de longueur. Vertes lorsqu'elles sont immatures, ces gousses deviennent brunes et aplaties lorsqu'elles arrivent à maturité vers le mois de juillet (**Rejeb et al., 1991 ; Battle et Tous,1997**) (Figure4 et 5).



Figure 4 : Les gousses vertes



Figure 5 : les gousses Mûres

On retrouve dans les gousses les graines de caroube (figure 6), de couleur brune et de forme ovoïde aplatie. On compte quinze à vingt graines par gousse. (**Rejeb, 1995 ;Ait Chitt et al,2007**).



Figure 6 : les graines et gousses de caroubier

I.5. La production et usage

a) La production mondiale du caroubier :

Espèce *Ceratonia siliqua L.* est considérée comme un composant important de végétation pour des raisons économiques et environnementales (Makirs et Kafelas, 2004). La production mondiale des caroubes (tableau II) est estimée à 310 000 tonnes par an, produites dans une superficie d'environ 200 000 ha, soit 1,55 tonne/ha avec des rendements très variables selon le cultivar, la région et l'agriculteur pratique (Ayas et al, 2007).

Tableau II : production mondiale de caroubier (Faostat 2010)

Pays	Production en tonnes (2004)	Production en tonnes (2008)
Espagne	67000	72000
Italie	24000	31224
Maroc	40000	25000
Portugal	20000	23000
Grèce	19000	15000
Turquie	14000	12100
Chypre	7000	3915
Algérie	4600	3600
Liban	3200	2800
Tunisie	1000	1000
Total	182680	191167

b) Intérêt et Utilisation de caroubier :

Le caroubier est un arbre d'importance écologique, socio-économique, industrielle et ornementale indiscutable. En terme de produits, l'arbre et toutes ses composantes (feuilles, fleurs, fruits, graines, bois, écorce et racine) sont utiles et particulièrement le fruit.

➤ Arbre :

En raison de sa rusticité et de son adaptation aux contraintes de l'environnement, le caroubier est souvent utilisé, pour le reboisement et la reforestation des zones affectées par l'érosion et la désertification (Boudy, 1950 ; Rejeb et al., 1991 ; Biner et al., 2007).

➤ **Le fruit :**

La pulpe sucrée de la caroube est employée depuis longtemps, comme nourriture de bétail (**Ait Chitt et al., 2007**). Elle est utilisée dans l'industrie alimentaire humaine, grâce à sa teneur élevée en sucres et en composés phénoliques. Elle est également employée pour la production d'alcool (éthanol), d'acide citrique et comme substituant du cacao pour la fabrication de chocolat, car elle ne contient ni caféine ni théobromine (alcaloïdes). La farine de la pulpe entre dans la composition de plusieurs aliments comme, les biscuits, les farines lactées... (**Rejeb et al., 1991 ; Makris et Kefalas, 2004 ; Dakia et al., 2007**).

La pulpe est utilisée aussi contre la diarrhée et pour le traitement de certaines maladies comme la gastrite, l'entérite, les angines, les rhumes et le cancer... (**Crosi et al., 2002 ; Gharnit, 2003 ; Ait Chitt et al., 2007**).

➤ **La graine :**

Les graines du caroubier sont utilisées dans le domaine industrielle et médicale, la gomme des graines reste la plus importante, puisqu'elle est utilisée, comme agent stabilisateur, gélifiant, fixateur dans différents domaines comme l'agroalimentaire (fromage, mayonnaise, salades...), la cosmétique (crèmes, dentifrices...), l'industrie pharmaceutique (médicaments, sirops...), la tannerie, le textile (**Battle et Tous, 1997 ; Biner et al., 2007 ; Dakia et al., 2007**).

- **La fleur** : est utilisée par les apiculteurs pour la production du miel de caroube.
- **Les feuilles** : sont utiles pour l'alimentation des animaux.
- **L'écorce et les racines** : sont utilisées en tannerie grâce à leur teneur en tannins. Le bois du caroubier, dur de couleur rouge, est estimé dans la charbonnerie et la menuiserie (**Rejeb et al., 1991 ; Gharnit, 2003**).

I.6. composition chimique de caroubier

La composition chimique de caroubier est illustrée dans le tableau III

Tableau III : Composition chimique de caroubier (Avallone *al.*, 1997 ; Biner *al.*, 2007 ; Owen *al.*, 2003 ; Makris et Kefalas, 2004).

La partie da la plante		Composants	Valeur
		Protéine	7,9 %
Feuille (Avallone <i>al.</i> , 1997 ; Biner <i>al.</i> , 2007).	Constituants		57 %
	Tannins condensés		0,7 %
	Sucres		48 - 56 %
Fruit (Owen <i>al.</i> , 2003 ; Makris et Kefalas, 2004).	Pulpe (90%)	Protéines	2 - 6 %
		Lipides	0,4 - 0,6 %
		Fibres	27 - 50 %
		Tannins	18 – 20 %
	Graine (10%)	Enveloppe tégumentaire	30 – 33 %
		Albumen	42 – 46 %
Embryon		20– 25 %	

I.7. Effet thérapeutique

La valeur médicinale des plantes est de plus en plus démontrée scientifiquement, ce qui augmente leurs utilisations en médecine. En thérapeutique de nombreuses études cliniques ont soulignées l'efficacité de la poudre de caroube dans de nombreux traitements, par ce que la phytothérapie est réalisée à l'aide des produits naturelles dont le corps est capable de reconnaître et de biodégrader (Gherdia, 2005).

La caroube est utilisée pour le traitement des affections gastro-intestinales, en particulier les diarrhées infantiles (Hostettler et al, 1995). Grâce à sa haute teneur en fibres elle provoque également un abaissement du cholestérol sanguin et hépatique chez le rat (Ruiz-Roso et al., 2010).

Les graines contiennent près de 90% d'un galactomanane et servent à obtenir la gomme de caroube par évaporation de l'eau. La gomme est traditionnellement employée contre les

Généralités sur le caroubier

vomissements des nourrissons, Elle est proposée dans le traitement de l'insuffisance rénale chronique (**Bezanger et al., 1990**).

D'autres études expérimentales ont montrée les capacités bactéricides de la caroube vis-à-vis de *staphylococcus aureus*. La caroube absorberait aussi les entérotoxines produites par certaines souches d'*Escherichia coli* et staphylocoques ainsi par le vibron cholérique (**Serairi-beji et al., 2000**).

Chapitre II

Radicaux libres, stress oxydant et activité antioxydante.

II.1. Les radicaux libres

1. Définition

les radicaux libres sont des espèces chimiques instables, atomes ou molécules (Cesarini ; 2004 , Ratnam et al., 2006), contenant un électron non apparié (célibataire) sur leur couche orbitale externe. A une courte durée de vie (environ 10^{-4} s), ces composés peuvent réagir avec les molécules les plus stables pour appairer leurs électrons (Demoffarts et al., 2005). Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un électron (agissant alors comme un réducteur) (Judde , 2004). Cette première réaction conduit généralement à la formation de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule (Cesarini, 2004).

2. Nature des radicaux libres

La majorité des radicaux libres dans le cours sont dérivées de l'oxygène, certaines peuvent être dérivées de l'azote (NO) qui possède un électron partagé entre son atome d'azote et son atome d'oxygène, ces radicaux libres ont un rôle physiologique important en agissant à faible concentration comme des secondes messages capables de régler le phénomène d'apoptose qu'est un suicide programmé des cellules, évitant leur évaluation vers un état cancéreux (Slater et al.,1995) .

2.1. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène :

L'oxygène que l'on respire est nécessaire aux réactions chimiques nous permettant de produire notre énergie. C'est au cours de ce métabolisme normal de l'oxygène (réduction de l'oxygène moléculaire en eau) dans les mitochondries que la plupart des radicaux libres se forment qui sont hautement toxiques (Lesgards 2000 ; Koppenol, 2001).

Les ERO sont toxiques et interagissent avec toute une série des substrats biologiques importants (Pincemail et al., 2002).

❖ Ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

L'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est un dérivé très réactif de l'oxygène. (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Il est produit au cours du métabolisme mitochondrial par l'acquisition d'un électron par l'oxygène moléculaire suite à la réaction suivante :

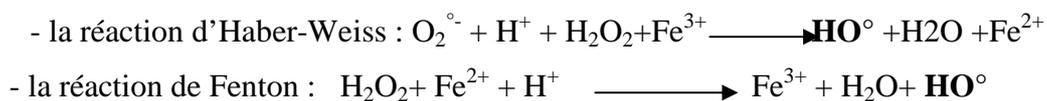


Relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme. Mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives.

Radicaux libres, Stress oxydant et activité antioxydante

❖ *Radical libre hydroxyle (OH°)*

Le radical libre hydroxyle (OH°) est très réactif. Son temps de demi-vie en milieu aqueux est de 10⁻⁶ secondes. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion superoxyde. Il peut être produit à la suite de diverses réactions. Nous en citerons deux à titre d'exemple, comme :



❖ *L'oxygène singulet (¹O₂)*

Lorsque de l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée (**Hadi, 2004**). C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde selon la réaction suivante :



❖ *Le radical peroxyde (H₂O₂)*

Le radical peroxyde est considéré comme une espèce réactive dérivée de l'oxygène (ROS) même s'il n'a pas une structure radicalaire et relativement faible mais il est capable d'initier ou de propager des dommages oxydatifs et de réagir avec les ions partiellement réduits Fe²⁺ et Cu⁺ pour former le radical hydroxyle dans la réaction de Fenton (**Wardman et Candeias, 1996**) :



Il peut être produit au cours des mécanismes illustrés par les équations suivantes :



1.2.2. Les espèces libres non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les ROS. Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citerons, par exemple, les acides gras peroxydés, résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques. Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ROS générant des molécules réactives et nocives. Stabilisée ensuite par résonance ou dimérisation (**Sorg, 2004**)

3. Production des radicaux libres :

La production des radicaux libres est une conséquence inévitable du métabolisme aérobie. En effet, l'organisme a besoin d'O₂ pour produire de l'énergie au cours des réactions dites de respirations oxydatives (Thomas et al., 2010). Cependant, une faible partie de l'oxygène échappe à sa réduction en eau, au niveau de la mitochondrie. Elle peut alors être à l'origine de la production des radicaux libres oxygénés (poston et raijmakers, 2004).

Les autres sources de production des radicaux libres sont représentées dans le **Tableau IV**. Elles sont classées en deux catégories :

Tableau IV. Principales sources de production des radicaux libres
(Poortmans et Boisseau, 2003)

Sources endogènes	Sources exogènes
<ul style="list-style-type: none">• Production de radicaux libres lors des respirations oxydatives (mitochondries)• Cellules phagocytaires• Métabolisme de l'acide arachidonique• Système xanthine/Xanthine oxydase• Inflammation	<ul style="list-style-type: none">• Rayonnement électromagnétique• Radiation ionisantes• Métaux de transition• Pesticides• Médicaments.....• Pollution diverses

4. Rôles physiologiques des radicaux libres

Le rôle des ERO est très compliqué car ils peuvent avoir un rôle physiologique ou un effet toxique en fonction de leur concentration. Dans des conditions normales, elles sont produites en faible quantité et jouent un rôle de messagers secondaires capables de réguler le phénomène de l'apoptose ou d'activité des facteurs de transcription, Ils sont impliqués dans le processus de fécondation, au cours duquel les spermatozoïdes sécrètent de grandes quantités d'ERO pour percer la paroi membranaire de l'ovule (Haleng et al., 2007) la défense immunitaire contre les agents pathogènes, la régulation de la dilatation capillaire et le fonctionnement de certaines neurones, notamment ceux de la mémoire (Pincemail et al., 2002 ; Valko et al., 2007).

5. Les cibles des radicaux libres :

Les radicaux libres peuvent être à l'origine de multiples lésions cellulaires. Leurs structures cibles essentielles sont l'ADN (modification des bases, casseur des brins)

Radicaux libres, Stress oxydant et activité antioxydante

(**Cherubini et al., 2005**), les membranes cellulaires (changement de la fluidité, perméabilité et altération des propriétés fonctionnelles des cellules) (**Poston et Raijmakers., 2004**), les protéines (modification structurales et fonctionnelles) (**Agostinho.,1996**), les lipides (peroxydation lipidique) (**Hu et al.,2005, Cherubini et al., 2005**) et toutes molécules prouvent être déstabilisées (**Pastre, 2005**).

C'est pourquoi, ils seraient impliqués dans le développement de maladies telles que le cancer, les maladies neuro-dégénératives et la pathogenèse des infections virales... Ils peuvent s'attaquer aux cellules du système immunitaire et donc altérer les réactions de défenses de l'organisme (**Poston et Raijmakers., 2004**).

II.2. Le stress oxydant

L'augmentation de la production des radicaux libres dans la cellule provoque le stress oxydant (**powers et al., 2011**) qui est un déséquilibre de la balance physiologique entre les systèmes de défenses antioxydants et la production d'ERO qui est présente dans la Figure7 (**Deaton et al., 2003 ; Jearamraja, 2005**). Il se produit lorsque la génération des radicaux libres excède la capacité du mécanisme de défense des antioxydants (**Poston et Raijmakers., 2004**).

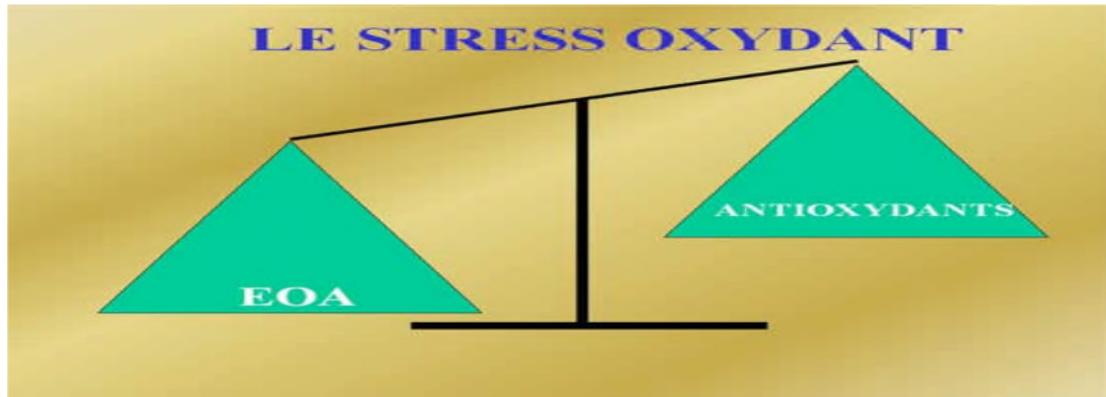


Figure 7 : Balance oxydants/ antioxydants en faveur d'un stress oxydatif

1. Origine du stress oxydant :

Le stress oxydant est un événement important dans la cellule (**Theriuelt et al ., 2006**). Les effets de ce stress sont les conséquences de l'oxydation des molécules importantes (**Jearamraja, 2005**), tels que les lipides, les protéines et l'ADN (**Thomas et al., 2010**).

2. Les maladies liées aux stress oxydatif :

Le stress oxydant provoqué par les ERO joue un rôle important dans l'apparition de plusieurs maladies chroniques et dégénératives (**Fu et al., 2011 ; Nair et al., 2012**). Le stress oxydant provoque l'oxydation des lipides de la membrane cellulaire (**Sun et al., 2011**) et affecte les fonctions physiologiques et mentales (**Miwa et Fujita, 2008**).

D'après (**Miwa et Fujita, 2008**) le stress oxydant augmente par la présence de divers facteurs de risque tels que : le tabagisme l'hypertension, le diabète et l'obésité.

II.3. Les systèmes de défense antioxydant

Pour protéger les tissus contre les effets nocifs des ERO, la cellule fait appel à des systèmes de défense appelés antioxydants (figure 8). Les antioxydants sont toute substance ayant la capacité de supprimer, retarder, prévenir, empêcher ou réparer un dommage oxydatif d'une molécule cible (Halliwell et Gutteridge, 2007). Ainsi, les antioxydants servent à contrôler le niveau des espèces réactives pour minimiser le dommage oxydatif (Tang et Halliwell, 2010).

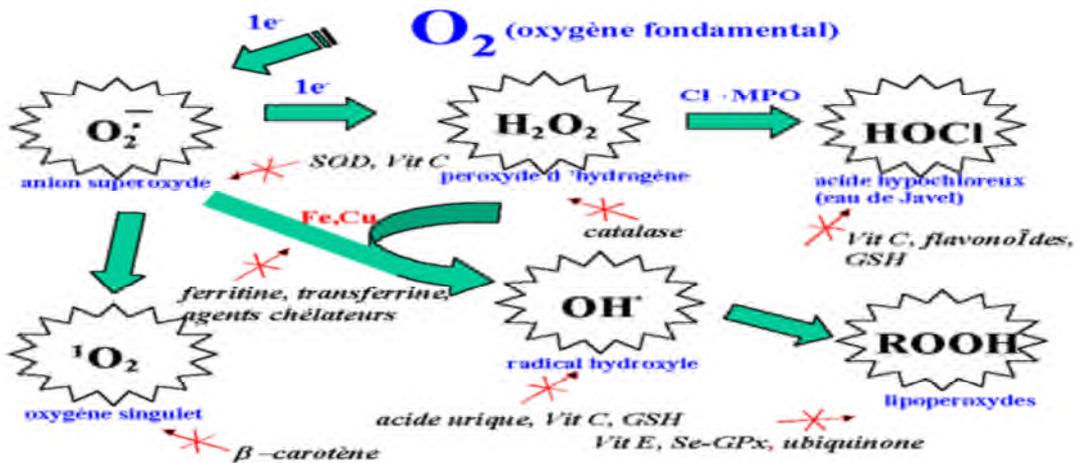


Figure 8 : les systèmes de défense antioxydant contre les espèces réactives de l'oxygène (Pincemail *et al.*, 1999).

1. Classification des antioxydants :

Les antioxydants peuvent être classés selon leur mode d'action, leur localisation cellulaire et leur origine. On distingue deux grandes classes : antioxydant de synthèse et antioxydant naturelle qui est partagé en antioxydant enzymatique et non enzymatique (figure 9).

Radicaux libres, Stress oxydant et activité antioxydante

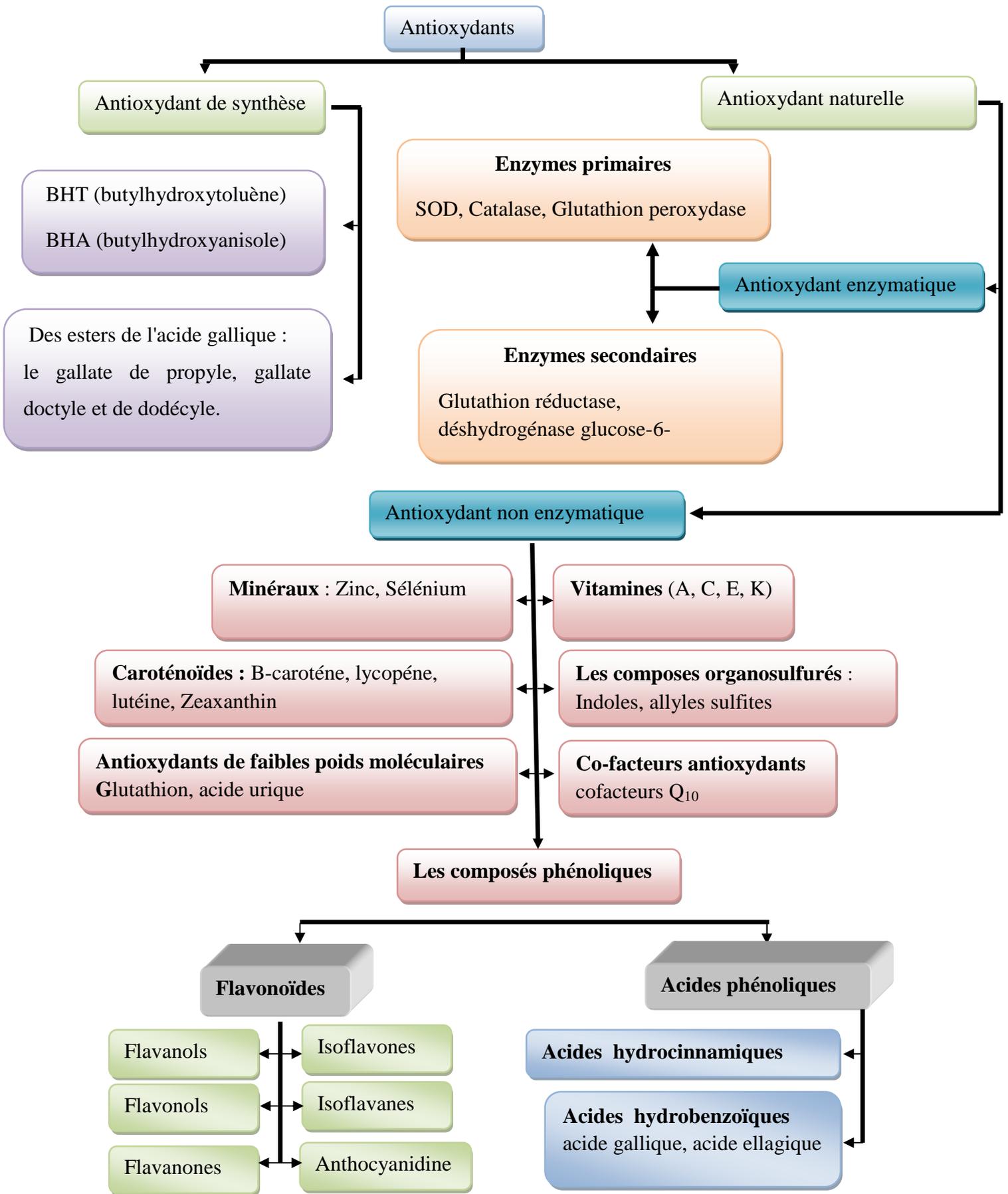


Figure 9: Classification des antioxydants (Ratnam et al., 2006)

1. les antioxydants de synthèse.

