

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Centre Universitaire - Salhi Ahmed - Naâma

Institut des Sciences et de Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Laboratoire de recherche :

Gestion durable des ressources naturelles dans les zones arides et semi-aride



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER Académique

En Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Effet antimicrobien et antioxydant de l'extrait hydrométhanolique des graines de caroubier (*Ceratonia siliqua* L.)

Elaboré Par : **Battate Saliha**

Brahma Asma

Soutenu le : 06/07/2022

Devant le jury, composé de :

Présidente :	Mme. YAKOUBI Meriem	MCB	C.U.Naâma
Examinatrice :	Mme. AISSAOUI Nadia	MCB	C.U.Naâma
Encadreur :	Mr. MAHDAD Moustafa Yassine	MCB	C.U.Naâma
Co-encadreur :	Mr. SEDDIKI Sidi Mohammed Lahbib	Pr	C.U.Naâma

Année universitaire 2021-2022

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

DEDICACE

**À ceux qui m'ont tout donné sans rien demander en
retour**

**À ceux qui m'ont encouragée dans les moments les plus
difficiles**

**À ceux qui m'ont fait confiance, qui m'ont soutenue sans
faillir dans tous mes projets et qui ont toujours accepté
mes choix**

**À mes chers parents Mama Sakina et papa Ahmed qui
m'ont encouragée, et qui m'ont entourée D'amour, que
Dieu les garde et les protège.**

**Comme je dédie aussi ce travail à mes chères 6 princesses
sœurs et surtout Bouchra.**

A mes chères amie Zouzou, hadjer et Nawel

A mon binôme Asma

Avec qui est j'ai partagé des beaux souvenirs

À toutes les personnes qui me connaissent

Et à toute la promotion de microbiologie.

2021-2022

Rawya

Silva

DEDICACE

Je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers,

A moi-même

Qui était forte devant toutes les difficultés et tous les défis

A l'âme de mon cher père Ben Abdallah

**Qui m'avais toujours poussé et motivé dans mes études
qui a laissé un énorme vide dans ma vie. Oh Dieu, ne
privez pas mon père du Paradis comme il ne m'a rien
privait dans le monde. Tu me manques papa, je t'aime...**

A ma chère maman Karima,

**Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, mon
amour éternel et mon appréciation pour les sacrifices que
vous avez consenti pour nous.**

A mes chers frères

**Oussama, Amin, Amour et ma princesse Halima que
j'aime tant et à qui je souhaite une vie pleine de joie et de
réussite.**

A mon binôme Rawya,

**Pour son amitié, sa confiance et pour tous les moments de
joies que nous avons partagées ensemble.**

A toutes mes amies et en particulier

Bouchra, Soulaf, Wahiba et Narimane.

A ceux m'aiment de loin ou de près.

Asma

Remerciements

Gloire à ALLAH le tout puissant pour la volonté, et la patience qu'il nous a prodiguée tout le long de ce travail. Qui nous a comblées de sa miséricorde jusqu'à la réalisation de ce modeste mémoire. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciement et profonde gratitude à notre promoteur Docteur MAHDAD Moustafa Yassine qui, tout au long de cette étude, nous a fait bénéficier de son expérience, ses conseils fructueux qu'il nous a prodigués, sa patience, et de nous avoir accordé sa confiance en acceptant de nous encadrer.

Nous tenons à exprimer notre gratitude et grande considération au Professeur GHERIB Mohamed pour ses précieux aides, ses conseils, son soutien et sa présence tout au long de la réalisation de ce travail.

Nous exprimons aussi notre considération et notre vive reconnaissance au Professeur SEDDIKI Sidi-Mohammed Lahbib qui a bien voulu nous aider à réaliser ce travail avec beaucoup de compétence et d'efficacité. Sa disponibilité, son aide et ses conseils qui nous ont étaient très précieux.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance au Docteur YAKOUBI Meriem d'avoir bien accepté de présider le jury.

Notre reconnaissance va aussi au Docteur AISSAOUI Nadia d'avoir bien voulu examiner ce travail.

Enfin, merci mille fois à tous ceux qui ont rendu ce travail

Finallement possible.

Résumé

Le présent travail a porté sur l'évaluation *in-vitro* de l'activité antioxydante et antifongique de l'extrait de graine de *Ceratonia siliqua* L. ; espèce de la famille des *Fabacées*, présentant d'énormes intérêts écologiques et socio-économiques.

Les estimations quantitatives des métabolites secondaires à partir de l'extrait des graines de caroube ont révélé des concentrations importantes de polyphénols totaux, de flavonoïdes ainsi que de tanins condensés.

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes : DPPH et FRAP. La fraction acétate d'éthyle a révélé le meilleur pouvoir anti-radicalaire. La même fraction a montré le pouvoir réducteur du fer le plus important suivi par la fraction n-butanolique, tandis que l'extrait méthanolique a montré le plus faible pouvoir réducteur du fer.

L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu solide. Une capacité significative d'inhibition de la croissance fongique à partir de l'extrait de graines de caroube vis-à-vis de la souche *Candida albicans* ATCC 10231 a été trouvée.

Mots clés : Caroubier, graines, activité antioxydante, activité antifongique, extrait hydrométhanolique, *Candida albicans*

Abstract

The present work focused on the *in-vitro* evaluation of the antioxidant and antifungal activity of the seed extract of *Ceratonia siliqua* L.; a species of the *Fabaceae* family, of enormous ecological and socio-economic interest.

Quantitative estimations of secondary metabolites of the carob seed extract revealed significant concentrations of total polyphenols, flavonoids as well as condensed tannins.

Antioxidant activity was assessed by two methods: DPPH and FRAP. The ethyl acetate fraction showed the best anti-free radical activity. The same fraction showed the highest iron reducing power, followed by the n-butanolic fraction, while the methanolic extract showed the lowest iron reducing power.

The antifungal activity was evaluated by the solid state diffusion method. A significant ability to inhibit fungal growth from carob seed extract against *Candida albicans* strain ATCC 10231 was found.

Keywords: Carob tree, seeds, antioxidant activity, antifungal activity, hydromethanolic extract, *Candida albicans*.

ملخص

ركز العمل الحالي على التقييم في المختبر للنشاط المضاد للأكسدة والفطريات لمستخلص بذور الخروب. ينتمي هذا النوع إلى عائلة الفصيلة البقولية ، ذات أهمية بيئية واجتماعية اقتصادية كبرى.

أظهرت التقديرات الكمية للمستقلبات الثانوية لمستخلص بذور الخروب تراكيز معنوية من البوليفينول الكلي والفلافونويد وكذلك العفص المكثف.

تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة بطريقتين; حصر الجذور الحرة وارجاع الحديد. وقد أظهر مستخلص الأسيئات الميثيلية بفعالية ممتازة في تثبيت الجذور الحرة. نفس المستخلص كان الأفضل فعالية في تثبيت في ارجاع الحديد بين مجموعة مستخلصات هذه النبتة، بينما أظهر المستخلص الميثانولي ضعف قوة ارجاع الحديد.

تم اثبات قدرة هذه المستخلصات على تثبيط نمو الفطريات ضد سلالة *Candida albicans* ATCC 10231

الكلمات المفتاحية: شجرة الخروب ، البذور ، النشاط المضاد للأكسدة ، الفعالية المضادة للفطريات ، مستخلص الميثانول المائي

Liste des abréviations

ACeOH Acétate d'Ethyle

ButOH Butanol

DMSO Di-Méthyl-Sulf-Oxyde

DPPH 2,2-DiPhenyl-1-PicrylHydrazyl

EAG Equivalent Acide Gallique

EC Equivalent Catéchine

EC50 Concentration Efficace pour Réduire 50% du Fer

ESM Erreur Standard de la Moyenne

Ext Extrait

IC50 Concentration Inhibitrice de 50% de DPPH

FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power (Pouvoir Réducteur du Fer)

MeOH Méthanol

rpm Rotation Per Minute (Rotation Par Minute)

V / V Rapport Volume par Volume.