2. Les systèmes antioxydants d'origine naturelle

2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

Les enzymes constituent la première ligne de défense contre les radicaux libres qui repose principalement sur 3 enzymes (**Lehucher-Michel et al., 2010**).

➤ Super oxyde dismutase (SOD) :

Superoxyde dismutase est l'enzyme antioxydant la plus importante dans la défense contre le stress oxydatif (**Anderson et al., 1997**), qui est capable d'éliminer l'anion superoxyde en produisant une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène (**Gaté et al., 1999 ; Ratnam et al., 2006 ; Parrilla-Taylor et Zenteno-Savin, 2011**).



Il existe plusieurs enzymes qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (cytosolique, mitochondriale ou extracellulaire) (**Zelko et al., 2002**).

- SOD à manganèse (Mn-SOD) : protège la mitochondrie.

- SOD à cuivre zinc, protège le cytosol (cCu-ZnSOD), La face externe de la membrane des cellules endothéliales (ecCu-ZnSOD) ou Le plasma sanguin (pCu-ZnSOD).

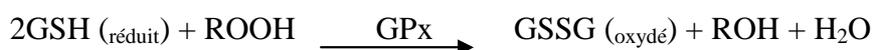
➤ Catalase :

La catalase est une enzyme capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. La réaction catalysée par cette enzyme consiste en une dismutation du peroxyde d'hydrogène (**Nancy et al., 2006**):



➤ Glutathion peroxydase (GPx) :

Une enzyme à cofacteur de sélénium se localise dans le cytosol et la matrice mitochondriale. La glutathion peroxydase constitue l'un des plus importants systèmes enzymatiques de protection car elle est capable de dégrader des peroxydes organiques (ROOH) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (**Lehucher-Michel et al., 2001**).



➤ Glutathion réductase (GR)

Radicaux libres, Stress oxydant et activité antioxydante

Est une flavo-protéine qui permet de régénérer le glutathion réduit GSH à partir de sa forme oxydée (GSSG) en utilisant le NAD(P) H comme cofacteur, cette enzyme est donc indispensable au maintien de l'activité de la glutathion oxydase et empêche une accumulation de glutathion oxyde qui provoque diverses perturbations métaboliques dont l'inhibition de la synthèse protéique (Albrecht *et al.*,1994). Elle se trouve dans le cytosol et les mitochondries.

2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydants, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation (Vitamine C et E, polyphénols,...). Les composés phénoliques, présents en grande quantité dans les fruits, les légumes et les extraits végétaux.

Tableau V : Les différentes activités antioxydant non enzymatiques.

Système de défense	Nature	Mode d'action
Activité antioxydant non enzymatique	Vitamine E (tocophérol) (Vertuani <i>et al.</i> ,2004).	empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par un stress oxydant.
	Vitamine C (acide ascorbique) (Vertuani <i>et al.</i> ,2004).	réagir avec des espèces réactives de l'oxygène comme HO [•] ou O ₂ [•] . Elle peut recycler l'α-tocophérol pour aider à prévenir l'oxydation des lipides
	Glutathion (Gerard-Monnier and Chaudiere,1996).	joue un rôle majeur dans la protection contre les altérations oxydantes des lipides, des protéines et des acides nucléiques et détoxifiant des résides
	Bêta carotène (Gardès-Albert <i>et al.</i> , 2003).	captation d'oxygène singulet ¹ O ₂ et fixation des métaux de transition.
	Les oligoéléments (Roussel, 2009)	agissent comme des antioxydants indirects via la régulation de l'homocystéinémie, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, la lutte contre l'inflammation et activités des enzymes antioxydantes.
	Les polyphénols (Ketsawatsakul <i>et al.</i> , 2000) (Gulcin <i>et al.</i> , 2010).	élimination des effets d'espèces réactives de l'oxygène ainsi que de chélater les différents métaux de transition.

Radicaux libres, Stress oxydant et activité antioxydante

--	--	--

Chapitre III

Composés phénoliques.

III. Les composés phénoliques

III.1. Définition

Les polyphénols sont des métabolites secondaires présents chez toutes les plantes vasculaires. **(Lebham, 2005)**. Ils constituent un des groupes le plus nombreux et largement distribué des substances dans le royaume des végétaux avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante. Ils résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales : la voie shikimate et acétate **(Lugasi et al, 2003)**.

L'élément structural de base est un noyau benzoïque auquel sont directement liés un ou plusieurs groupes hydroxyles, libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylque, ester, sucre...) **(Bruneton, 1993)**. Ce sont des molécules hydrosolubles, ils ont divers effets sur la physiologie végétale de part leurs actions antibactériennes et anti-fongiques. Ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes, etc...). Certains d'entre eux sont responsables d'amertume et d'astringence **(Adrian et Frangne, 1991 ; Milane, 2004)**.

III.2. Classification des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes **(Tableau VI)** qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'un simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation...), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines...) **(Harborne, 1989; Macheix et al., 1990)**

Tableau VI : Principales classes de composés phénoliques **(d'après Harborne, 1980; Macheix et al., 1990)**

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine(exemples)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ .C ₁	Acides Hydroxybenzoïques	p-hydroxybenzoïque	Epices, fraise
C ₆ .C ₃	Acides Hydroxycinamiques Coumarines	Acides caféïques Scopoléine	Pomme de terre, Pomme, Citrus
C ₆ .C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ .C ₂ -C ₆	Stilbène	Resvératrol	Vigne
C ₆ .C ₃ -C ₆	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine Diadzéine	Fruits, légumes, fleurs Soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, fruits à noyau
(C ₆ .C ₃ -C ₆) _n	Tanins condensés		Raisin, Kaki

III.2.1. Les composés phénoliques simples

Ce sont des dérivés en C₆ du noyau benzéniques, rares à l'état naturel et issus de la décarboxylation de l'acide shikimique (**Chira et al., 2008**) parmi les phénols simples : le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montrés pour leurs toxicités vis-à-vis des microorganismes (**Cowan, 1999**).

III.2.2. Les acides phénoliques

Ils regroupent deux classes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinamiques (**Macheix et al., 2006**).

a. Les acides hydroxy benzoïques

Ils sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆C₁ (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006). Ils incluent plusieurs molécules (figure 10).

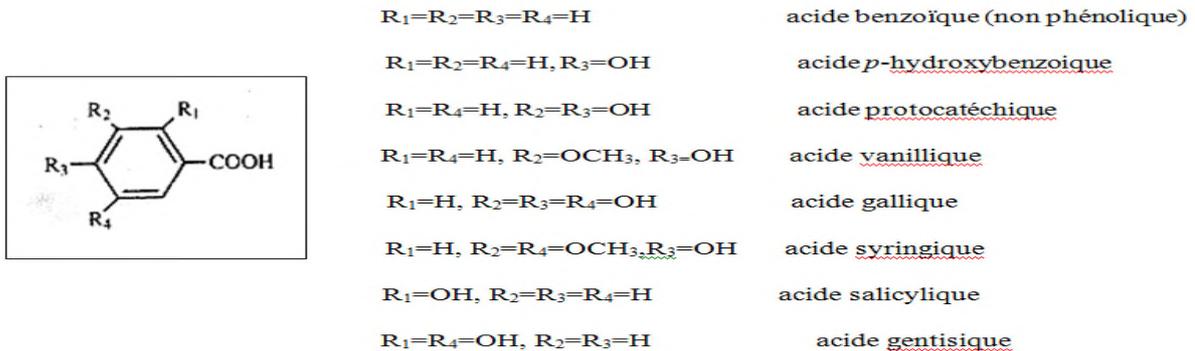


Figure 10 : Les principaux acides hydroxybenzoïques (Harborne,1989 ;Macheix *et al.*,1990)

b. Les acides hydroxycinnamiques (phénylpropanoïdes)

Ce sont des composés aromatiques à neuf atomes de carbones (C₆-C₃) (figure11). Quatre acides ont une distribution très large (acide p- coumarique, acide caféique, acide férulique, acide sinamique) (Bruneton, 1999). Ces acides se trouvent rarement à l'état libre, ils sont souvent estérifiés (Skerget *et al.*, 2005).

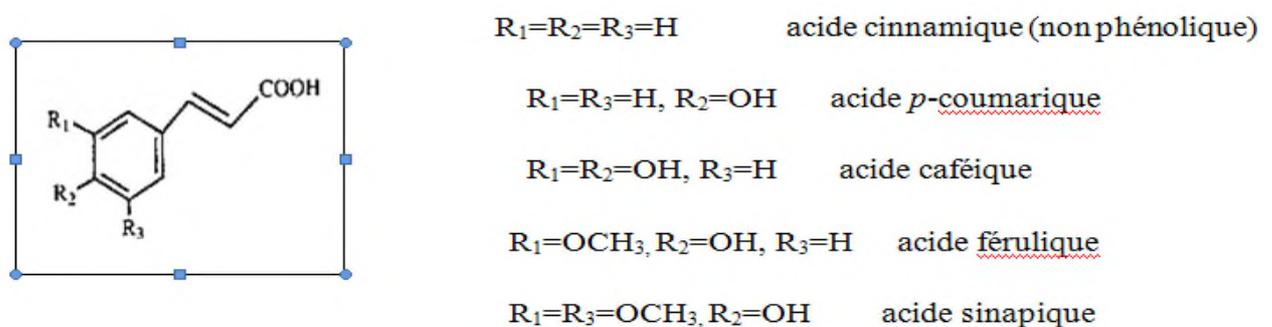


Figure11 : Les principaux acides hydroxycinnamiques (Harborne, 1989 ;Macheix *et al.*,1990)

III.2.3. Les flavonoïdes

L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour désigner les pigments ayant un squelette (C₆-C₃-C₆), provenant du mot latin flavus qui signifie jaune (Bouakaz, 2006). Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 109

tonnes par an, est converti en flavonoïdes (Lhuillier, 2007). Les plus couramment vendus ou utilisés en tant que compléments alimentaires (Ferguson, 2001).

➤ **Structures chimiques et classification**

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone (figure 12), fait de deux cycles benzéniques C6 reliés par une chaîne en C3 (Milane, 2004). Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone. Ils peuvent être divisés en diverses classes (Tableau VIII).

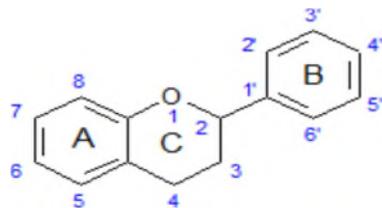


Figure12 : Structure de base des flavonoïdes (Dacosta, 2003)

Tableau VII: Principales classes de flavonoïdes (Bougandoura, 2011).

Classes	Structures chimiques	R3'	R4'	R5'	Exemples
Flavones		H	OH	H	Apigénine
		OH	OH	H	Lutéoline
		OH	OCH ₃	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	Eriodictyol
Anthocyanidines		H	OH	H	Pelargonidine
		OH	OH	H	Cyanidine
		OH	OH	OH	Delphéridine
Isoflavones		R5	R7	R4'	
		OH	OH	OH	Genisteine
		H	O-Glu	OH	Daidzeine

III.2.4. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation (**Hemingway, 1992**).

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides (**Cavin, 1999**).

Les tanins sont divisés en deux groupes :

a. Les tanins condensés (flavan-3-ols)

Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidines, sont largement répandus dans l'alimentation humaine. Ces tanins sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide à chaud par rupture de la liaison inter monomérique (**Guigniard, 1996**).

Contrairement aux tannins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ils ont la propriété de complexer les protéines du derme, d'où leur utilisation dans le tannage des peaux. Les polymères donnent une structure hérissée d'OH phénoliques capable de former des liaisons stables avec les protéines (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**)

- **Structure**

La structure complexe des tanins condensés est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leur centre asymétrique et leur degré d'oxydation. Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C2 et C3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B (**Figure 13**). On distingue ainsi les catéchines (dihydroxylées) des gallocatéchines (trihydroxylées) (**Bessas et al, 2007**).

b. Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des esters de glucides ou d'acide phénols, ou de dérivés d'acides phénols ; la molécule glucidique est en général du glucose, mais dans certains cas des polysaccharides. Ce groupe de tanins est caractéristique des Dicotylédones. Ces tanins en raison de leurs nombreux groupements OH se dissolvent plus ou moins (en fonction de leur poids moléculaire) dans l'eau, en formant des solutions colloïdales (**Guigniard, 1996**).

- **Structure**

Les tanins hydrolysables sont constitués d'un noyau central -le glucose- et de chaînes latérales (en position 1, 2, 3, 4 ou 6 sur le glucose) comprenant 1 à n monomère(s) d'acide phénol. Des liaisons carbone à carbone entre noyaux (liaisons biphenyles réalisées par

couplage oxydatif), conduisent à des molécules ramassées plus rigides de solubilité diminuée dites les tanins éllagiques (Bessas et al, 2007).

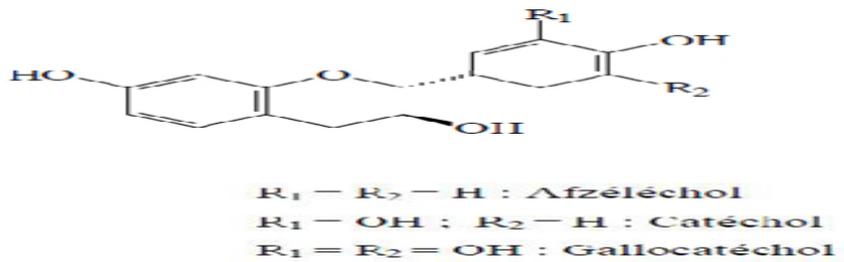


Figure 13 : Structure de queleques tanins.

III.2.5. Les coumarines

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus (Figure 14). Elles sont substituées en C-7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'ombelliférone, est le précurseur des coumarines 6,7-di-et 6, 7,8-trihydroxylées.

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Igor, 2002).

Les coumarines sont connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du coeur), hypotensives ; elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (Gonzalez et Estevez-Braun, 1997).

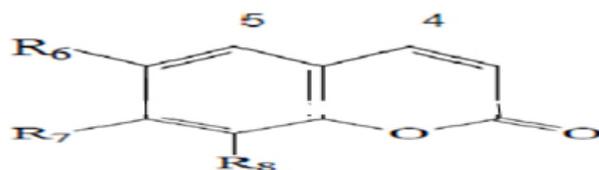


Figure14 : Structure de base des coumarines

III.2.6. Les quinones

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orange et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K, qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, dans les médicaments et dans les fongicides (Kansole, 2009).

III.2.7. Les stilbènes :

Les membres de cette famille possèdent la structure C6-C2-C6 comme les flavonoïdes, ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux. Les sources principales des stilbènes sont les raisins, les vins, le soja et les arachides (Crozier *et al.* 2006).

III.2.8. Lignanes :

Ce sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6-C3). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante dix familles. (Figure 15)

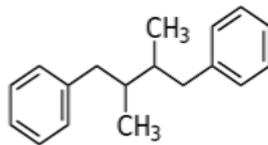


Figure 15 : Structure de la lignane (Scalbert et Williamson, 2000).

III.2.9. Lignines

Les lignines constituent 15 à 35% du bois des Angiospermes et des Gymnospermes. En raison de leur caractère hydrophobe marqué, les lignines s'accumulent au niveau des parois des cellules. Elles résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois unités phénoliques de base, dénommées monilignols et qui sont les alcools coumarylique, coniférique et sinapylique. (Figure16)

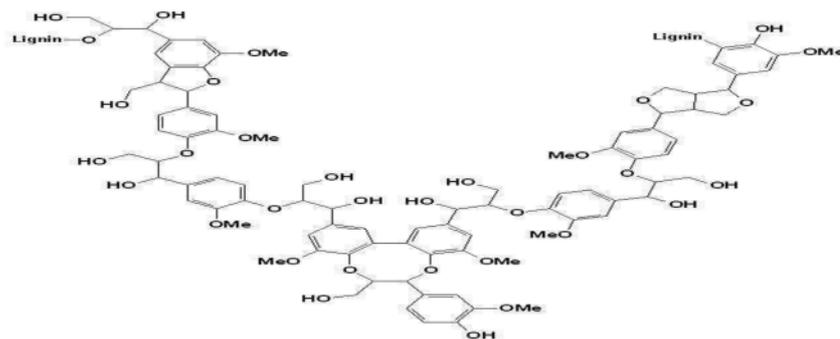


Figure16 : Structure de la lignine (Scalbert et Williamson, 2000).

III.3. Biosynthèse des composés phénoliques

Les grandes lignes des voies de biosynthèse des principaux composés phénoliques sont maintenant bien connues.

Les deux acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) sont présents dans les protéines mais sont également à l'origine de la formation de la plupart des molécules phénoliques chez les végétaux (Sarni et Cheymer 2006). Ces composés sont issus par deux grandes voies métaboliques :

III.3.1. voie de l'acide shikimique

Elle conduit à la formation du précurseur immédiat des phénols par désamination de la phénylalanine. La séquence biosynthétique qui suit, dénommée séquence des phénylpropanoïdes, permet la formation des principaux acides hydroxycinnamiques. Les formes actives de ces derniers avec le coenzyme A permettent d'accéder aux principales classes des composés phénoliques citant quelques transformations :

- vers les acides de la série benzoïque (acides gallique, protocatéchique...) par Béta-oxydation. L'acide gallique lui-même, par combinaison avec des sucres simples, conduit aux tannins hydrolysables (tannins galliques et ellagiques)
- vers les estres de type chlorogénique par estérification avec un acide alcool (acide quinique, tartrique, shikimique...) (**Sarni et Cheymer 2006**).
- vers les coumarines, par cyclisation interne des molécules suivie de modifications complémentaires (glycosilations, prénylations...)
- vers les lignines par réduction, formation des monolignols puis polymérisation oxydative initiée dans la paroi cellulaire par les peroxydases et éventuellement les laccases. (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**))

III.3.2. la voie d'acétate malonate

Elle conduit par condensations répétées à des systèmes aromatiques ex : les chromones, les isocoumarines, et les quinones. La pluralité structurale des composés phénoliques due à cette origine biosynthétique est encore accrue par la possibilité très fréquente d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration des composés mixtes comme les flavonoïdes, les stilbènes et les xanthones. (**Fleeger et Flipse, 1964**).

III.4.Mécanismes d'action des composés phénoliques

III.4.1.Le piégeage des radicaux libres

Les propriétés antioxydantes des polyphénols sont souvent associées à leur forme radicalaire. En effet, leur structure chimique aromatique permet une délocalisation confère la capacité de piéger les radicaux et les ERO(radicaux superoxydes, hydroxyle, peroxydes et alkoxydes)(**Hennebelle et al., 2004; Pastre,2005**). Le piégeage des radicaux libres par les polyphénols est illustré dans la (**figure17**).

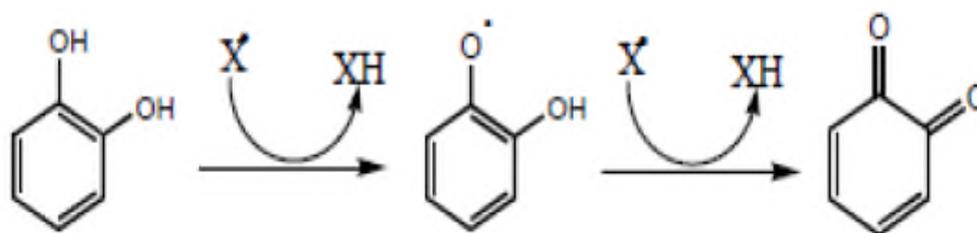


Figure 17 :Piégeage des radicaux libres par les polyphénols(Marfak,2003).

III.4.2.Chélation des métaux

La production de radicaux hydroxyles très réactifs à partir de l'espèce moins réactive H_2O_2 via la réaction de Fenton a comme origine les ions métalliques comme le fer ou le cuivre (Macheix *et al.*,2005)

Les composés phénoliques ont la propriété de chélater les métaux à forte charge positive (tel que le Cu^{2+} , le Fe^{3+} , et l' Al^{3+}). En complexant les ions métalliques, ces composés forment des complexes stables (Figure 18) en occupant tous les emplacements, ils sont alors capables d'inhiber la réaction de Fenton et ainsi empêcher la production d'ERO ou leur interaction avec les intermédiaires lipidiques (Lee *et al.*,2004, Macheix *et al.*,2006)

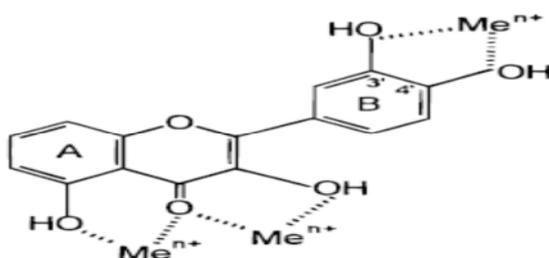


Figure 18: Sites de Chélation des métaux de transition par les flavonoïdes (Pietta, 2000).