% Pourcentage

g Gramme

mg Milligramme

ml Millilitre

mm Millimètre

µg Microgramme

µl Microlitre

UFC Unité Formant Colonie

Liste des tableaux

Tableau 01. Classification taxonomique du genre <i>Ceratonia</i>	03
Tableau 02. Estimations de la superficie récoltée, de la production et du rendement de la caroube pour l'année 2017	06
Tableau 03. Utilisations de la gomme de caroube et ses applications techniques	17
Tableau 04. Concentration et rendement de l'extrait méthanolique des graines de caroube	37
Tableau 05. Concentration et rendement de l'extrait acétate des gaines de caroube	37
Tableau 06. Concentration et rendement de l'extrait butanolique des graines de caroube	37
Tableau 07. Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés des extraits des grains de caroube.....	38
Tableau 08. Valeurs de l'IC ₅₀ des extraits méthanoliques des graines de caroube et ses différentes fractions, exprimé en µg/ml, accompagnée de l'IC ₅₀ de l'acide ascorbique.....	39
Tableau 9. Valeurs de l'EC ₅₀ des extraits méthanoliques des graines de caroube et de ses différentes fractions, exprimées en µg/ml, accompagnée de l'EC ₅₀ de l'acide ascorbique.....	39
Tableau 10. Effet de l'extrait de graines de caroube et du Fungizone dilué sur la croissance (diamètre d'inhibition) de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	42
Tableau 11. Effet de l'extrait de graines de caroube et du Fungizone sur la croissance (diamètre d'inhibition) de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	43

Liste des figures

Figure 01. Origine tropicale pré-méditerranée du caroubier	04
Figure 02. Distribution du caroubier dans le monde	05
Figure 03. Production mondiale de la caroube, année 2017	07
Figure 04. Caroubier imposant de plus de 12 mètres de hauteur	08
Figure 05. Racines du caroubier.....	09
Figure 06. Tronc du caroubier.....	10
Figure 07. Branches du caroubier : la flèche rouge indique une branche principale produisant des gousses	10
Figure 08. Feuille de caroubier.....	11
Figure 09. Différents types d'inflorescences chez le caroubier : Inflorescence A) Femelle ; B) Mâle ; C) Hermaphrodite ; D) Polygames	12
Figure 10. Gousse de caroubier mesurant plus de 24 cm de longueur	13
Figure 11. Graines de caroubier	13
Figure 12. Composants de la graine du caroubier	15
Figure 13. Farine de la caroube	17
Figure 14. Produits alimentaire dérivés de la caroube	17
Figure 15. Gomme de caroube E-410	17
Figure 16. Structure du noyau phénol	18
Figure 17. Structures chimiques des acides phénoliques (i) : acide hydroxy-benzoïque ; (ii) acide cinnamique.....	19
Figure 18. Structures chimiques des sous-classes des flavonoïdes	19
Figure 19. Structures chimiques des sous-classes des tanins (i) pro anthocyanidine (un tanin condensé) ;(ii) 1, 2,3-tri-O-galloyl- β -D-glucose (un tanin hydrolysable).....	20
Figure 20. Activité biologique des polyphénols.....	20
Figure 21. Les graines de caroube après broyage.....	23
Figure 22. Schéma représentant les étapes de l'extraction des graines de caroube et les différentes activités antioxydantes	24
Figure 23. Les principales étapes de l'extraction hydrométhanolique à partir des graines de caroubier.....	25
Figure 24. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	

.....	26
Figure 25. Protocole du dosage des polyphénols totaux	27
Figure 26. Protocole du dosage des flavonoïdes	28
Figure 27. Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes	29
Figure 28. Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés	29
Figure 29. Protocole du dosage des tanins condensés.....	30
Figure 30. Protocole du test DPPH	31
Figure 31. Protocole du test FRAP.....	33
Figure 32. Rendement d'extraits méthanolique, d'acétate et butanolique des graines de caroube	37
Figure 33. Effet antifongique de l'extrait sur la souche <i>C.albicans</i> ATCC10231. Les barres horizontales (noire) représentent la zone d'inhibition	40
Figure 34. Moyenne des diamètres des zones d'inhibition. Les barres représentent les erreurs standards des moyennes	41
Figure 35. Effet antifongique de l'extrait de caroube (point blanc sur les disques) et du Fungizone dilué sur <i>C. albicans</i> ATCC 10231	42
Figure 36. Effet d'inhibition sur la croissance de <i>C. albicans</i> (dose 80 µl). Les disques de coloration orange représentent le Fungizone, ceux en blanc cassé, l'extrait de graines de caroube	44
Figure 37. Effet d'inhibition sur la croissance de <i>C. albicans</i> (dose 50 µl). Les disques de coloration orange représentent le Fungizone, ceux en blanc cassé, l'extrait de graines de caroube	44

Table des matières

Introduction	01
---------------------------	----

Partie I : Synthèse bibliographique

I. Présentation du caroubier	03
I.1 Taxonomie et terminologie commune	03
I.2 Origine et répartition géographique	04
I.2.1 Origine de l'espèce	04
I.2.2 Répartition géographique	04
I.2.2.1 Distribution dans le monde	04
I.2.2.2 Distribution en Algérie	05
I.3 Aire de production du caroubier dans le monde	05
I.4 Aire de production en Algérie	07
I.5 Description botanique	08
I.5.1 Racines	09
I.5.2 Tronc	09
I.5.3 Branches	10
I.5.4 Feuilles	10
I.5.5 Fleurs	11
I.5.6 Fruits	11
I.5.6 Graines	13
I.6 Reproduction du caroubier	14
1.7 Ecologie du caroubier	14
1.8 Multiplication du caroubier	14
1.8.1 Par semis	14
1.8.2 Par greffage	14
1.8.3 Par culture <i>in-vitro</i>	15
1.9 Propriétés et utilisations du caroubier	15
1.9.1 Propriétés	15
1.9.2 Utilisations	16

II. Les métabolismes secondaires	18
II.1 Les polyphénols	18
II.1.1 Les acides phénoliques	19
II.1.2 Les flavonoïdes	19
II.1.3 Les tanins	20
II.2 Propriétés	20
II.2.1 L'activité antimicrobienne.....	21
II.2.2 L'activité antioxydante	21

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre 1 : Matériel et méthode	23
I.1 Extraction et fractionnement des composés phénoliques	23
I.1.1 Dosage des composés phénoliques	26
I.1.1.1 Dosage des polyphénols totaux.....	26
I.1.1.2 Dosage des flavonoïdes.....	28
I.1.1.3 Dosage des tanins condensés	29
I.1.2 Evaluation <i>in-vitro</i> de l'activité antioxydant	30
I.1.2.1 Test de piégeage du radical DPPH.....	31
I.1.2.2 Pouvoir réducteur du fer (Ferric reducing antioxidant power)	32
I.1.3 Activité antimicrobienne.....	34
I.1.3.1 Effet antifongique de l'extrait	34
I.1.3.2 Effet antifongique de l'extrait et du Fungizone dilué	35
I.1.3.3 Effet antifongique de l'extrait et du Fungizone non dilué	35
I.4 Analyse statistique des données	35
Chapitre 2 : Résultats et discussion	36
I.1 Rendements selon la préparation	36
I.2 Dosage des composés phénoliques	37
I.2.1 Teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés	37
I.3 Evaluation <i>in-vitro</i> de l'activité antioxydante	38
I.3.1 Capacité de piégeage du radical libre DPPH	38
I.3.2 Capacité de la réduction du fer	39
I.4 Activité antifongique	40

I.4.1 Effet antifongique de l'extrait des graines de caroubier	40
I.4.2 Effet antifongique de l'extrait et du Fungizone dilué (1/49)	41
I.4.3 Effet antifongique de l'extrait des gaines de caroube et du Fungizone non dilué	43
Conclusion et perspectives	45
Références bibliographiques	47
Annexes	