III.4.3.La complexation des protéines

L'une des propriétés majeures des polyphénols, particulièrement les tannins, est leur capacité à lier et précipier les protéines en formant des complexes. Un exemple simple de conséquence de cette complexation est l'astringence qui est due à des interactions entre les polyphénols et les protéines salivaires. L'interaction tannins-protéines (figure 19) débute par des liaisons hydrophobes entre les deux molécules, rapidement complétées par un réseau de liaisons hydrogènes et par des liaisons ioniques. Le complexe ainsi formé précipite lorsqu'il est suffisamment hydrophobe (Dangles,2006) :

- Liaison hydrogènes entre les groupements phénols et différents groupes récepteurs (-NH-, -CO-, -OH) des protéines ou d'autres polymères ;
- Liaisons ioniques entre des groupements anioniques des phénols et des groupes cationiques des protéines ;
- Interactions hydrophobes, provenant entre les résidus d'acides aminés peu polaires et les cycles aromatiques des polyphénols (**Richard et al., 2006**)

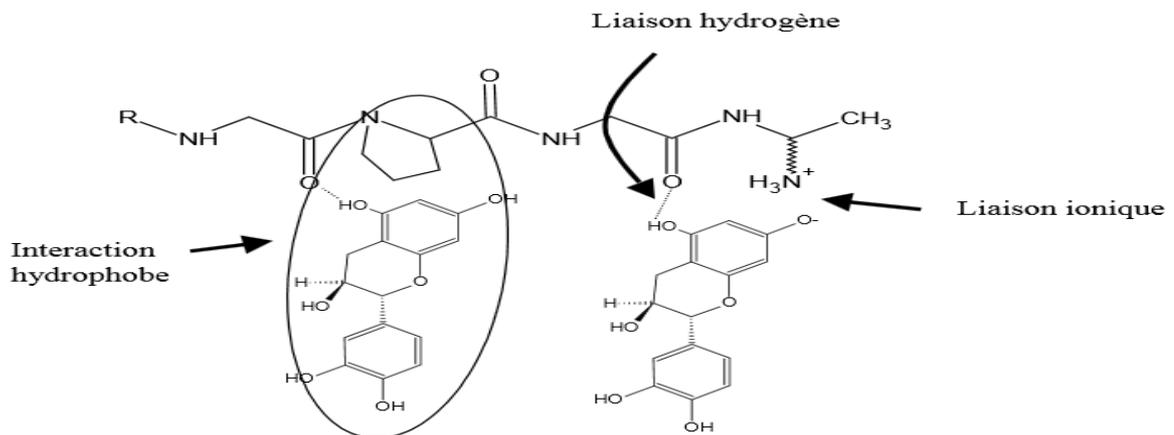


Figure 19 :Les différents types de liaison des polyphénols avec les protéines (**Simon, 2003**).

III.5.intérêt des composés phénoliques

III.5.1. Applications industrielles des polyphénols

De telles propriétés ont donc été exploitées, et trouvent des applications dans de nombreux domaines industriels : en agroalimentaire, en cosmétique et dans l'industrie pharmaceutique.

Grâce aux propriétés antimicrobiennes de certains polyphénols comme les flavan-3-ols, les flavanols et les tanins, il est désormais possible de développer des conservateurs alimentaires et de nouvelles thérapies dans de nombreuses maladies infectieuses en considérant la résistance microbienne face à certains traitements antibiotiques (**bruneton, 1999**).

La capacité antioxydante de composés comme les polyphénols est utilisée dans l'alimentation pour lutter contre la peroxydation lipidique et ainsi permettre une meilleure stabilisation des denrées alimentaires. Ils sont également préconisés pour améliorer la stabilité de pigments de jus colorés (comme le jus de betterave), d'arômes alimentaires, et rentrent dans la composition de produits pharmaceutiques pour des utilisations par voie orale et des cosmétiques pour des applications locales (**Moure et al., 2001**).

III.5.2. Role Chez les végétaux

En plus de leur rôle structural (lignine), les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, seraient impliqués dans la défense des plantes contre les agressions extérieures (rayon UV, microorganismes). Ils assurent aussi la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs et les disperseurs de graines (Stalikas, 2007).

III.5.3. Chez les humains

Les exemples de quelques composés phénoliques et de leurs activités biologiques sont récapitulés dans le **Tableau VIII**.

Tableau VIII: Propriétés biologiques des quelques polyphénols dans l'organisme

Polyphénols	Activite biologique	Auteurs
Acides phénols (cinamiques et benzoïques)	Antibactériennes, anti-ulcéreuses antiparasitaires, antifongiques, antioxydantes	(Sannomiya M <i>et al.</i> ,2005) (Gurbuz I <i>et al</i> 2009)
Coumarines	Protectrices vasculaires, anti-inflammatoires, anti parasitaires analgésiques et anti oedémateuses	(Ito C <i>et al.</i> , 2005), (Smyth T <i>et al.</i> ,2009)
Flavonoïdes	Antitumorales, antiparasitaires, vasodilatatoires, antibactériennes, anti carcinogènes, anti-inflammatoires, analgésiques, hypotenseurs, antivirales, diurétiques, ostéogène, antioxydantes, anti-atherogéniques antithrombotique, anti-allergique	(Wollgast J., Anklam E., 2000) (Hitara Tet <i>et al.</i> ,2009) (Tripoli E <i>et al.</i> ,2007)
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, anti oxydant	(Bruneton J, 1993)
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydant, antitumoral, antifongique et anti-inflammatoire	(Masquelier <i>Jet al.</i> , 1979)
Tannins galliques et caté- chiques	Antioxydantes	(Okamura H <i>et al.</i> ,1993), (Kubata BK <i>et al.</i> ,2005)
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques	(Kim J Y <i>et al.</i> ,2009)

Matériel et Méthodes

I. Matériel et méthodes

I.1. Matériel végétal :

I.1.1. Récolte

Les échantillons (gousses de caroube mûres) utilisées au cours de ce travail proviennent des montagnes de la commune de Tazmalt (Wilaya de Bejaia), elles ont été récoltées fin août 2010.

I.1.2. Conservation

1. Séchage :

Après la récolte, les fruits de *Ceratonia siliqua* L. ont été décortiqués manuellement (séparation de la pulpe et des graines) puis séchés à l'abri de soleil.

2. Broyage et tamisage :

Les échantillons sont réduits en poudre dont la taille des particules est inférieure à 500µm à l'aide d'un broyeur de type « IKA A11basic ». Les broyats sont alors conservés dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière pour des analyses ultérieures.

I.2. Extraction et dosage des composés phénoliques :

I.2.1. Extraction

L'extraction des composés phénoliques (**Figure 20**) est faite par macération selon la méthode d'**Oomah et al (2010)** ; trois solvants d'extraction (Ethanol 80%, Méthanol 80% et Eau distillée) sont utilisés avec trois parties de fruit de *Ceratonia siliqua* (gousse entier, pulpe, graine).

Principe

Quand une matrice est en contact avec un solvant, les composants solubles dans le matériel migrent vers le solvant ; Ainsi, l'extraction est due au transfert de matière du principe actif de la matrice vers le solvant, selon un gradient de concentration (**Handa et al., 2008**).

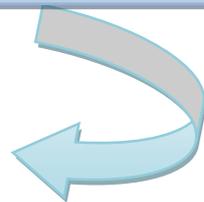
Mode opératoire :


4 g de poudre

160 ml de solvant (éthanol 80%,
méthanol 80% , Eau distillée)



Agitation pendant 2h



Filtration sous vide



Centrifugation à 4500 trs /15 min



Filtration avec des filtres seringue



Evaporation du solvant d'extraction avec
un rotavapeur à 40°C



Lyophilisation



Figure 20: Protocole d'extraction des polyphénols (Oomahet *al.*, 2010).

Le rendement d'extraction de chaque extrait est calculé par la formule suivante :

$$\text{Taux d'extraction (\%)} = [(P_f)/P_i] * 100$$

P_f: Poids de l'extrait après lyophilisation(g).

P_i: Poids de l'échantillon initial(g).

I.2.2.Dosage des composés phénoliques :

1. Dosage des phénols totaux solubles :

La teneur en composés phénoliques est estimée selon la méthode de **Skерget *et al.*, (2005)**.

- **Principe :**

Le réactif de Folin-Ciocalteu, mélange de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle au taux des composés phénoliques présents dans le milieu réactionnel (**Ribéreau-Gayon, 1968 ; Laporniket *al.*, 2005**).

- **Mode opératoire :**

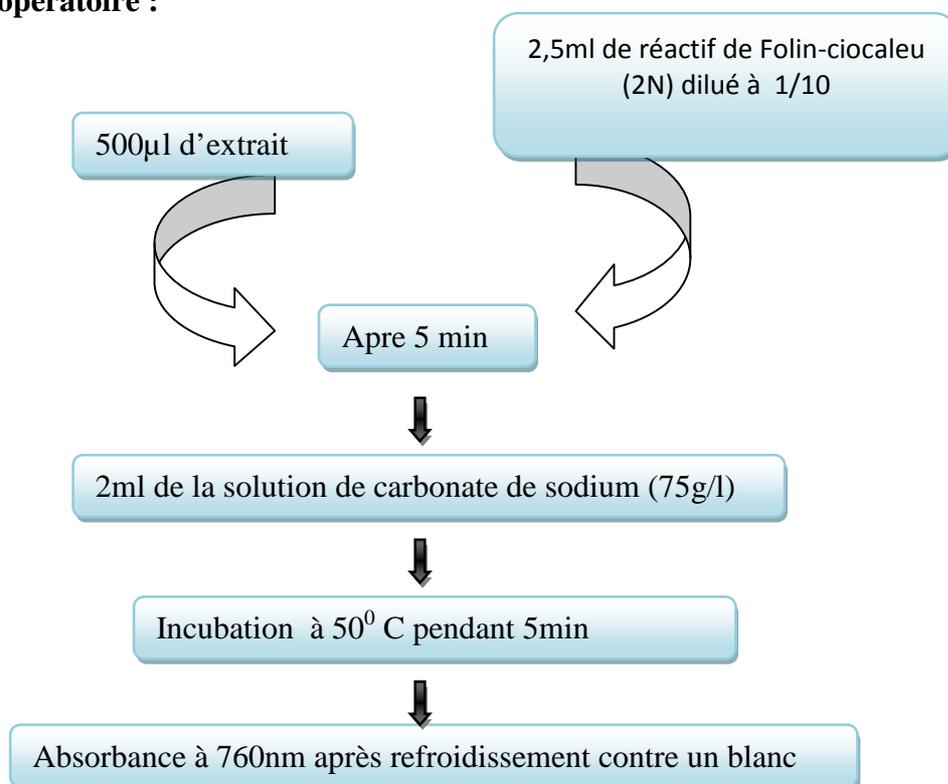


Figure 21 : Protocole de dosage des phénols totaux soluble (**Skерget *et al.*, (2005)**).

Les concentrations en phénols totaux solubles sont déterminées par référence à une courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide gallique (annexe1). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique (EAG) par g d'échantillon (mg EAG/g).

2. Dosage des flavonoïdes :

Le contenu en flavonoïdes des différents extraits est estimé par la méthode de **Lamaison et carnet., (1990)** citée par **Bahri-Sahloul (2009)**.

• Principe

La méthode repose sur le principe du dosage direct par le chlorure d'aluminium. En effet, les flavonoïdes possèdent un groupement hydroxyle (OH) libre en position 5, susceptible de donner en présence de chlorure d'aluminium un complexe jaunâtre par chélation de l'ion Al^{3+} . La coloration jaune produite est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes présente dans l'extrait (**Ribereau-Gayon, 1968**).

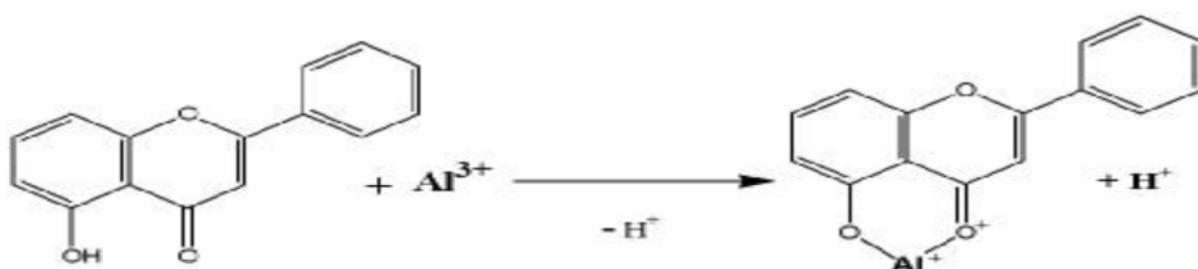


Figure22: Réaction du Chlorure d'Aluminium avec les flavonoïdes(**Ribéreau- Gayon, 1968**).

• Mode opératoire :

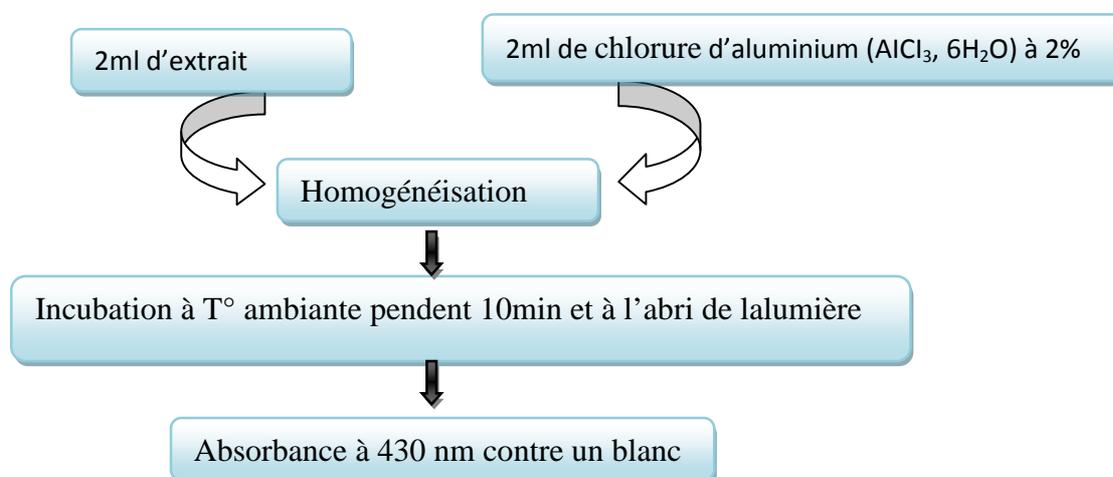


Figure23 : Protocole de dosage des flavonoïdes (**Lamaison et carnet., 1990**).

La teneur en flavonoïdes est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue avec la Quercétine (annexe1). Les résultats sont exprimés en mg équivalent de Quercétine (EQ) par g d'échantillon (mg EQ/g).

3. Dosage des tanins hydrolysables :

Le dosage des tanins hydrolysables est réalisé par la méthode au chlorure ferrique rapportée par **Mole et Waterman, (1987)**.

- **Principe**

Les tanins hydrolysables réagissent avec le chlorure ferrique et donnent une coloration bleue mesurée par spectrophotométrie (**Mamadou, 2002**)

- **Mode opératoire**

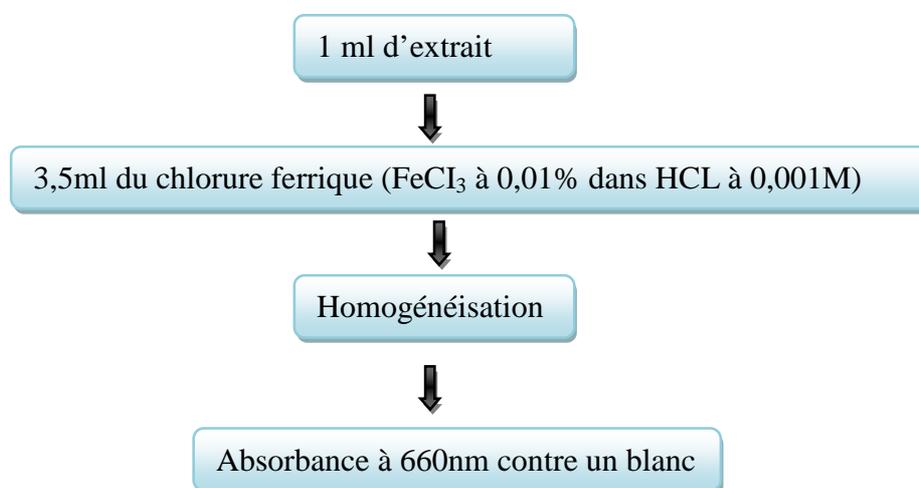


Figure 24: Protocole de dosage des tannins hydrolysables (**Mole et Waterman, 1987**).

La teneur en tannins hydrolysables est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue avec l'acide tannique (annexe). Les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide tannique/g d'échantillon (mg EAT / g).

4. Dosage des tanins condensés :

la méthode à la vanilline décrite par **Deshpande et al., 1986** ; est utilisée pour le dosage des tanins condensés.

- **Principe :**

Cette méthode est basée sur la capacité de la vanilline à réagir avec les unités des tanins condensés dans un milieu acide pour produire un complexe rouge (figure25) mesuré à 500 nm (Hagerman ,2002).

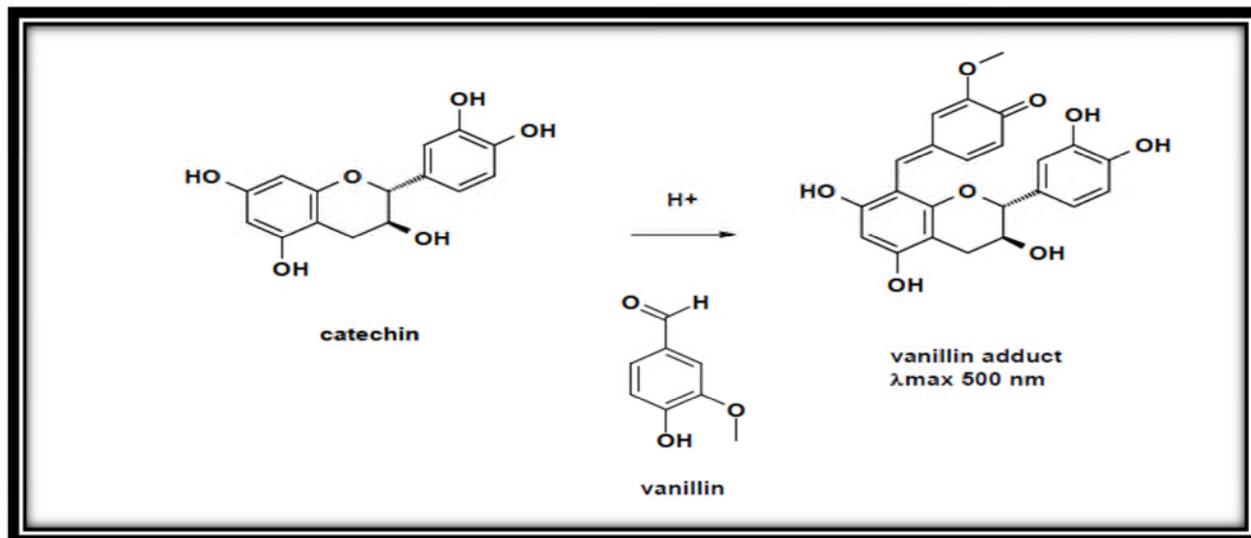


Figure25 : Réaction de la vanilline avec la catéchine (Hagerman ,2002)

- **Mode opératoire :**

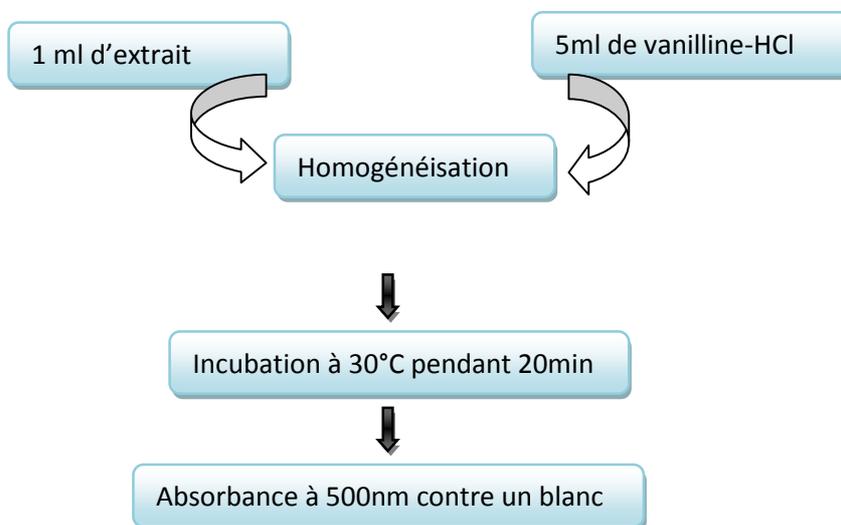


Figure26: Protocole de dosage des tanins condensés (Deshpande et al., 1986).

La teneur en tanins condensés est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage obtenue avec la catéchine (annexe1). Les résultats sont exprimés en mg équivalent catéchine /g d'échantillon (mg EC / g).

5. Dosage des phénols polymérisés :

La méthode de **Hagerman et Butler (1978)** est suivie pour déterminer la teneur de nos extraits en tannins précipités; elle repose sur la précipitation de la protéine (Sérum albumine bovine BSA) par les tanins dans un milieu acide. Elle permet ainsi la séparation de ces derniers des autres polyphénols présents dans l'extrait.

- **Principe:**

Le dosage des phénols polymérisés est basé sur la formation d'un complexe tanins-protéines ; le précipité est dissous dans un détergent et les composés phénoliques réagissent avec le chlorure ferrique pour former un chromatophore qui absorbe à 510nm (**Hagerman 2002**).