INTRODUCTION

Introduction

Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) est un arbre fruitier de la famille des Fabacées, ayant une origine tropicale pré-méditerranée (Mahdad, 2022). Cette espèce a été domestiquée depuis la nuit des temps, remontant à 4000 ans avant J.C. Elle est cultivée de manière extensive depuis au moins 2000 ans avant J.C. pour ses produits dérivés mais aussi pour sa tolérance au manque d'eau (Ait Chitt et al., 2007 ; Biner et al., 2007). En effet, *C. siliqua* est une espèce xérophile, sclérophylle, héliophile, calcicole, et thermophile (Mahdad et Gaouar, 2016).

Toutes les parties du caroubier (feuille, fleur, fruit, graines, bois, écorce, racine) ont une valeur économique et des avantages considérables pour la santé et peuvent être utilisées dans plusieurs domaines (Mahdad et al., 2022). Il est considéré comme l'un des arbres fruitiers et forestiers ayant le plus grand potentiel de valorisation, en raison de sa forte teneur en nutriments, mais surtout pour ses graines, qui font l'objet de transactions commerciales dont la valeur dépasse de loin celle de la production ligneuse (Biner et al., 2007).

En raison de leur uniformité, les graines du caroubier sont appelées 'carats' et ont pendant longtemps servi aux joailliers comme unité de poids pour la pesée des diamants, des perles et d'autres pierres précieuses (1 carat = 205,3 mg) (Rejeb, 1995). On attribue aux arabes l'utilisation des graines entières du caroubier comme unité de poids dans le commerce de substances et matériels précieux. Il apparait donc que 'el kilate' en espagnol ou 'carat' en français (0,2 g) vient du nom arabe (Al-karat ou qirât) donné à la graine, laquelle est caractérisée par sa relative constance de poids (Albanell, 1990 ; Mahdad, 2013).

Les gaines de caroube contiennent une gomme mucilagineuse, riche en galactomannane connu sous le code E-410, et est utilisée dans l'industrie alimentaire comme épaississant, stabilisant, liant et gélifiant ou comme agent dispersant (Batlle et Tous, 1997). Ben Ayache et al. (2020) ont observé que les graines présentent les propriétés anticarcinogènes les plus puissantes sur tous les carcinomes cellulaires humains testés. Le potentiel antioxydant des extraits de graines est prouvé et avéré par de nombreux travaux (Lakkab et al., 2019 ; Fidan et al., 2020 ; Ben Ayache et al., 2021). Toutefois, très peu d'étude, parmi celles consacrées à la graine de caroube, ont fait l'objet de recherche relative à l'effet antimicrobien de ses extraits. D'où l'objectif de cette étude qui est d'évaluer principalement l'effet antimicrobien de l'extrait

hydrométhanolique des graines et de confirmer via un objectif secondaire leur potentiel antioxydant.

La présente étude comprend deux grandes parties, la première est consacrée à la présentation de l'espèce *C. siliqua* ainsi que les différents métabolites secondaires et les activités biologiques relatives aux effets antimicrobiens et antioxydants. La seconde partie est expérimentale englobant deux chapitres, celui dédié aux matériels et méthodes utilisées pour l'extraction et évaluation de l'effet antifongique et antioxydant à partir de l'extrait hydrométhanolique des graines de caroubier, tandis que le deuxième chapitre est consacré aux résultats et discussion.

PARTIE I :
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Présentation du caroubier

I.1 Taxonomie et terminologie commune

Ceratonia siliqua L., nom scientifique proposé par Linnaeus est dérivé du grec keras = corne et du latin siliqua (gousse), faisant allusion à la forme de son fruit, qui ressemble à une corne de bouc (Bolonos, 1955). Dans différents pays et langues le nom du caroubier découle d'une forme générale du nom arabe Al kharroub, comme c'est le cas del algarrobo ou garrofero en espagnol, carrubo en italien caroubier en français, et garrofer en catalan...etc (Albanell, 1990).