- **Mode opératoire :**

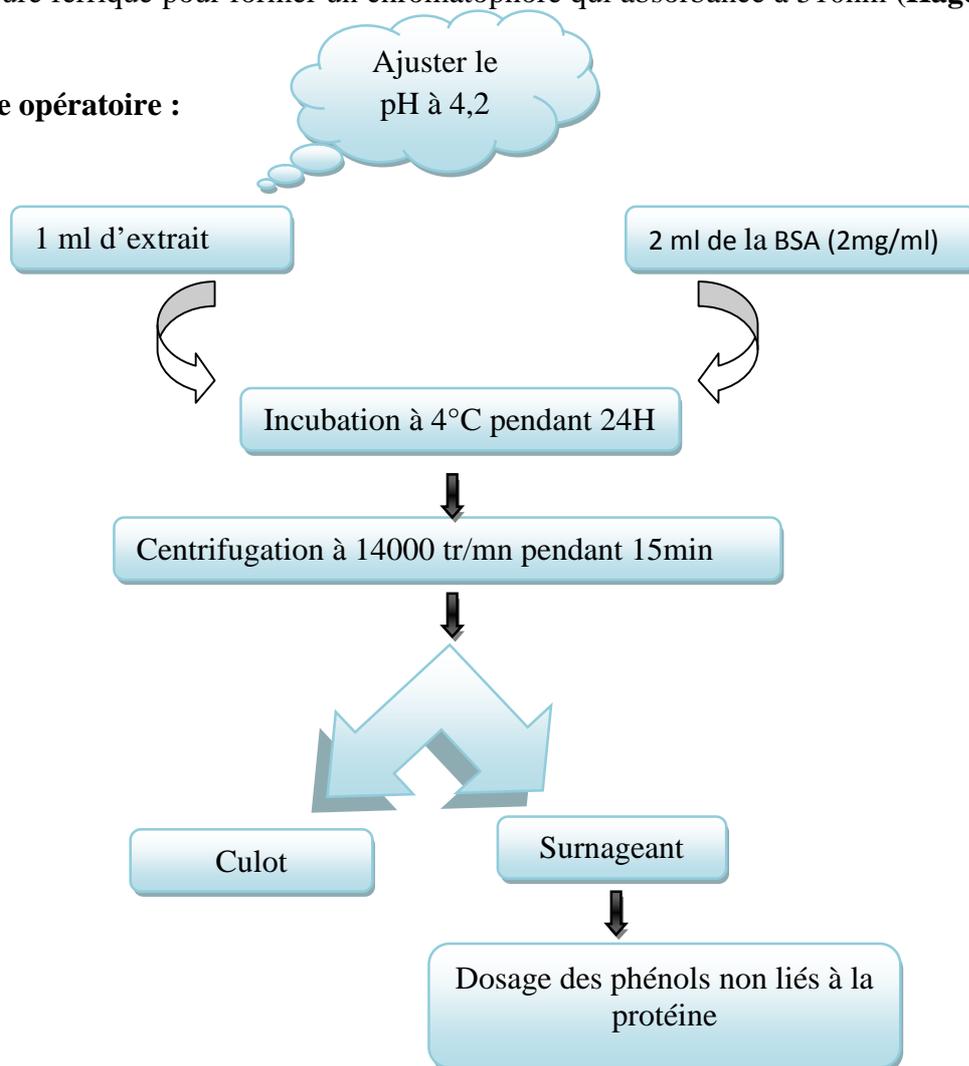


Figure 27 : Protocole de dosage des phénols polymérisés par la méthode de précipitation par la BSA (**Hagerman 2002**).

La teneur en tannins de l'extrait est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage (annexe 1), préparée avec l'acide gallique, et exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'échantillon (mg EAG/g ES).

I.3. Etude *in vitro* de l'activité antioxydante

Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par deux mécanismes : transfert d'électrons ou par transfert d'atome d'hydrogène qui est réalisé par quatre tests : l'effetscavenger du radical DPPH déterminé par la méthode de **brand- william (1995)** et le pouvoir réducteur mesuré selon la méthode d'**Oyiazu *et al* (1986)**, le test de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est réalisé selon la méthode de **Ruch *et al* (1989)** et la chélation de fer ferreux est été évalué selon la méthode de **Zahoo *et al* (2006)**.

Tous les extraits lyophilisés ont fait l'objet de chacun de ces tests après reconstitution dans le méthanol.

I.3.1. Pouvoir anti-radicalaire du DPPH[•]

Principe

La méthode du DPPH[•] est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire stable DPPH[•] (violet) en présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène (AH), qui aboutit à la formation d'une forme non-radicalaire le DPPH-H (jaune) (**Figure 28**). La réduction du DPPH[•] en DPPH-H se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH[•], mesurable par spectrophotométrie de 515-518 nm.

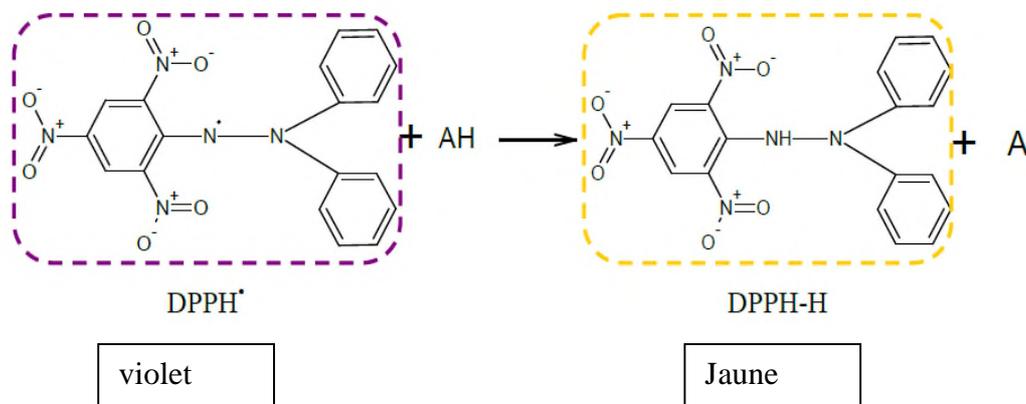


Figure 28 : Réduction du radical DPPH

Mode opératoire :

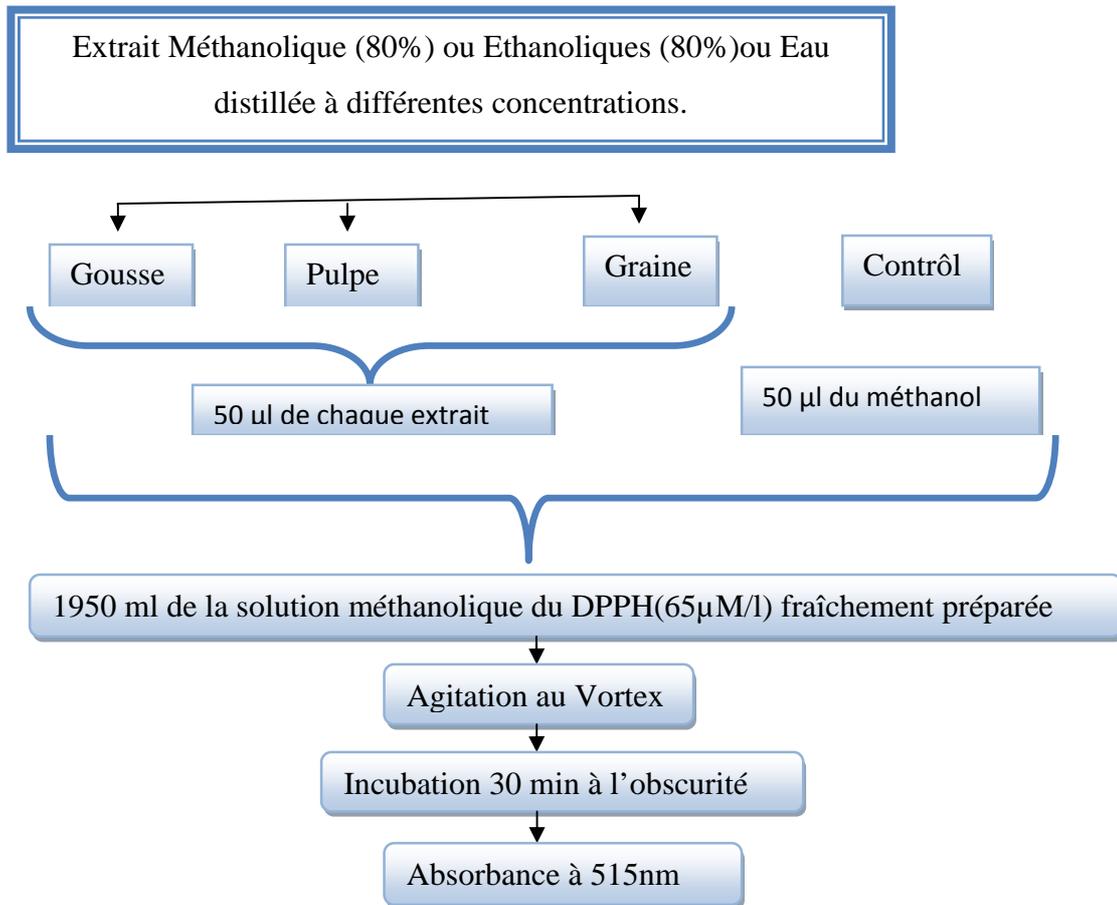


Figure 29 : Activité antioxydante du radical DPPH (brand- william.,1995)

Un témoin positif avec l'acide ascorbique et BHT est réalisé dans les mêmes conditions. La capacité antioxydante de nos échantillons exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH• suivant l'équation:

$$\% \text{Inhibition} = \frac{\text{Abscontrôle} - \text{Abséchantillon}}{\text{Abscontrôle}} \times 100$$

- Abs contrôle : correspond à l'absorbance du contrôle
- Abs échantillon : correspond à l'absorbance de l'échantillon

Ainsi plus la perte de couleur est rapide plus le donneur d'hydrogène est considéré comme unAntioxydant fort.

La concentration (IC50) en extrait brut permettant de réduire 50 % du DPPH est déterminée en traçant une courbe de pourcentage de réduction en fonction de la concentration par le biais du logiciel graph pad.

I.3.2. Le pouvoir réducteur du fer

Principe :

la présence d'un composé réducteur dans les échantillons entraîne la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) du complexe ferricyanure en fer ferreux (Fe^{2+}), dans un milieu acidifié par l'acide trichloracétique, cette réaction se traduit par le virage de la couleur jaune du ferricyanure de potassium vers la couleur bleu verte, dont l'intensité dépend du pouvoir réducteur (Li et al., 2009)

Mode opératoire:

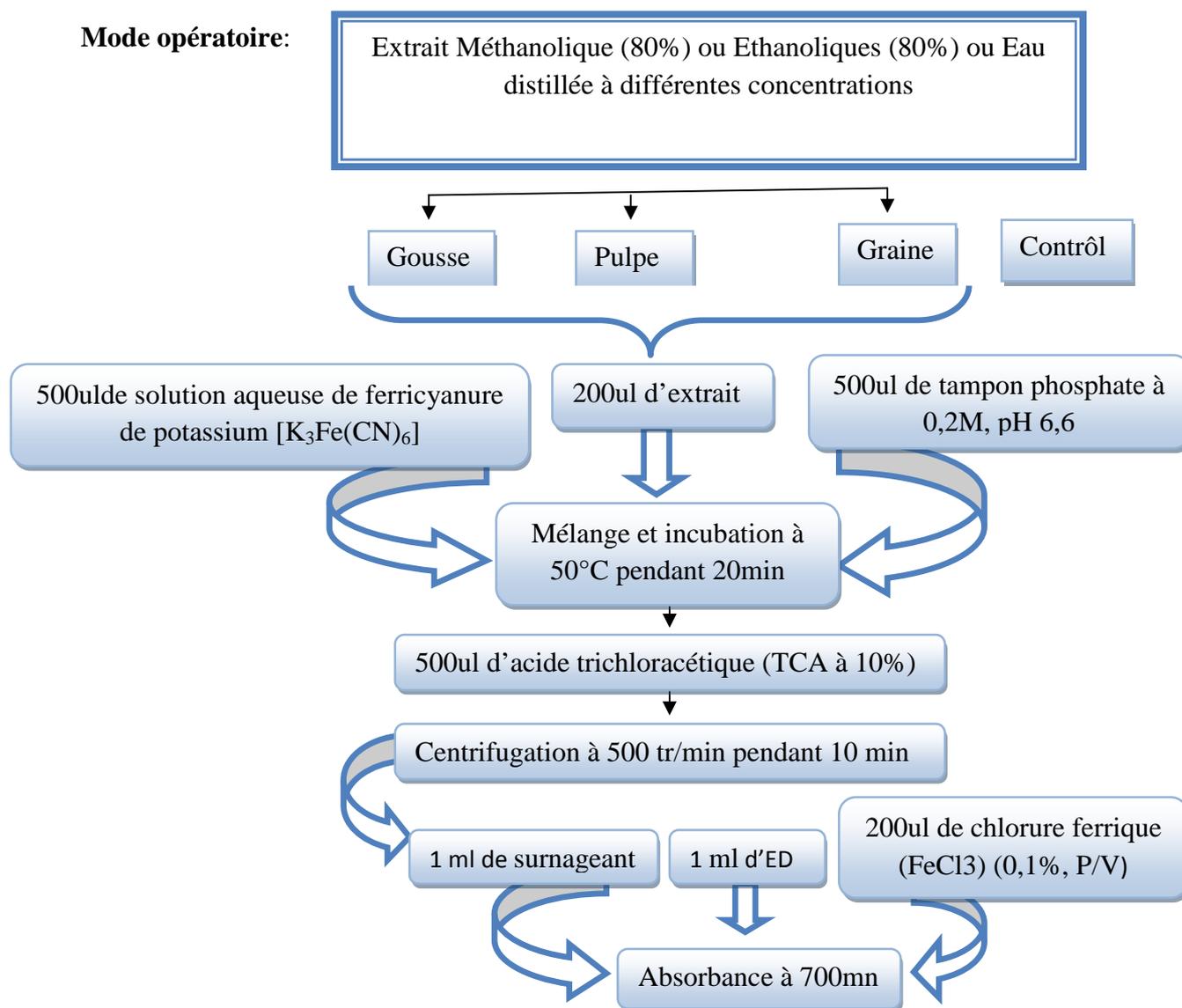


Figure 30: Activité antioxydante de pouvoir réducteur (Li et al., 2009)

L'augmentation de l'absorbance dans le milieu réactionnel indique l'augmentation de la réduction de fer. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

La concentration (IC50) des extraits bruts permettent d'avoir une ABS de 0,5 (Jabri-Karoui et al., 2012) est déterminée en traçant une courbe des absorbance (ABS) en fonction de la concentration par le biais du logiciel pad.

I.3.3. Inhibition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :

Principe :

Cette réaction est basée sur l'étude du potentiel antioxydant des extraits avec le peroxyde d'hydrogène. Le principe de la réaction est l'inhibition du peroxyde d'hydrogène par un antioxydant selon la réaction suivante (Wettasinghe et Shahude, 2000)



La capacité des extraits à piéger le peroxyde d'hydrogène a été déterminée par la méthode de Ruch et al., 1989

Mode opératoire :

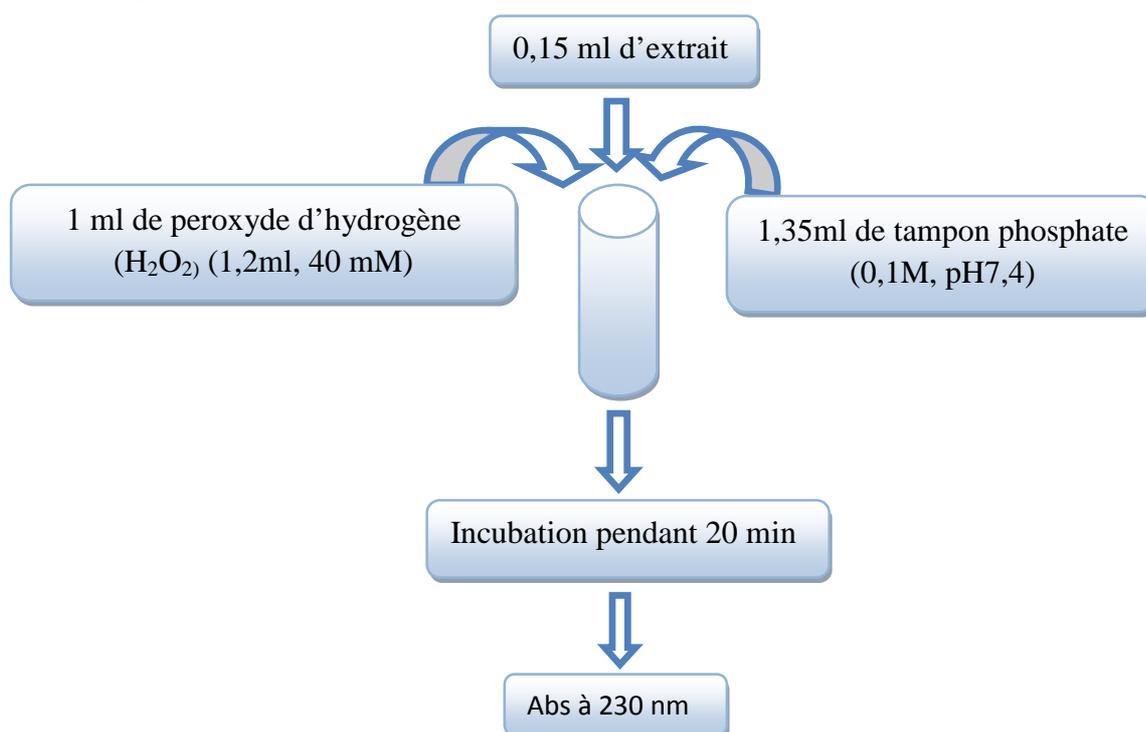


Figure 31: activité antioxydante de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Ruch et al., 1989)

Le pouvoir d'inhibition a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{Inhibition} = \frac{A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} \times 100$$

A Contrôle : correspond à l'absorbance de contrôle

A échantillon: correspond à l'absorbance d'extrait

I.3.4. Chélation du fer ferreux :

La chélation des ions ferreux a été estimée selon la méthode de **Zhao et al. (2008)** cité par **Bourgouet et al (2008)**.

Principe :

La ferrozine réagit avec les ion divalents pour former un complexe violet ou rouge très soluble dans l'eau. L'absorbance du complexe ferrozine-Fe²⁺ est maximale à 562 nm (**Norshazila et al.,2010**). En présence d'agents chélateurs, la formation de ce complexe est perturbée aboutissant à une diminution de la couleur qui est suivie spectrophotométrique.

Mode opératoire

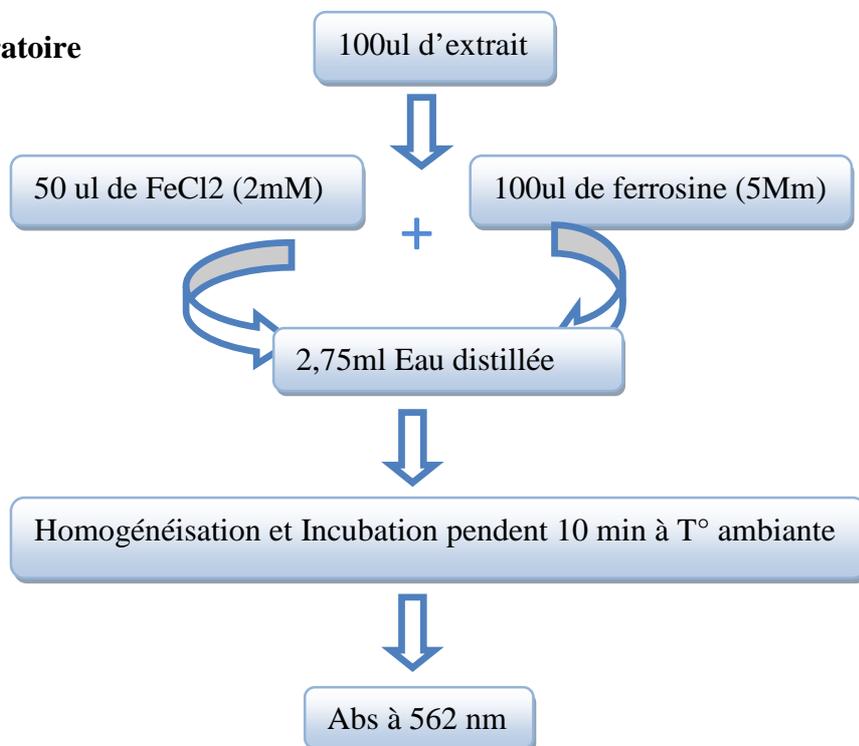


Figure 32: activité antioxydant de chélation de fer ferreux (**Zhao et al. (2008)**)

Un témoin positif avec l'EDTA est réalisé de la même manière.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{Inhibition} = \frac{Ac - Aéch}{Ac} \times 100$$

- Ac : correspond à l'absorbance du contrôle

- Aéch : correspond à l'absorbance de l'échantillon

I.4. Analyse statistiques des résultats

Toutes les déterminations sont menées en triples. Les résultats sont exprimés par la moyenne \pm écart type.

Les résultats ont fait l'objet d'une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'une comparaison multiple des moyennes grâce au logiciel statistica version 5.5.

Les IC50 des testes (DPPH et pouvoir réducteur) ont été calculés à l'aide de logiciel graphe pad.

Résultats

II. Résultats

II.1. Teneur en composés phénoliques

II.1.1. Teneur en phénols totaux solubles :

Les résultats de dosage des phénols totaux solubles (**Figure32**) révèlent une variabilité de teneur entre les différents extraits. L'analyse de la variance montre un effet significatif ($p < 0,05$) du facteur solvant et une interaction entre les deux facteurs étudiés (partie de la plante et solvant). Le contenu en PTS varie de 3,27 à 7,34 mg Eq AG/ g MS

La substitution partielle de l'eau distillée par du méthanol et de l'éthanol s'accompagne d'une diminution significative ($p < 0,05$) de la teneur en PTS de la gousse (37% et 20% respectivement) ; par contre nous notons une augmentation significative ($p < 0,05$) de 25,5 à 34,9% dans le cas de la graine. La pulpe ne voit pas sa teneur en PTS varier en fonction du solvant ($p > 0,05$)

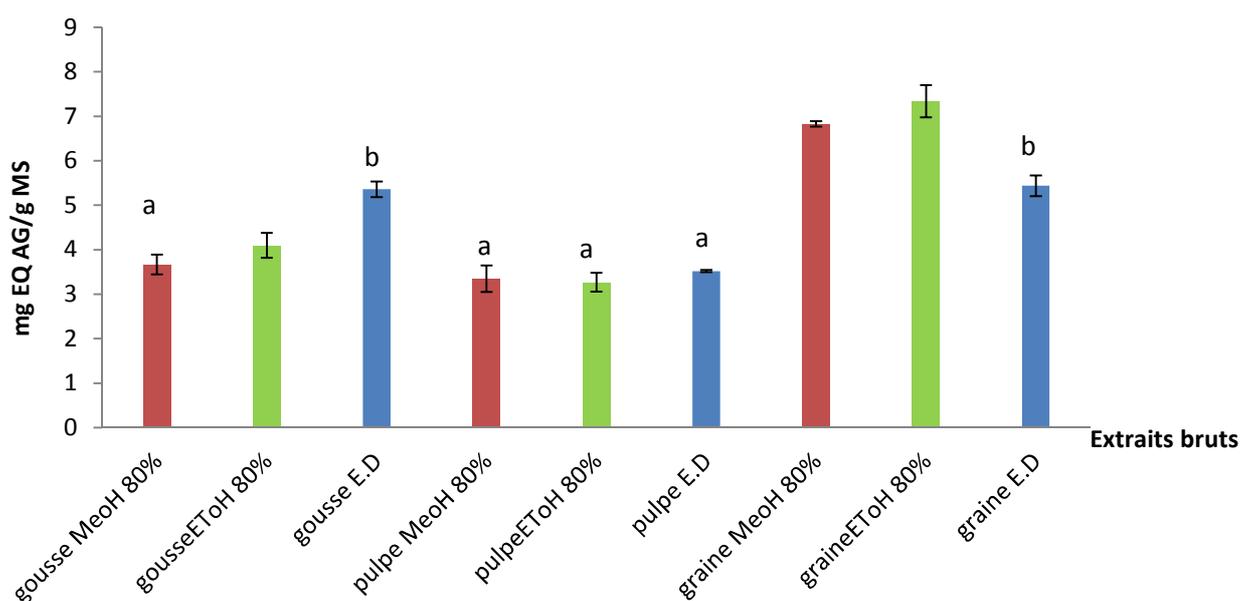


Figure33 : Teneur en phénols totaux solubles.

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

Les barres verticales représentent l'écart type.

Pour un même solvant hydro-alcoolique, les extraits de graine affichent les teneurs les plus élevées en PTS ($p < 0,05$) ; la gousse et la graine présentent des similitudes de teneur en PTS ($p > 0,05$) lorsque l'eau distillée est utilisée.

II12.2. Teneur en phénols polymérisés.

L'addition de BSA dans les extraits s'accompagne par l'apparition d'un précipité (tanins – protéine). Le dosage au Folin-Ciocalteu réalisé sur le surnageant montre une diminution de la teneur en PTS. Les teneurs en PTS non liée à la protéine varient d'un échantillon à un autre, (**Figure 33**) en fonction aussi bien du solvant d'extraction que de la partie du fruit considérée. La substitution de l'eau distillée par de l'alcool diminue les proportions de PTS non liés à la protéine pour la graine et la pulpe ; nous observons une singularité de la gousse : le méthanol augmente cette proportion alors que l'éthanol la diminue.

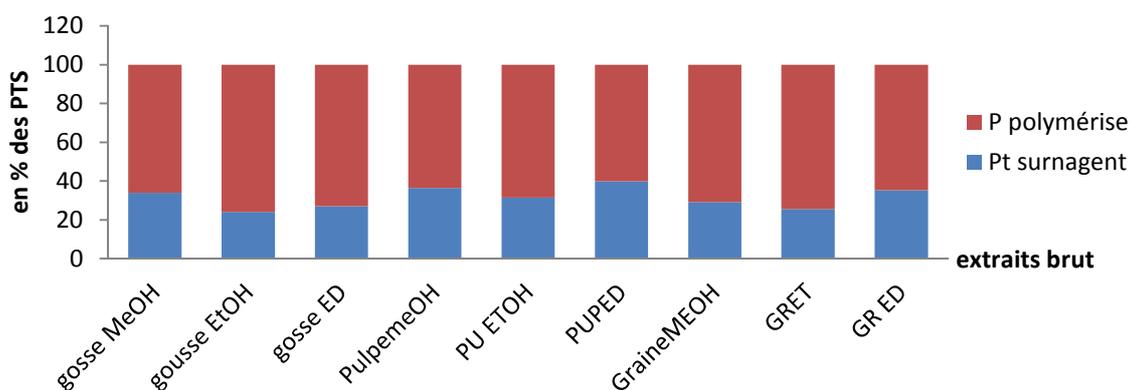


Figure 33 : Aptitude des PTS à se lier ou non aux protéines

Les graines de caroube sont plus riches en phénols polymérisés : 3,5 à 4,84 mg EAG contre 2,09 à 2,24 pour la pulpe et 2,42 à 3,91 pour la gousse. L'aptitude des PTS à se lier à la protéine concerne 64 à 74% des PTS pour la graine contre 60 à 68% pour la pulpe et 67,9 à 75,9% pour la gousse. L'utilisation d'un solvant moins polaire induit une diminution de la teneur en phénols polymérisés ; cette diminution est plus importante lorsque le MeOH 80% est utilisé.

II.1.3. Teneur en flavonoïdes

L'analyse statistique des résultats montre un effet significatif de chacun des facteurs testés (partie de plante et solvants). Nos données (**Figure 34**) montrent une variabilité de teneur d'un substrat à un autre (0,2 à 1,74 mg Eq Q/g MS). Ce sont les extraits de graine obtenus avec un solvant hydro alcoolique, qui affichent le contenu le plus élevé ($p < 0,05$) en flavonoïdes (1,65 et 1,74 mg Eq Q/g MS).

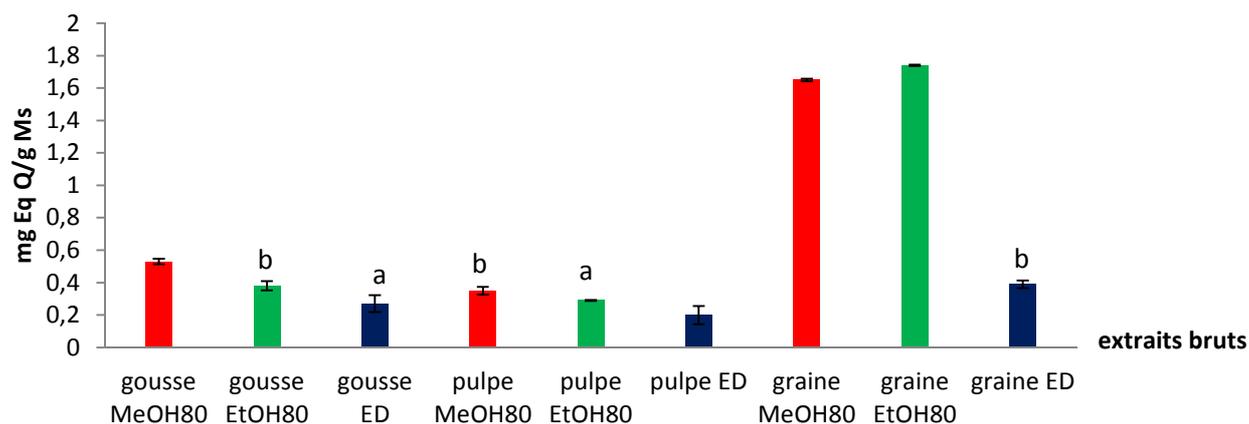


Figure 34: Teneurs en flavonoïdes

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

La substitution de l'eau distillée montre une augmentation de la teneur en flavonoïdes : 0,27 à 0,53 pour la gousse ; 0,2 à 0,35 pour la pulpe et 0,39 à 1,65 pour la graine.

Ces améliorations représentent 323 à 346% pour la graine contre 40 à 96% pour la gousse et 45 à 75% pour la pulpe.

II.1.4. Teneur en Tanins hydrolysables

Les données illustrées par la **figure 35** montrent que la graine est plus riche en tanins hydrolysables (9,75 à 15,87 mg EAT/g MS contre 2,63 à 3,33 pour la pulpe et 3,2 à 3,79 pour la gousse).

L'utilisation de solvants binaires s'accompagne d'une augmentation des teneurs en TH de la graine; cette augmentation est plus marquée en présence de l'EtOH80% (101,74% contre 62,76% pour le méthanol).

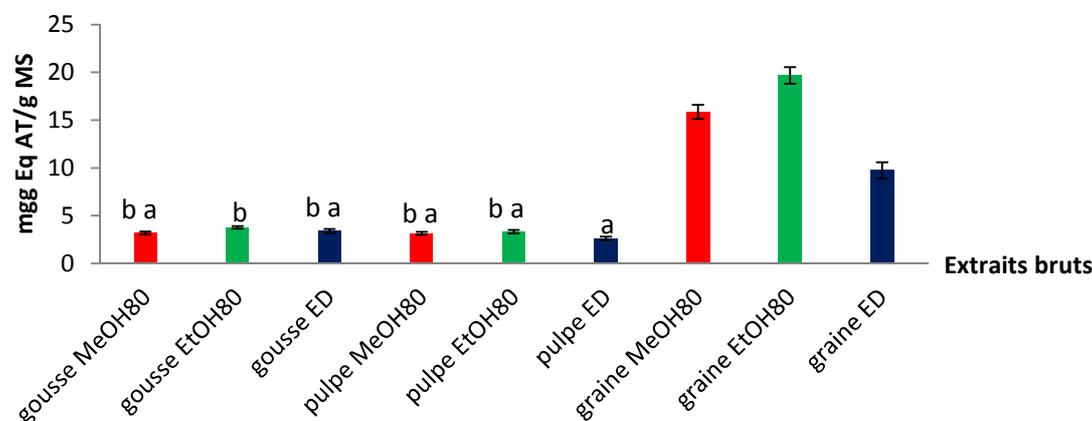


Figure 35 : teneur en tanins hydrolysables.

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

La comparaison multiple des moyennes montre de grandes similitudes de teneurs en tanins hydrolysables entre les extraits de pulpe et de gousse entière.

II.1.5. Teneur en Tanins condensés

Les graines de caroube (**Figure36**) sont plus riches en tanins condensés que la pulpe et la gousse: 1,69-5,3 contre 0,35-1,22 pour la gousse et 0,37-0,95 pour la pulpe.

Nos observons que l'utilisation d'un solvant moins polaire induit une diminution des teneurs en tanins condensés : 5,2 à 61,25% pour la pulpe ; 21,13 à 68% pour la graine et 23,77 à 71.31% pour la gousse.

Quel que soit le substrat considéré, c'est en présence de méthanol que nous enregistrons la plus forte diminution.

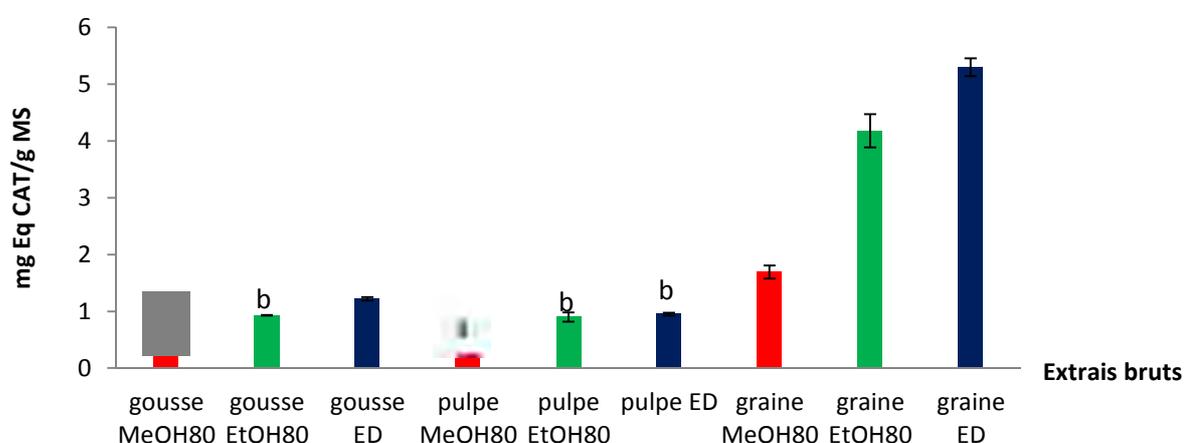


Figure36 : Teneur en tanins condensés.

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

II.2. Activité antioxydante des extraits de caroube.

II.2.1. Activité anti-radicalaire du DPPH

1. Effet des extraits bruts sur l'activité antioxydante du DPPH :

Nos données expérimentales montrent que tous les extraits testés manifestent un pouvoir inhibiteur du DPPH (**Figure37**) ; cette inhibition varie de 80,4% à 97,36%. La comparaison multiple des moyennes révèle des similitudes d'action ($p > 0,05$) entre certains extraits.

Tous les extraits de graine et l'extrait à l'eau distillée de la gousse induisent l'activité antioxydante la plus élevée (95,29% à 97,36%). Les plus faibles activités sont relevées en présence d'extrait de pulpe méthanol (80,44%) suivie de la gousse méthanol (85,16%) et de la pulpe avec l'eau distillée (88,97%).

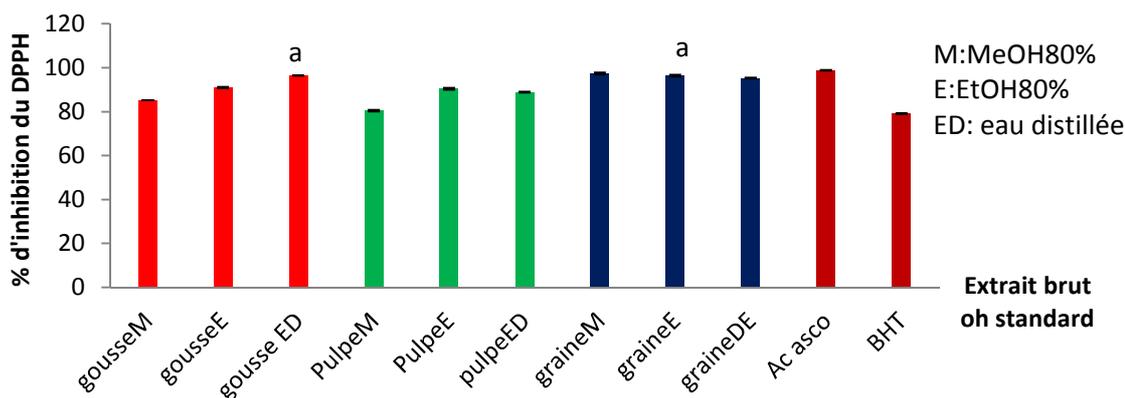


figure 37: Activité anriradicalaire de DPPH

les valeur suivie de la même lettre ne sont pas significativement differentes ($p > 0,05$)

L'effet scavenger des différents extraits (80,45 à 97,36 %) est significativement inférieur ($p < 0,05$) à celui de l'acide ascorbique (98,33 %) utilisé comme standard. Nous notons par contre que le BHT manifeste une activité (79,14%) significativement inférieure ($p < 0,05$) à celle de chacun des extraits de caroube.

2. Effet de la concentration en extraits sur l'activité anti radicalaire du DPPH :

La figure 38 illustre les différences de comportement des extraits testés sur le radical DPPH en fonction des concentrations utilisées. Pour les standards utilisés, nous notons une élévation rapide et brusque de leur capacité anti radicalaire dès les faibles concentrations.

Pour un même solvant d'extraction, des différences entre substrats sont notées. En présence d'extraits aqueux, l'augmentation de la concentration s'accompagne d'une élévation progressive de la capacité d'inhibition du DPPH par chacun des trois extraits. L'utilisation de l'éthanol (Figure 38b) ou du méthanol (Figure 38c) induit une activité plus marquée des extraits de graines : augmentation brusque et rapide contre une élévation progressive et plus lente pour les extraits de pulpe et gousse.

La substitution partielle de l'eau distillée par de l'alcool induit également des comportements différents entre les extraits. Pour la graine de caroube, elle s'accompagne d'une élévation brusque de l'activité scavenger (Figure 38d) et plus marquée pour l'extrait à l'éthanol. Pour la pulpe nous notons une augmentation progressive (Figure 38e) avec une efficacité plus prononcée des extraits hydro alcooliques. La gousse se distingue également par une plus lente progression de l'activité antioxydante (Figure 38f) mais qui demeure inférieure à celle des extraits aqueux

3. Les IC50 du DPPH

La **figure39** montre une plus grande efficacité des extraits hydroalcooliques de la graine de caroube (IC50 de 0,38 et 0,94 mg/ml contre 0,56 mg/ml pour le BHT).

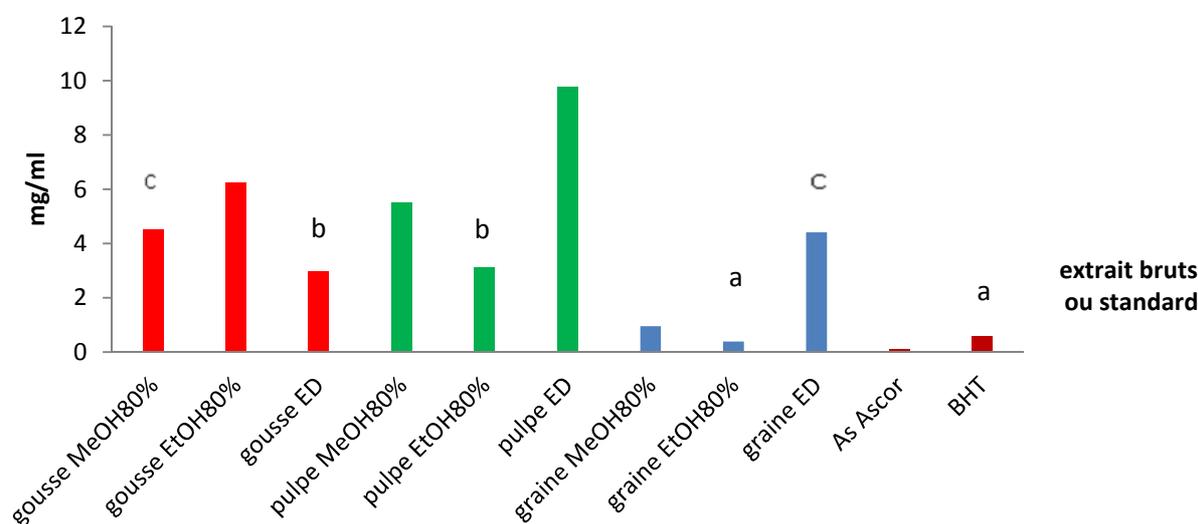


Figure39: IC₅₀ de différents échantillons contre le radical DPPH°

les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

Les plus faibles efficacités sont notées pour la pulpe et la gousse extraites respectivement avec de l'eau distillée (9,74) et de l'éthanol (6,21). Nous notons une similitude d'action ($p > 0,05$) entre l'extrait aqueux de graine (4,40) et l'extrait de gousse au MeOH80% (4,49) ainsi qu'entre l'extrait aqueux de gousse (2,95) et l'extrait de pulpe à l'éthanol (3,11)

II.2.2. Pouvoir réducteur

1. Effet des différents extraits sur le pouvoir réducteur.

Les résultats rapportés par la **figure 40** montrent que les extraits aqueux présentent le plus faible pouvoir réducteur (0,68 à 0,71 contre 0,83 pour l'acide ascorbique).

Le remplacement partiel de l'eau distillée par de l'alcool (méthanol ou éthanol) s'accompagne d'une augmentation variable du pouvoir réducteur des extraits (5,11 à 43,83%). Le méthanol s'est avéré plus efficace que l'éthanol. La comparaison multiple des moyennes montre que seuls les extraits au méthanol de la graine et de la gousse présentent des activités comparables ($P > 0,05$) et les plus élevées.

Le comportement des substrats dépend du solvant d'extraction utilisé. En présence de méthanol, la gousse et la graine présentent le plus fort pouvoir réducteur (0,99) alors qu'avec de l'éthanol l'activité la plus élevée est en faveur de la pulpe (0,93) ; les extraits aqueux affichent l'activité la plus faible (0,68 à 0,71).

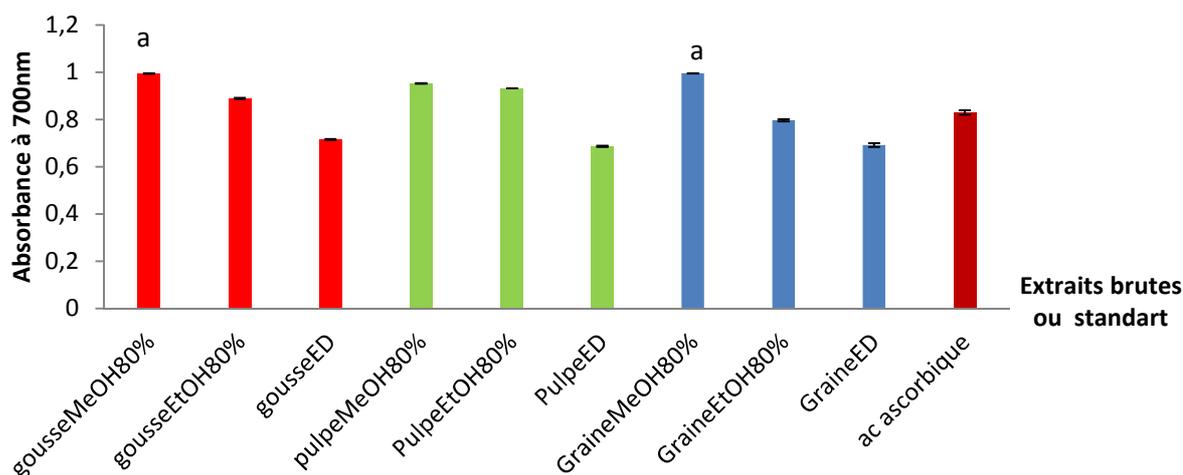


Figure 40 : pouvoir réducteur

Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

2. Effet des différentes concentrations d'extraits sur le pouvoir réducteur.

Pour le même solvant, nous observons une augmentation brusque de l'absorbance en présence des extraits de la graine de caroube utilisés à des concentrations inférieures à 2mg/ml (figure 41, a, b, c). Cette augmentation est plus marquée que celle notée avec l'acide ascorbique. Par contre pour la gousse et la pulpe, l'élévation du pouvoir réducteur est progressive.