Le genre *Ceratonia* appartient à la famille des Leguminosae (*Fabaceae*) de l'ordre des Rosales, sous-famille des Caesalpinioideae, tribu des Cassieae (Tableau 01). Toutefois, cette position taxonomique demeure controversée (Mahdad, 2013). En effet, Tucker (1992 a) suggère que *C. siliqua* peut avoir un lien avec la sous-famille des Mimosoideae. Par ailleurs, certains auteurs ont pu prouver que le genre *Ceratonia* est isolé morphologiquement des autres genres de *Cassieae* (Hillcoat et al., 1980 ; Tucker, 1992 a et b) et que de ce fait, il doit être exclu de la tribu des Cassieae (Irwin et Barneby, 1981 ; Tucker, 1992 b). De plus, des études cytologiques ont révélé que le genre *Ceratonia* avec un nombre total de chromosome $2n = 24$ (Frahm-Leliveld, 1957 ; Goldblatt, 1981 ; Arista et Talavera, 1990 ; Bureš et al., 2004) est éloigné des autres membres des Cassieae dont le nombre de chromosome est de $2n = 28$ (Goldblatt, 1981).

Tableau 01. Classification taxonomique du genre *Ceratonia* (Sbay, 2008)

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliosida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Rosales
Famille	Legumineuses
Sous-famille	Caesalpinioideae
Sous-tribu	Ceratoninae
Genre	<i>Ceratonia</i>

I.2 Origine et répartition géographique

I.2.1 Origine de l'espèce

Les données génétiques et fossiles soutiennent une origine pré-méditerranéenne du caroubier et ses ancêtres étaient probablement distribués largement autour de la mer de Téthys au cours du paléogène dans des forêts tropicales (Figure 01) qui ont été appauvries par les extinctions successives pendant la transition vers le climat méditerranéen (Mahdad et al., 2022).

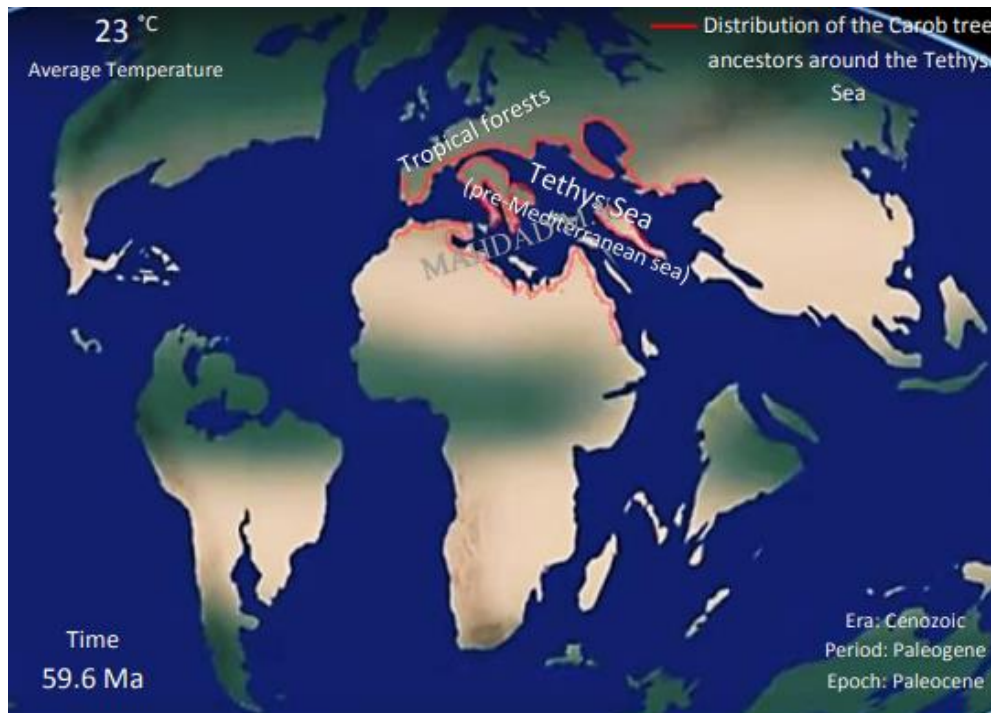


Figure 01. Origine tropicale pré-méditerranée du caroubier (Mahdad, 2022)