C'est la pulpe qui manifeste la plus faible activité avec une augmentation progressive des concentrations ; elle reste inférieure à celle de l'acide ascorbique (figure 41e).

Le comportement de l'extrait à l'éthanol 80% de la gousse distingue deux phases : dans la première étape la gousse manifeste une activité plus faible que celle de l'acide ascorbique pour afficher au delà de cette concentration une activité plus élevée. Pour la gousse, nous notons comme pour la pulpe une élévation progressive du pouvoir réducteur

3. IC50 du pouvoir réducteur

Les résultats de l'IC50 pour le pouvoir réducteur des différents extraits sont illustrés par la (figure42). Nos notons une plus grande efficacité des extraits de graines (IC50 de 0,87 à 2,07mg/ml) comparativement à l'acide ascorbique utilisé comme standard (IC50 de 3,21mg/ml). A l'exception de l'extrait éthanolique des gousses (3,05mg/ml), les autres extraits enregistrent des IC50 (3,85 à 4,84mg/ml) supérieures ($p > 0,05$) à celle de l'acide ascorbique.

L'utilisation d'un solvant binaire s'avère plus efficace dans le cas de la graine et de la pulpe alors que pour la gousse la plus faible valeur de l'IC50 est en faveur de l'eau distillée.

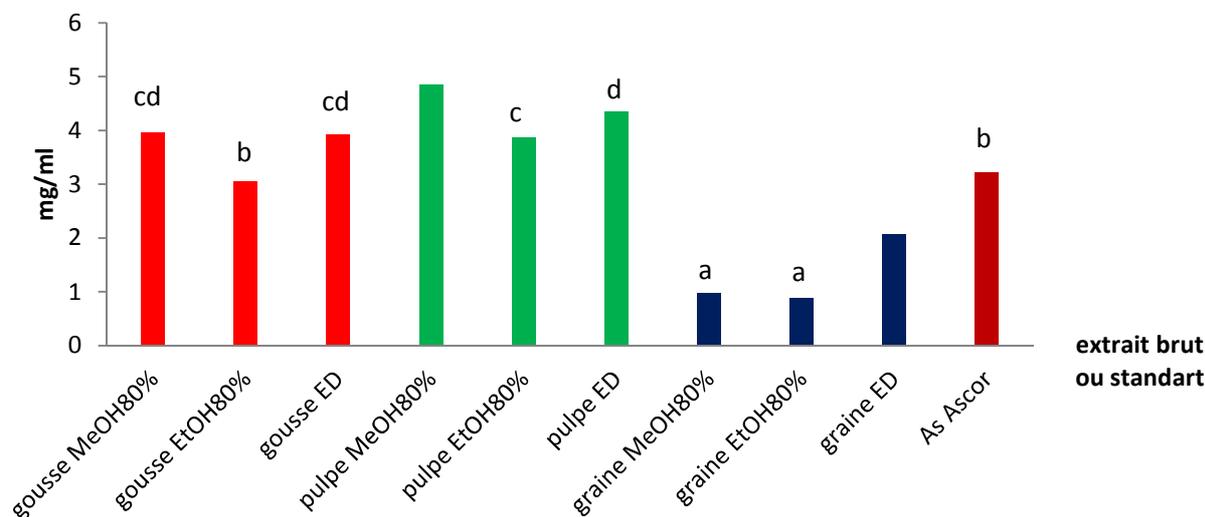


Figure 42 : les concentrations réductrices de 50% du fer
Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

II.2.3. Inhibition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Nos données (figure43) révèlent des différences d'activité entre les différents extraits : 49,4 à 98,28%.

La substitution partielle de l'eau distillée par du méthanol améliore significativement ($p < 0,05$) cette activité dans le cas de la gousse.

D'une manière générale et quel que soit le substrat considéré, l'éthanol aqueux s'est révélé moins efficace que les deux autres solvants. Nous notons en effet une baisse d'activité de 20,45 (pulpe), 20,8% (gousse) et 37,6 % (graine) par rapport à celle obtenue avec l'extrait aqueux correspondant.

L'eau distillée et le méthanol donnent des extraits à activité similaire ($p > 0,05$) lorsqu'ils sont appliqués à la graine (94,28%) et à la pulpe (72,3 et 90,34% respectivement).

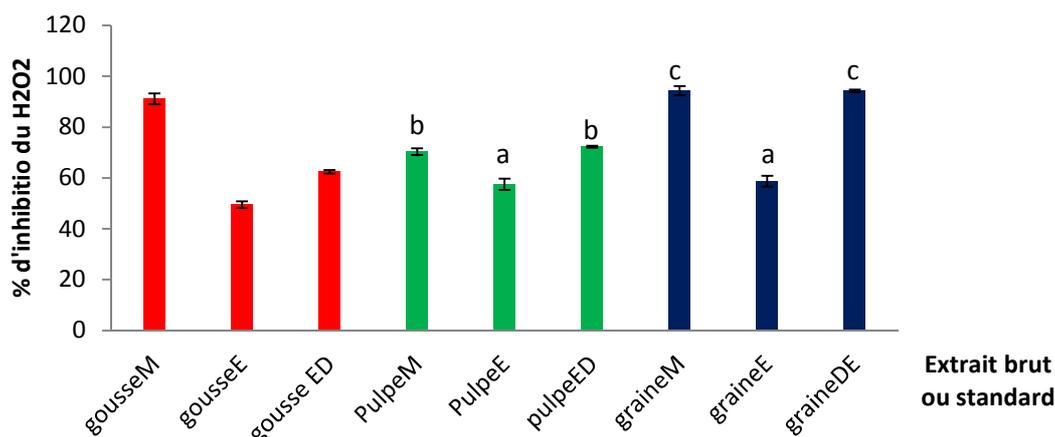


Figure 43 : Inhibition du peroxyde d'hydrogène
Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

II.2.4. Chélation du fer ferreux

Les extraits testés (**figure 44**) se distinguent par une faible activité (4,47 à 68,34%) par rapport à l'EDTA (98,23%) utilisé comme standard.

L'analyse de nos données montre des différences de comportement significatives ($p < 0,05$) en fonction des substrats utilisés. L'effet de la substitution partielle de l'eau distillée par de l'alcool varie en fonction du substrat considéré.

Pour la graine, le pouvoir chélateur est nettement plus élevé pour les extraits hydro alcooliques (66,8 à 68,34 % contre 4,47% pour l'extrait aqueux).

Les extraits de pulpe manifestent sensiblement le même pouvoir (55,68 à 57,77%) alors que pour la gousse entière, l'activité la plus élevée est enregistrée pour l'extrait aqueux (51,69% contre 30,08% et 41,66% pour les extraits au méthanol 80% et à l'éthanol 80% respectivement).

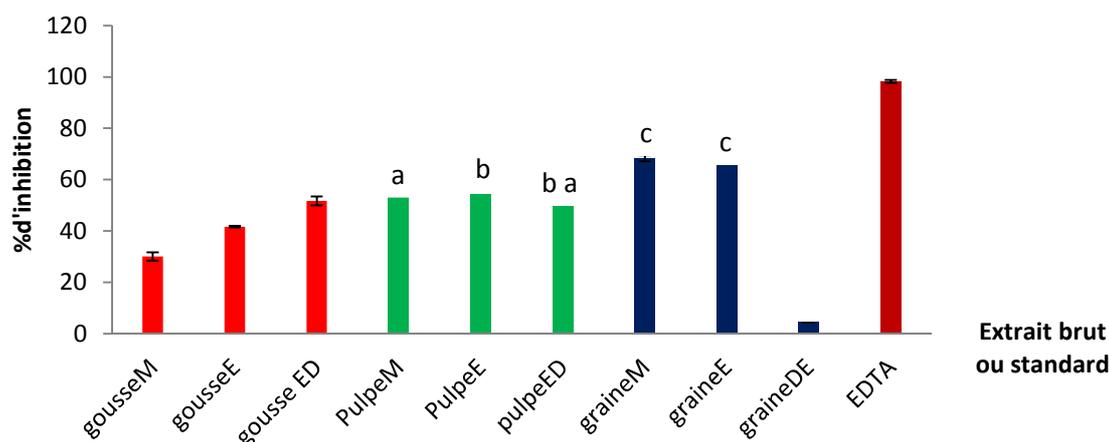


Figure 44 : chélation de fer ferreux

Les valeurs suivie de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$)

II.2.5-Matrice de corrélation :

La matrice de corrélation (tableau X) montre que l'IC50, déterminée aussi bien pour le DPPH que pour le pouvoir réducteur, est fortement corrélée ($p < 0,05$) à la teneur en composés phénoliques.

Les valeurs de r pour IC50 du DPPHs'élèvent à 0,74 (PTS), 0,736 (Flavonoïdes), 0,719 (TH) et 0,771 (PP) contre 0,37 pour les tanins condensés. Pour l'IC50 du pouvoir réducteur, les valeurs de r sont plus élevées et varient de 0,83(Flavonoïdes) à 0,91(TH) ;la corrélation avec les tanins condensés s'élève à 0,703.

La matrice révèle une corrélation significative ($p < 0,05$)entre les deux tests d'activité antioxydante ($r = 0,66$).

Nos données analytiques ne mettent pas en évidence de corrélation notable ($p > 0,05$)entre les composés phénoliques des extraits aussi bien avec l'inhibition du H2O2 (0,18 à 0,23) que de la chélation du fer (0,20 à 0,46).

De même nos tests ne révèlent pas de corrélation entre ces deux derniers tests et les mesures de l'IC50 pour DPPH et le pouvoir réducteur.

Tableau X: Matrice de corrélation entre teneurs en composés phénoliques et activité antioxydante

	PTS	F	TC	TH	PP	H2O2	CF	IC 50 DPPH	IC 50P R
PTS									
F	0,849***								
TC	0,664**	0,396							
TH	0,921***	0,939***	0,682**						
PP	0,987***	0,848***	0,602*	0,896***					
H2O2	0,182	0,181	0,235	0,208	0,054				
CF	0,209	0,462*	-0,378	0,262	0,265	-0,417			
IC 50 DPPH	0,740***	0,736***	-0,378	0,719***	0,771***	-0,078	-0,270		
IC 50PR	0,893***	0,830***	0,703***	0,915***	0,884***	-0,215	-0,068	0,666**	

(*) : La corrélation est significative ($p < 0,05$)

(**) : La corrélation est très significative ($p < 0,01$)

(***) : La corrélation est très hautement significative ($< 0,001$).

PTS : phénols totaux solubles.

F : flavonoïdes.

TC : tanins condensés.

TH : tanins hydrolysables.

PP : phénols polymérisés.

CF : chélation de fer ferreux.

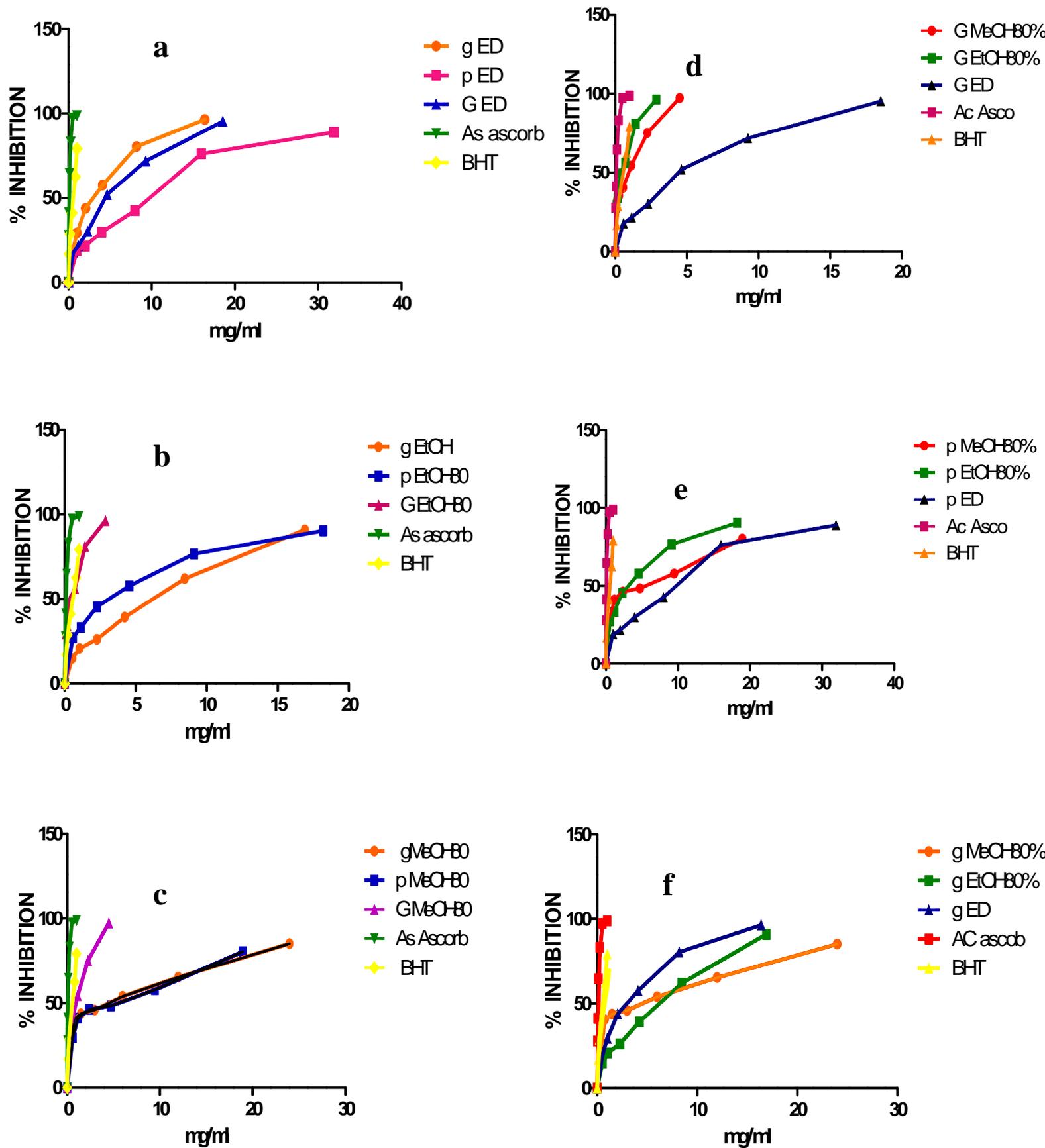


Figure 38 : Effet des différentes concentrations d'extrait brut sur le radical DPPH

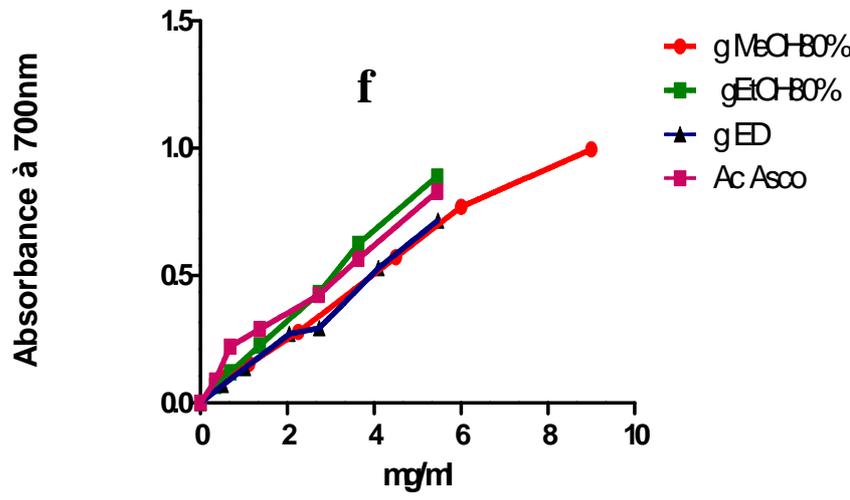
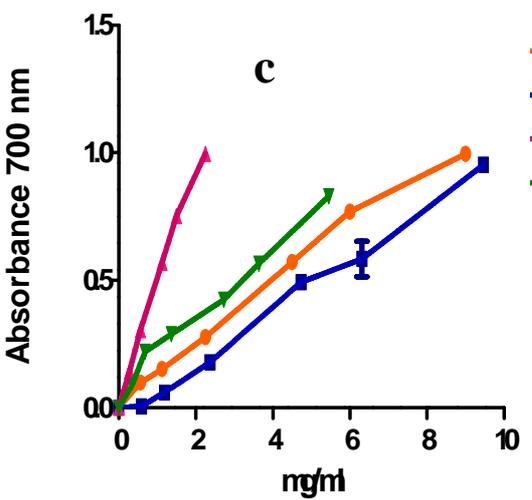
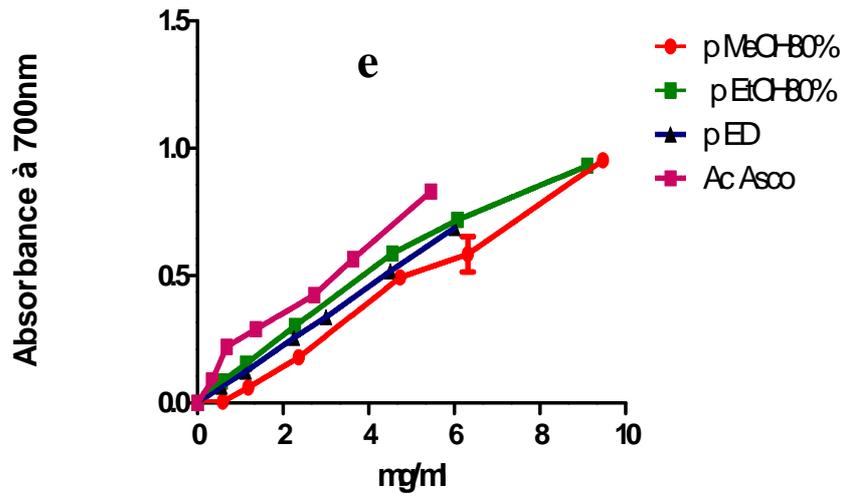
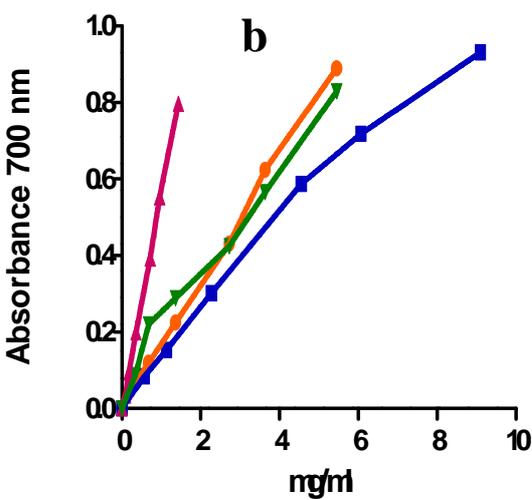
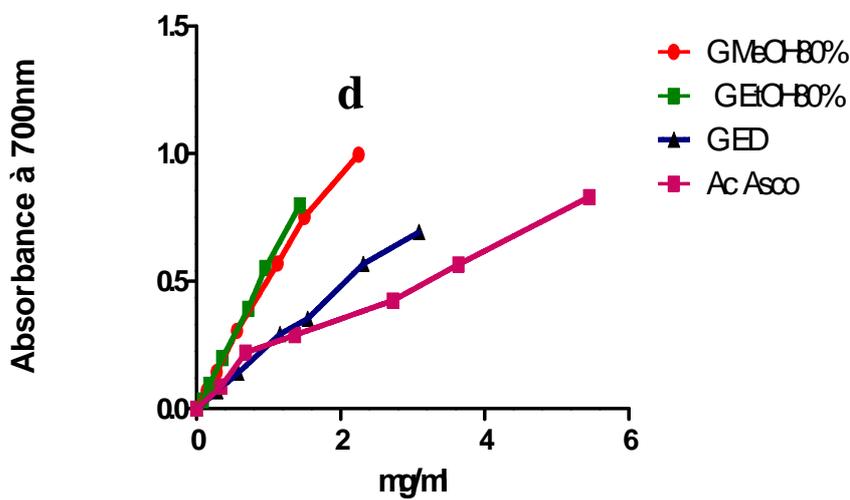
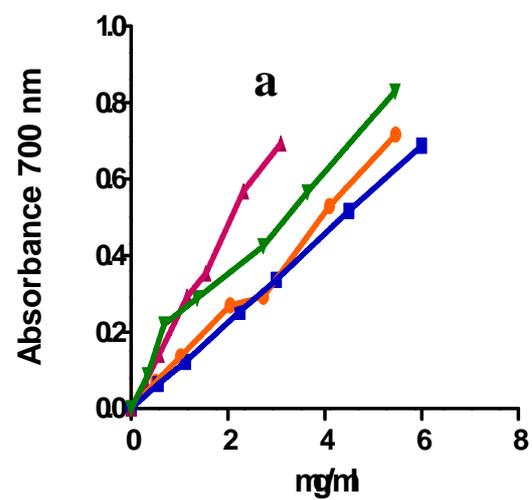


Figure 41 : Effet des différentes concentrations d'extrait brut sur le pouvoir réducteur

Discussion

Générale.

Discussion Générale.

Nos données analytiques ont montré la présence de diverses classes de composés phénoliques (phénols totaux solubles, flavonoïdes, tanins hydrolysables, tanins condensés,...) dans chacun des trois substrats de caroube et s'accordent avec les données de la littérature (**Vercauteren, 1996 ; Lugasiet al., 2003; Rahman et al., 2006), (Owen et al., 2003), (Macheix et al., 2006).**

La comparaison de nos résultats avec ceux rapportés par la littérature est difficile en raison, non seulement de la localisation des matières premières (altitude et type de sol) et le management des cultures (**Elias, 1979**), mais également des différences dans les méthodes d'extraction, de dosage et d'expression des résultats (**Garcia et al., 1985 ; Ramirez, 1988 ; Clifford et al., 1991**).

L'extraction a pour but de faire diffuser les composés phénoliques présents dans cette matière végétale dans la phase liquide (**Escribano Baillon-Buelga, 2003**). En accord avec de nombreux auteurs travaillant sur différents substrats (**Mokhtar pouret al., 2014 ; Dragovic-Uzelacet al., 2012 ; Durlinget al., 2007 ; Turkmen et al., 2006**), nous avons relevé des différences de teneurs en fonction aussi bien du substrat que du solvant. Nos données traduiraient des différences aussi bien de nature que de solubilité des composés dosés.

Les différents tests *in vitro* ont mis en évidence une activité anti oxydante variable qui résulterait de la présence d'antioxydants dans les différents extraits utilisés.

L'analyse statistique de nos résultats montrent une corrélation significative entre les valeurs de l'IC₅₀ (DPPH°) et les teneurs en composés phénoliques. Cette corrélation, rapportée également par différents auteurs découle de l'implication de ces constituants phénoliques dans l'effet scavenger des extraits.

Huang et al. (2005) attribuent cet effet à leur haut degré d'hydroxylation, qui se manifestent dans une grande capacité de donner des protons et donc stabiliser radical DPPH.

Les différences observées aussi bien entre extraits que selon le solvant d'extraction peuvent être attribués selon différents auteurs à des différences de teneur et nature des composés phénoliques, leur solubilité dans les solvants d'extraction et à leur degré de polymérisation ou leur implication dans d'autres structures moléculaires formant ainsi des complexes insolubles.

Discussion générale

La mise en évidence d'une corrélation significative ($p < 0.05$) entre IC_{50} du DPPH° et IC_{50} du pouvoir réducteur traduit l'implication de mêmes constituants phénoliques dans chacune de ces deux activités.

Nos données suggèrent que des constituants phénoliques présents dans les extraits possèdent à la fois la capacité de donner des électrons et des protons. Ses résultats sont similaires à ceux obtenus par (Zaoet al, 2008)

La variabilité d'inhibition du H_2O_2 par les extraits testés traduit des différences de composition chimique de ces derniers dus à une variabilité de solubilisation de leur contenu chimique. Nos résultats ne mettent pas en évidence de corrélation significative entre ce test et les teneurs en composés phénoliques qui ne servent pas les seuls éléments impliqués dans cette activité. D'autres composés antioxydants et non phénoliques, présents dans la caroube, seraient solubilisés par les solvants utilisés.

L'activité chélatrice du fer relevé dans nos essais varie d'un extrait à un autre, Nos données n'ont pas mis en évidence de corrélation significative entre cette activité et le contenu phénolique des extraits. Les composés phénoliques de la caroube ne seraient pas les principaux agents chélateurs du fer. Comme pour l' H_2O_2 , d'autres constituants solubilisés par les solvants utilisés servent impliqués dans cette activité.

L'attribution exacte de la capacité anti-oxydante à un composé, ou un petit groupe de composants dans un extrait de plante est une tâche difficile, puisque l'activité efficace dépend de plusieurs facteurs, tels que la concentration, les formes isométriques et l'interaction synergique avec d'autre composants (Almela et al. 2006). De nombreux auteurs notent que l'activité antioxydant est le résultat de l'activité combinée d'une large gamme de composés, notamment des composés phénoliques, des peptides, des acides organiques (choi et al., 2002 ; Gallardo et al., 2006) et d'autre composant tels que l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les tocophérols (Pincemail et al., 2007 ; Tawaha et al., 2007 ; Tachakittirungrod et al., 2007).

Conclusion

Générale

Conclusion Générale

Nos données analytiques ont montré que la caroube est un fruit riche en divers composés phénoliques. Ces derniers sont inégalement répartis entre les différentes parties du fruit. La graine représente la partie la plus riche en ces métabolites secondaires.

Les extraits de caroube ont affiché une activité anti oxydante notable et mesurée au moyen de quatre tests. Dans le présent travail, les composés phénoliques de la caroube sont fortement impliqués dans l'effet scavenger et le pouvoir réducteur des extraits utilisés. D'autres composés participeraient à l'activité de chélation du fer et à l'inhibition du peroxyde d'hydrogène.

Perspectives :

Il est souhaitable d'approfondir ce travail en s'intéressant particulièrement aux aspects suivants :

- Caractérisation physico chimique approfondie de différentes parties de la caroube.
- Caractérisation approfondie du contenu des extraits bruts (recherche et identification des métabolites solubilisées).
- Profil chromatographique du contenu phénolique et quantification.
- Utilisation des extraits pour la conservation des aliments (activité antioxydante et antimicrobienne) et qualité sensorielle des produits.

Références bibliographiques

Références bibliographiques



Aafi A. (1996), Note technique sur le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.), Centre Nationale de la Recherche Forestière, Rabat (Maroc), pp. 10.

Abdollahi, M. (2003). Winter and Postman.(In Persian: Zemestan wa Namerasan) Asr-e Panjshanbeh Journal. Vols.70. (Buland –al- Haidari, Hewar Fi Salasa Ab’ad).

Adrian, J ; Frangne, R (1991). La science Alimentaire de A à Z, Ed. *Lavoisier, Paris*.

Afonso, A., Gomes, P. and Rother, P., 2007. What “hides” behind sovereign debt ratings?. European Central Bank Working Paper Series, No. 711.

Ait Chitt M., Belmir M. et Lazrak A., (2007), Production des plantes sélectionnées et greffées du caroubier. Transfert de technologie en Agriculture, N°153, IAV Rabat, pp.1-4.

Akechi T, Kugaya A, Okamura H, Yamawaki S, Uchitomi Y. Fatigue and its associated factors in ambulatory cancer patients: a preliminary study. *J Pain Symptom Manage* 1999;17:42-8.

Albrecht R.1994. Aspect nutritionnels de la protection anti- radicalaire. *Medecine et Nutrition*.111(1) :19-24.

Almela ,L .,Sanchez-Munoz ,B.,Fernandez-Lopez,J A.,Rosa ,M.,Rabe,V.(2006).Liquid chromatographic –mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material.*J Chromatography A*.1120,221-229.

Ayaz F A.,Torun H., Ayaz S., Correia P. J, Alaiz M., Sanz C., Gruz J., Strnat M., (2007). Détermination of chemical composition of Anatolian Carob pod (*ceratonia siliqua*) : Sugars, Amino and organic acids, minerals and phenolic compounds, *journal of food quality*, (6). 1040-1055.

Avallone R., Plessi M., Baraldi M., et Monzani A., 1997. Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of food composition and analysis*, Vol. 10, p.166–172.



Bahri-sahloul R., Ammar S., Fredj R. B Saguem S., Trotin F et Skhiri F.H2009. polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two crataegus azarolus L.varieties.pakistan journal of Biological Sciences.12 :660-668.

Battle I., Tous J., 1997.Carob tree (*Ceratonia siliqua L.*), Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, 1–79.

Berger M.M. 2006. Manipulations Nutritionnelles du stress oxydant : état de connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*. 20:48-53.

Berrougui H., 2007. Le caroubier (*Ceratonia siliqua L.*), une richesse nationale aux vertus médicinales. *Maghreb Canada Express* (<http://www.maghreb-canada.ca>) Vol. N° 9 (SEPTEMBRE 2007). P.20.

Bessas, A; Benmoussa, L; Kerarma, M. (2007). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie.

Bezanger L., Beauquesne M.P., Pinkas M., Torck M.et Trotin F. 1990. Plantes médicinales des régions tempérées. Ed MALOINE, paris : 98.

Bouakaz, I., (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Batna.

Bourgou S., Ksouri R., Bellila A., Skandrani I., Falleh H., Marzouk B.2008 phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa L.* shoots and roots. *comptes Rendues biologiques* 331 :48-55

Boudy P., 1950. Economie forestière Nord Africain, Tome II : Monographie et traitement des essences forestières. *Ed. Larose. Paris, pp.443-445.*

Bougandoura N. 2011. Pouvoir antioxydant et antimicrobienne des extraits d'espèces végétales *Satureja calamintha spnepta (nabta)* et *Ajugaiwa L.(chendgoura)* de l'ouest d'Algérie. Mémoire de Magister en Biologie à l'université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. 83.

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., et Berset C. 1995. use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology. 28:25- 30*

Bremness L. 1996. Arbre. In « les plantes aromatiques et médicinales : le guides visuel de plus de 700 espèce végétal à travers le monde ». Edition Bordas. p45.

Bruneton, J. (1999). Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris :

Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier,*

Bruneton, J. (1993). Pharmiognosie et phytochimie, plantes médicinales, *Tec et Doc Lavoisier.* Paris,



Cavin, A. (1999). Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinos poracispa* (Menispermacées), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneanda* (Annonacées). Thèse de doctorat Lausanne, p241

Cesarini J-P. (2004). Le sélénium : actualité. 2em éd. John Libby eurotext. 145p.

Cherubini A., Ruggiero C., Polidori M-C. et Mecocci P. (2005). Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical biology & Medicine. 39:841-852.*

Chira, K ; Suh, J.H ; Teissédre, P.L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie, 6:75-82.*

Choi C.W., Kim S.C., Hwang S.S., Ahn H.J., Lee M.Y. (2002). Antioxydant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science, 163, 11612-1168.*

Clifford ,M.,Colmenares,N.,Ramirez-Martinez,J.,Adams,M.,M.,de Meneses,H.,1991. Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. *Animal Feed Science and Technology* 99:195-204.

Corsi L., L., Avallone R., Cosenza F., Farina F., Baraldi C. et Baraldi M., 2002. Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua*L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia* 73, p.674-684

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.

Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Re*, 12 (4): 564- 582

Đ

Dacosta, E. (2003). Les phytonutriments bioactifs. Yves Dacosta (éd). Paris, p317.

Dakia P. A., Wathelet B. et Paquot M., 2007. Isolation and chemical evaluation of carob²(*Ceratonia siliqua* L.) seed germ. *Food Chemistry* 102, p.1368–1374.

Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181

Dangles O.2006. Propriété chimiques des polyphénols. In : (Les polyphénols en agroalimentaires). Ed. Lavoisier.29-50.

Deaton C-M. et Marlin D-J.(2003).Exercise-Associated Oxidative Stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. Vol 2.3 :278-291.

Demoffarts B., Kirschvink N., Pinemail J. et lekeux P.(2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Annales de médecine vétérinaire*.149 :1-9.

Deshpande S.S Cheryan M., et Salunkhe D.K.1986.Tannin analysis of food products.criticalReviews in food Science and Nutrition 24 :401-499

Dragović-Uzelac V.,Garfulić I.E., Jukić M.,Penić M.,et Dent M.2012.The Influence of Microwave Assisted Extraction on the Isolation of Sage(*Salvia officinalis* L.) polyphenols.Food Technology and Biotechnology.50(3)377-383.

Duraffourd C., Lapraz J-C., Chemli R. ; 1997.La plante médicinale de la tradition à la science. 1er congrès Intercontinental. Tunis. Ed. Granche. Paris, 222.

Durling E.N.,Owen J.C.,Johh B .G.,Rosmary F.W.,Kevin A.,Yeap L.F.,et Nigel B.P.2007.Extraction of phenolic and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixture.Food Chemistry.101:1417-1424.

£

Escribano-Bailon M T., et Santos-Buegla C.2003. Polyphénol extraction from foods.In :“method in polyphénols analysis”.Royal Society of Chemistry.-1-16.

Elias, L., 1979.Effect of different Chemecal treatements on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. Animal Feed Science and Technology 99:195-204.

ƒ

Ferguson, L.R.(2001).Role of plant polyphenols in genomic stability.*Mutation Research*, 475: 89–111.

Fu L., Xu B-T., Xu X-R., Gan R-Y., Zhang Y., Xia E-Q. et li H-B.(2011).antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. Food Chemistry.129:345-350.

FAOSTAT, <http://faostat.fao.org/>, (13/03/10)

Fleeger J.L., et Flipse I.J.1964.Metabolisme of bovine semen XIII.Malonic acid metabolisme by bovin spermatozoa.*Journal of Dairy Science* .47(5):535-538



Gallardo C., Jimenez L., Garcia-Conesa M.-T. (2006). Hydroxycinnamic acid composition and *in vitro* antioxidant activity of selected grain fraction. *Food chemistry*. 99, 455-463.

Garcia, O.B., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A., 1985. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. Biochemecal Engineering Research Laboratory (BERL), Department of Chemical Engineering, Izmir Institute of Technology. p.3.

Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z et Jore D (2003). Espèces réactives de l'oxygène, Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ? *L'actualité chimique*, 91-96.

Gaté, L., Paul, J., Nguyen, B., G., K.D. Tew, H., Tapiero, (1999): Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother*. 53, P.169-80.

Gerard-Monnier, D., Chaudière, J. 1996. Metabolism and antioxidant function of glutathione. *Pathol Biol*. Vol 44: 77-85.

Gharnit N., 2003. Caractérisation et essai de régénération *in vivo* du caoubier (*Ceratonia siliqua* L.) originaire de la province de Chefchaouen (Nord-ouest du Maroc). Thèse de Doctorat en science. Université Abdelmalek Essaadi. Tanger

Ghedira K. 2005. Les flavonoïdes : structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Pharmacologie*, 10 : 16-22.

Gonzalez, A. G ; Estevez-Braun, A. (1997). Coumarins, *Nat. Prod. Reprod*, 14 : 465-475.

Goudable, J. et Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Laboratoire de biochimie C, hôpital Edouard, Herriot, Lyon, GREPO, Université de Grenoble, la Tronche.

Gruendel S. Garcia A. L. Otto B. Mueller y .C. Steiniger J Weickert M. O. Speth M. .

Katz N. and Koenig C . 2006. Carob Pulp Preparation Rich in Insoluble Dietary Fiber and Polyphenols Enhances Lipid Oxidation and Lowers Postprandial Acylated Ghrelin in Humans. *The Journal of Nutrition*. 136: 1533–1538.

Guingard, J. (1996). Biochimie végétale, Ed. Lavoisier, Paris, p 175-192. UE PHR

Gulcin I, Huyut Z, Elmastas M and Aboul-Enein H Y (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, **3**, 43-53.

Gurbuz I., Yesilada E., Ito S., 2009. An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology* 121: 360 -365.



Hadi M.2004. La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteur de radicaux libres; études et applications thérapeutiques: Chapitre I. Thèse doctorat. Pp : 13-28.

Hagerman A.E.2002.Tannin Chemistry.Tannin Handbook.86 :104-105

Hagerman A.E., et Butler L.G., 1978 Protein precipitation method for the quantitative determination of tannin.*Journal agriculture and food Chemistry*.26(4) :809-812

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J-O., Charlier C., et Chapelle J-P. 2007 le stress oxydant.*Revue Medicale de Liegne*. 62 (10) : 628-638.

Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 2007. Free Radicals in Biology and Medicine. 4 th ed. *Oxford university Press*, pp: 20-31.

Handa S.S. 2008 An overview of extraction techniques of medicinal and aromatic plants in :' 'extraction technologies for medicinal and aromatics plants''united nations Industrial Develepment Organization and the International Centre for Science and High Technology trieste Italy.21-54

Harborne JP (1989) .General procedures and measurement of *total phénolics*. In : Harborne JP. *Plant phenolics* .Academic Press, Londres,1-28.

Hariri A, N.Ouis, Sahnouni F et D.Bouhadi (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.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002; 13: 572-584.

Hemingway, R.W. (1992). Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York.

Henis Y., Tagari H and Volcani r. 1964. Effect of Water Extracts of Carob Pods, Tannic Acid, and Their Derivatives on the Morphology and Growth of Microorganisms. Applied Microbiology. 12 (3) : 204-209.

Hennebelle et al., 2004; Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la lamiles productrices d'antioxydants :Marrubium peregrium, Ballota larendana, Ballota pseudodicatamnus(Lamiacées) et Lippa alba (Verbénacées).Thèse de Doctorat en Chimie organique de l'université des Sciences et Technologies de Lille.304.

Hitara T., Fujii M., Akita K.,Yanaka N.,Ogawa K., Kuroyanagi M., Hongo D., 2009.Identification and physiological evaluation of the components from *Citrus* fruits as potential drugs for anti-corpulence and anticancer. *Bioorganic & Medicial Chemistry* 17: 25-28.

Hostettler M, Steffen R, Tschopp A(1995).Efficacy and tolerance of insoluble carob fraction in the treatment of travellers' diarrhoea.1. J Diarrhoeal Dis Res. Sep;13(3):155-8.

Hostettmann, K., Kizu, H., Tomimori, T. (1982). Molluscicidal properties of various saponins.Planta Med.44, 34-35

Huang D., Ou B., et Prior R.L.2005.The Chemistry behind antioxydant capacity assay, Journal of Agricultural and Food Chemistry.53:1841-1856.

Hu S. G., Li L., et He X. W.2005 . Solide- phase extraction of esculetin from the ash bark of chinese traditional medicine by using molecularly imprinted polymers. Journal of Chromatography A.1062: 31-37.

J

Igor Passi, L.B. (2002). Etude des activités biologique de *Fagara zanthoxyloides, lam* (Rutaceae). Thèse de pharmacie, Bamako

Iserin, P. (2001). Larousse encyclopédie des plantes médicinales. Identification, Préparations, soins. 2nd edition, Dorling Kindersiey Limited, Londres

Ito C., Itoigawa M., Onoda S., Hosokawa A., Ruabgrungsi N., Okuda T., Tokuda H., Nishino H. Furukawa H., 2005. Chemical constituents of *Murraya siamensis*: three coumarins and their anti- tumor promoting effect. *Phytochemistry* 66: 567 -572.

I

Jeyaramraja P-R., Meenakshi S-N., Kumar R-S., Joshi S-D. et Ramasubramanian B. (2005). Water deficit induced oxidative damage in tea (*Camellia sinensis*) plants. *Journal of plant physiology*. 162:413-421.

Judde A. 2004. Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ? *Oleagineux, Corps Gras, Lipides*. 11(6) : 414-418.

K

Kansole, M.M.R. (2009). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso: cas de *Leucas martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *Hoslundia opposita* vahl et *Orthosiphon pallidus* royle ex benth. Mémoire pour obtenir un diplôme Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Sciences Biologiques Appliquées, Burkina Faso

Ketsawatsakul U, Whiteman M and Halliwell B (2000). A reevaluation of the peroxynitrite scavenging activity of some dietary phenolics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279, 692-699

Kim J Y., Lim H J., Lee D Y., Kim D H., Jeon R., Ryu J H., 2009. In vitro anti inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargessii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19: 937 -940.

Klenow S., Gleis M., Haber B., Owen R et Pool-Zobel B.L . 2007. Carob fibre compounds modulate parameters of cell growth differently in human HT29 colon adenocarcinoma cells than in LT97 colon adenoma cells. *Food and Chemical Toxicology*.

Koehler-Ramonatxo, C. (2006) Oxygen , oxidative stress and antioxidant supplementation ,or an other way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique*. 20:165-177.

Kooppenol W.H.2001. The Haber- Weiss cycle, 70 yearslater. Redox Report. 6: 229-234

Kubata BK., Nagamune K., Murakami N, Merkel P., Kabututua Z., Martin SK., Kalulug TM., Mustakuk H., Hoshida M., Ohnishi-kameyama M., Kinoshita T.,Duszenko M., Uradea Y., 2005. *Kola acuminata* proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against trypanosome brucei. *International Journal for Parasitology* 35: 91- 103.

L

Lamaison J.L.C. and Carnet A. (1990) Teneurs en principaux flavonoids des fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en fonction de la vegetation. *Pharm. Acta. Helv.*, **65**, 315-320.

Lapornik B., prosek M., et Wondra A.G.2005.comparison of exacts prepared from plant by-products using different solvenets and extraction time.journal of food engineering.71 :214-222

Lebham, (2005). Thèse au laboratoire d'Ecophysiologie et de Biotechnologie des Halophytes et des Algues au sein de l'Institut Universitaire Européen de la Mer. (IVEM). Université de Bretagne Occidentale (UBO).

Lesgards J. F. 2000. Contribution à l'étude du statut antioxydant de l'homme : aspects chimiques et biochimiques. These de doctorat en chimie et biochimie à l'Universite Paul Cezan, Marseille. 108.

Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M. (Madi A., 20. Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes

Lhuillier, A. (2007).Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver,*Agauria polyphylla*Baker (*Ericaceae*), *Tambourissatrichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker(*Myrsinaceae*).Thèse de doctorat. Toulouse

Li H., Wang X., Li Y., Li P., et Wang H. 2009 polyphenolic compouds and antioxydant properties selected chine winesfood chemisty.112 :454-460

Lugasi, A ; Hovari, J ; Sagi, K.V ; et Biro, L. (2003). The role of antioxidant phytonutriments in the prevention of diseases. *Acta. Biologica Szegedensis* 1-4: 119-125.



Macheix J.J., Fleurier A. et Sarni-Manchado P., 2006. Les composés phénoliques dans la plante .Structure, biosynthèse, réparation et rôles. In les polyphénols en agroalimentaire. Ed. TECet DOC, pp2-10

Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J (1990). *Fruit phénolics*. CRC Press, Boca Raton

Makirs D P., P Kafelas, (2004), carob pod as a source of polyphenolic antioxidants food Technology and Biotechnology.(2):105-108

Mamadou B. 2002. Actions pharmacologiques des tanins. Thèse de doctorat en pharmacie de l'université cheikh anta diop de Dakar. 57.

Marfak, A.; Trouillas, P.; Allais, D.P.; Calliste, C.A.; Cook-Moreau, J.; Duroux, J. L. Transformation mechanism of the antioxidant kaempferol into depside. □-Radiolysis study in methanol and in ethanol. *Radiat Res.* **2003c**, 160: 355-365.

Masquelier J, Dumon M et Dumas J, 1979. Stabilisation des collagènes par des oligomères procyanidoliques. *Acta thérapeutique* 1, 101-104 p.

Milane, H ; (2004). La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en science. Université Louis Pasteur. Strasbourg.

Miwa K. et Fujita M. (2008). Increased oxidative stress suggested by low serum vitamin E concentrations in patients with chronic fatigue syndrome. *Food Chemistry*. 238.

Moffarts B., Kirschvink N., Art T., Pincemail J., Lekeux P. Effect of oral antioxidant supplementation on blood antioxidant status in trained thoroughbred horses. *Vet. J.*, 2005, 169, 65-74.

Mokhtarpour A., Naserian A. A., Valizadeh R., Danesh Mesgaran M., et Pourmollane F. 2014. Extraction of phenolic Compounds and Tannins from Pistachio by-products. *Annual Research and Review in Biology*. 4(8):1330-1338.

Mole S., et Waterman P.G.1987 A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II.techniques for biochemically defining tannins.oecologia.72 :148-156

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J.,Dominguez, H., et al. (2001). Natural antioxidants from residual sources. Food Chemistry, 72, 145–171.

N

Nair V-D., Panneerselvam R.et Gopi R.(2012). Studies on methanolic extract of Rauvolfia species from Southern Westren Ghats of India-In vitro antioxidant properties, characterisation of nutrients and phytochemicals.Industrial Crops and products.39:17-25.

Nancy,J.Linford,S.I. chriner, E. Peter,S.Rabinovitch1.2006. OxidativeDamage and Aging: Spotlight on Mitochondria .*Cancer Res*; 66: 2497-2499.

O

Okamura H, Mimura A, Yakou Y, Niwano M, Takahara Y, 1993. Antioxidant activity of tannins andflavonoids in *Eucalyptus rostrata*. *Phytochemistry* 33: 557-561.

Oomah B.D., Caspar F., Malcolmson L.G., et Bellido A.S.2010.phenolics and antioxidant activity of lentil and pea hulls.food research international.44 :436-441

Owen R.W., Haubner R., Hull W.E., Erben G., Spiegelhalder B. et Bartscha H., 2003. Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre. Food and Chemical Toxicology Vol. 41, p.1727–1738

P

Parrilla-Taylor, D.P., Zenteno-Savín, T., 2011. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. *Aquac.* 318, 379–383. Paschke, K., Cumillaf, J.P., Loyola, S., Gebaue

Pastre J. O. C. 2005. Intérêt de la supplémentation en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. These de doctorat à l'Université de Paul-Sabatier de Toulouse.117.

Pietta P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants ,Reviews ;Journal of Natural Products 63 :1035-1042.

Pincemail J et Defraigne J.O., 2004. Les antioxydants : un vaste réseau de défense pour lutter contre les effets toxiques de l'oxygène. Institut Danone.

Pincemail, J., Sergent, O., Detry, O., Gaspar, Y., Cheramy-Bien, J.P., Cillard, J., Meurisse,M., and Defraigne, J.O. (2002). Intracellular free iron content of rat liver tissue after coldischemia. *Transplant Proc*, 34 (3): 759-61.

Poortmans J-R et Boisseau N.(2003).Stress et exercices. In « Biochimie des activités physiques ».2em éd. De Boeck Supérieur.416-417.

Poston L, et Raijmakers M-T-M.(2004).Trophoblast Oxidative Stress, Antioxidants and Pregnancy Outcome.18:72-78.

Powers S-K., Bradley W-N. ET Hudson M-B.(2011).Exercise-induced oxidative stress in humans: Cause and consequences. *Free Radical biology & Medecine* .51:942-950.



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



Ratnam D-V., Ankola D-D., Bhardwaj V., Sahana D-K. ET Ravi-kumar M-N-V. (2006).role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective.*Journal of Controlled Release*. 113:189-207.

Rahman I., Biswas S. K. et Kirkham P. A. 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols . *Biochemical Pharmacology*. 72 :1439– 1452

Ramirez, J.,1988.Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp.*Animal Feed Science and Technology* 99:195-204.

Rejeb M. N. (1995), Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration, in *Quel avenir pour l'amélioration des plantes?* Edit. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, pp. 79-85.

Rejeb M. N., Laffray D. and Louguet P. (1991), Physiologie du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) en Tunisie, in *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides*, Group d'Etude de l'Arbre, Paris, France, pp. 417-426.

Ribereau-Gayon P.1968.Notion générale sur les composés phénoliques.in :''les composés phénoliques des végétaux'' .ed.Dunod.1-40

Richard T., Lefevre D., Descendit A., Quideau S., et Monti J.P.2006.Recognition characters in peptide-polyphénol complex formation.*Biochemical et Biophysical Acta.* 1760 :951-958

Rock E., 2003. Stress oxydant, micronutriments et santé. Université d'été de Nutrition – Clermant-Ferrand : 37-42.

Roussel A M (2009). Qui manque d'antioxydants, et comment le savoir ? *Cahiers de nutrition et de diététique*, pp: 7.

Ruch, R. J., Cheng, S. J., & Klaunig, J. E. (1989). Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogen*, 10, 1003–1008.

Ruiz-Roso B, Quintela JC, de la Fuente E, Haya J, Pérez-Olleros L(2010).Insoluble carob fiber rich in polyphenols lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic subjects. *Plant Foods Hum Nutr.* Mar;65(1):50-6. doi: 10.1007/s11130-009-0153-9.

Shan, B., Yi-Zhong Cai, John D. Brooks, Harold Corke (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* 117 :112–119.

Sannomiya M., Fonseca V B., Da silva M A., Rocha LRM. Dos Santos L C, Hiruma-Lima C A., Britoc A R M S, Vilegas W., 2005. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 97: 1- 6.

Santos M., Rodrigues A. et Teixeira J.A .2005. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical*.

Sarni-Manchado P et Ceynier V(2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Tec and Doc, Paris. 2-26.

Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, **130** : 2073-2085

Schweinfurth G. (1894). Sammlung arabisch-aethiopischer Pflanzen, Ergebnisse von Reisen in dem Jahren 1881, 1888-89, 1891-92. *Bull, Herb. Boissier* 2:1-114.

Serairi-beji S Mekki- Zouiten L, Tekaya-manoubi L, Loueslati M H Guemira Fet Ben mansour A 2000). Peut- in associer la pulpe de caroube et la solution de réhydratation orale dans le traitement de la diarrhée aigue. *Tribune* 60,125-128

Skerget, M. ; Kotnik, P. ; Hdolin, M.; Hras, A.R.; Simonic ,M and Knez ,Z.(2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Journal of food Chemistry*, 89:191-198

Slater A.F., Stefan C., Nobel I., Van Den Dobbelen D.J., et Orrenuis S.1995. Signalling mechanism and oxidative stress in apoptosis. *Toxicology Letters*. 82/83: 149-153

Smyth T; Ramachandran V. N.; Smyth W. F., 2009. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. *International journal of antimicrobial agents* 33: 421 - 426.

Sorg, O.(2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus aaaBiologies*. **327**: 649-662.

Sun L., Zhang J., Lu X., Zhang L.et Zhang Y.(2011).Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from persimmon (*diospyros kaki L.*)leaves. *Food and chemical Toxicology*.49:2689-2696.

J

Tachakittirungrod S., Okonogi S.,Chowwanapoonpohn S.(2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand :Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract . *Food Chemistry*. 103,381-388.

Tawaha K.,Alali F.Q., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elmat T.(2007).Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species . *Food Chemistry*. 104,1372-1378 ;

Theriault M., Caillet S., Kermasha S. et Lacroix M.(2006).Antioxidant , antiradical and antimutagenic activitie of phenolic compounds present in maple products. *Food chemistry*.98:490-50.

Thomas R-H., Bernards M-A., Drake E-F. et Guglielmo C-G.(2010). Changes in the antioxidant activities of seven herb-and spice-based marinating sauces after cooking. *Journal of Food Composition and Analysis*.23:244-252.

Tripoli, E.,Giammanco, M.,Tabacchi, G., Di Majo,D., Giammanco,S.,La Guardia, M. (2005).The phenolic compounds of olive oil : structure,biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, **18** : 98-112.

Turkmen N.,Sari F.,et Velioglu Y.S.2006. Effects of extraction solvent on concentration and antioxidant activity of black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods.*Food Chemistry*.99(4):835-841.

T

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T D and Mazur M and Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **39**, 44-84.

Vercauteren J(1998). Chez C. et Triaud J.. Polyphenols 96, 18th international conference on polyphénols. INRA. PP: 32-33.

Vertuani,S.Angusti,A.Manfredini,S.2004. The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.*Vol 10: 1677-1694.

Vavilov N.I., (1951). The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants [translated from the Russian by K.S. Chester]. The Ronald Press Co., New York.

W

Wardman, P., Candeias, LP. (1996). Fenton chemistry : an introduction. *Radiat Res* **145** (5) :523-531

Wollgast J., Anklam E., 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33: 423 - 447.

Wûrsch P. 1979. Influence of Tannin-Rich Carob Pod Fiber on the Cholesterol Metabolism in the Rat *Journal of Nutrition*. 109: 685-692.

Z

Zhao H.,Fan W., dong J., Lu J., Chen J., L., Y., et Kong W .2008 evaluation of antioxidant activities and total phenolic contents of typical malting barley varieties.*food chemistry*.107 :296-304

Zelko, IN., Marian, TJ.,Folz, RJ. (2002) Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology&medicine*. **33**: 337-349.

Zohary M. (1973). Geobotanical Foundations of the Middle East, 2 vols. Stuttgart

Annexes

Annexe N° 01 : Courbe d'étalonnage.

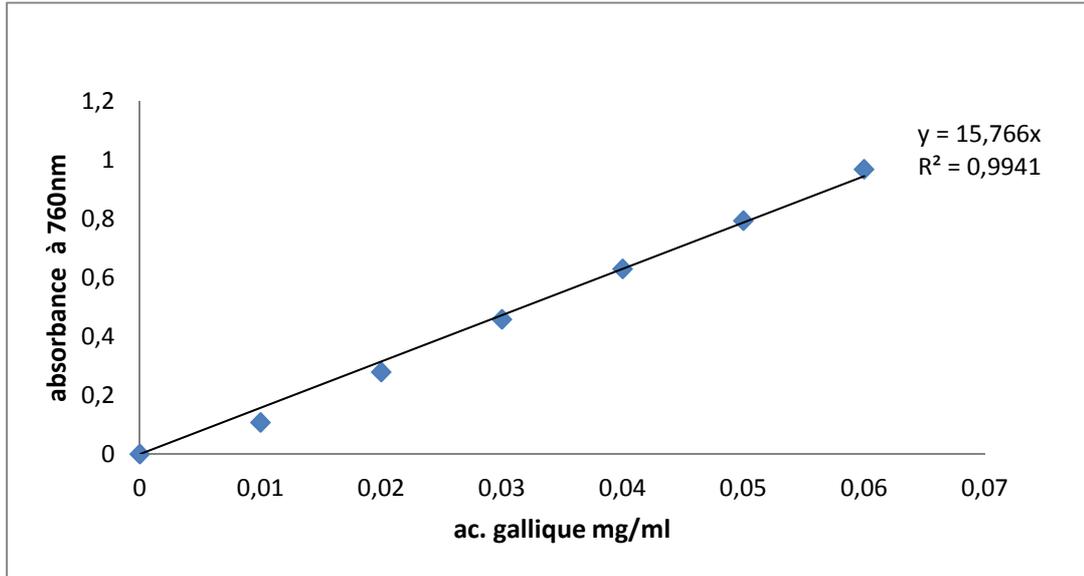


Figure02 : Dosage des phénols totaux solubles.

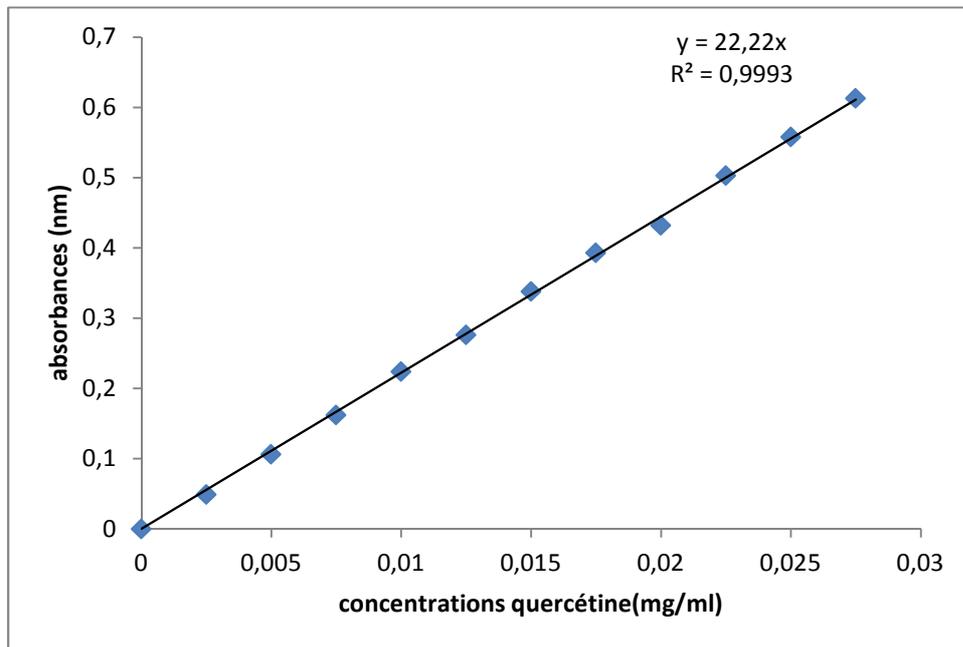


Figure 02 : dosage des flavonoïdes.

Annexe

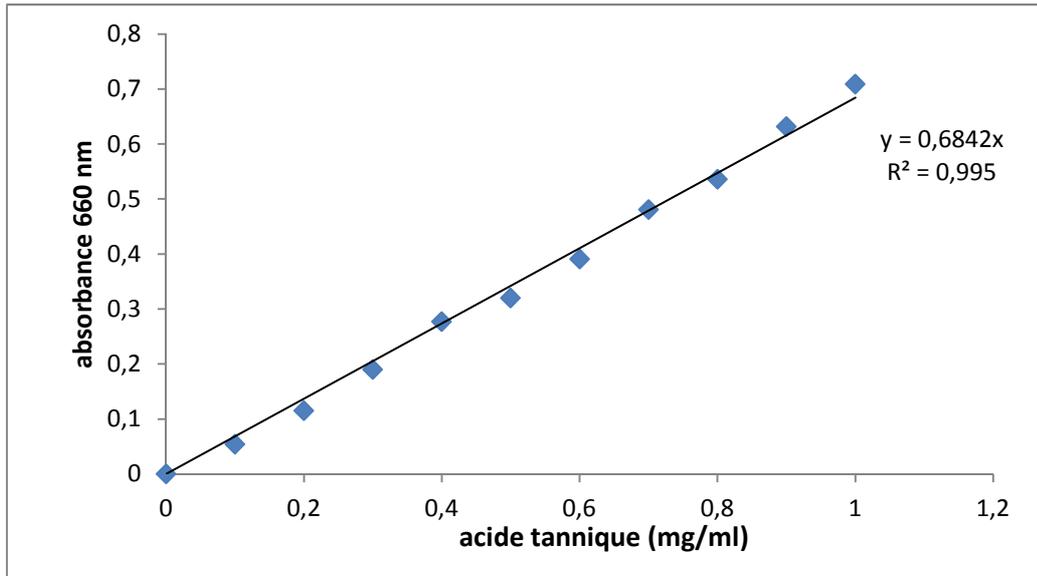


Figure 03 : dosage des tanins hydrolysables.

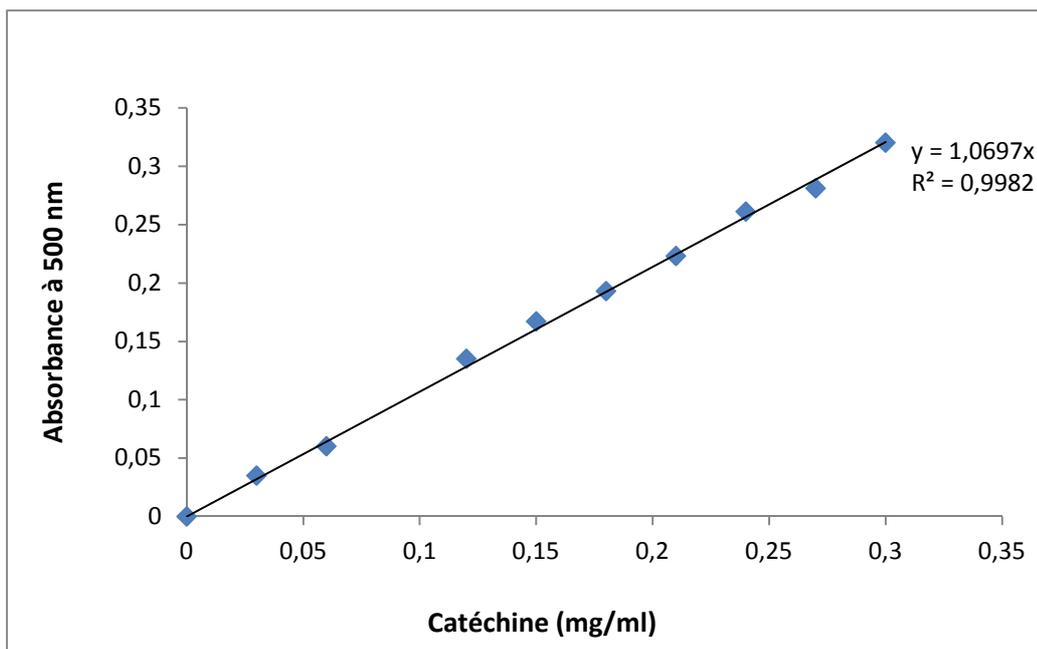


Figure04 : dosage des tanins condensés.

Annexe

Annexe N°2 : Préparation des solutions

Solutions	Réactifs
éthanol 80%	80ml de l'éthanol pure ajuste jusque à 100ml d'eau distillée
méthanol 80%	80ml de méthanol pure ajuste jusque à 100ml d'eau distillée
Solution de folin-ciocalteu(0,1)	10 ml de folin coicalteau + ajoute jusqu'à 100ml d'eau distillée
Solution de carbonate de sodium (7,5) Na₂CO₃	7,5g de la poudre de Na ₂ CO ₃ dissout dans 100ml l'eau distillée.
Solution de chlorure d'aluminium hydrate à 2%(AlCl₃6H₂O)	21,87g de la poudre d'AlCl ₃ hydrate dissout dans 250ml de l'eau distillée.
HCl (0,01M)	0,085ml d'HCL 36% est ajuste à 1 litre l'eau distillée.
FeCl₃ (0,01M dans Hcl 0,01M)	Dissoudre 1,62 g de FeCl ₃ dans un litre de Hcl à 0,01M
HCL24%	24ml de HCl concentré ajusté à 100ml de méthanol.
Vanilline à 5,8%(p/v)	5,8g de vanilline dissoudre dans 100ml de méthanol pure.
vanilline/HCL :	Ça préparation est faite juste avant l'utilisation en mélangeant à volume équivalant la solution de vanilline à 5,8% et la solution d'Hcl 24%
solution de BSA :	1mg de BSA dans 1ml de tampon acétate.
Tampon acétate (0,2M) acide acétique	11,4ml d'acide acétique + 9,86g NaCl + 800ml

Annexe

et 0,17M NaCl)	d'eau distillée. On ajuste le pH à 4,9 avec NaOH(4N). Le volume est ajusté à 1l avec l'eau distillée.
Solution DPPH (65uM/l)	0.0024g DPPH dans 100ml de méthanol pur
Tampon phosphate (0,2M, pH6,6) :	2,72 g de KH_2PO_4 (acide) dans 100 ml d'eau distillée 3,48g de K_2HPO_4 (basique) dans 100ml d'eau distillée La solution acide est ajoutée avec la solution basique jusqu'à l'obtention d'un pH6,6
Ferricyanure de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 1%	1g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ dans 100ml d'eau distillée
Acide trichloracétique (TCA) 10%	10g de TCA dans 100ml d'eau distillée.
Chlorure ferrique (FeCl_3) à 0,1 % (p/v)	0,1g de FeCl_3 dans 100ml d'eau distillée
Tampon phosphate (0,1M, pH7,4) :	1,36g de KH_2PO_4 dans 100ml d'eau distillée 1,74g de K_2HPO_4 dans 100ml d'eau distillée. La solution de KH_2PO_4 est ajusté avec la solution K_2HPO_4 jusqu'à l'obtention d'un pH7,4.
Solution H_2O_2 à 30%	0,10213ml de H_2O_2 à 30% en ajoute jusqu'à 200ml avec la solution tampon phosphate
Ferrosines 5mM	0,123g ferrosines dans 50ml d'eau distillée
FeCl_2 à 2mM	0,025g de $\text{FeCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 100ml d'eau distillée.
Le réactif bouchardats	2g d'iode bisublime(I_2) + 2g KI dans 100ml d'eau distillée

Annexe

Résumé

Les extraits des plantes font actuellement l'objet de nombreuses recherches scientifiques visant à explorer et exploiter leurs propriétés biologiques tant appréciées dans les domaines thérapeutiques, alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. Le but de travail est d'évaluer d'une part la teneur en composés phénoliques de *Ceratonia Siliqua L* et d'autre part le potentiel antioxydant d'extrait brut hydro alcoolique et aqueux.

La teneur en composés phénoliques et l'activité antioxydante dépend aussi bien du solvant d'extraction utilisé et de la partie de la plante. Les extraits hydro alcooliques révèlent une teneur en composés phénoliques plus élevée que les extraits aqueux. Pour l'activité antioxydante, les extraits hydro alcooliques ont montré un pouvoir anti radicalaire du DPPH, réduction de fer, inhibition du peroxyde d'hydrogène et chélation de fer ferreux.

Les résultats obtenus ont montré que l'efficacité d'un antioxydant pour un test ne l'est pas forcément pour un autre.

Mots clés : *Ceratonie Siliqua L*, métabolisme secondaire, composés phénoliques, activité antioxydante, radical DPPH, pouvoir réducteur, chélation de fer ferreux, le peroxyde d'hydrogène.