I.2.2 Répartition géographique

I.2.2.1 Distribution dans le monde

Le caroubier s'est récemment répandu depuis l'Espagne (Figure 02) vers d'autres régions à climat méditerranéen comme la Californie (USA), le Mexique, le Chili et l'Argentine (Mahdad, 2022). Il a été introduit dans certaines parties de l'Australie par les migrants méditerranéens et en Afrique du Sud et en Inde par les Anglais (Batlle et Tous, 1997).

La Méditerranée est incontestablement le centre de diversification de *C. siliqua* et par conséquent, c'est la région qui abrite la plus importante ressource génétique de l'espèce, laquelle est nécessaire pour la mise en place de programmes d'amélioration génétique chez l'espèce (Mahdad, 2022).

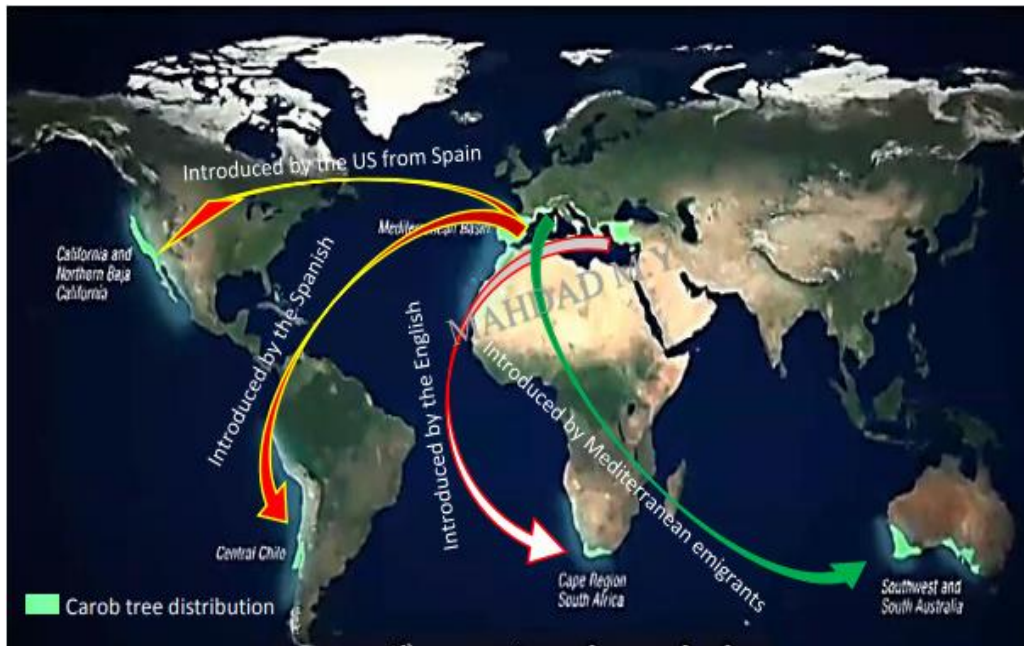


Figure 02. Distribution du caroubier dans le monde (Mahdad, 2022)

I.2.2.2 Distribution en Algérie

Les caroubiers ont été rarement plantés dans l'Atlas saharien et très fréquemment dans le tell. On le trouve généralement dans les régions au climat méditerranéen (Baumel et al., 2018), mais aussi dans les régions au climat continental comme la steppe algérienne, où des caroubiers sauvages ont été observés à 1168 m d'altitude dans des zones où les températures atteignent régulièrement - 10 °C (Mahdad et Gaouar, 2016). L'espèce *C. siliqua* est en association commune avec l'olivier (*Olea europaea*), le lentisque (*Pistacia lentiscus*), et occasionnellement associée à l'olivier sauvage (*Olea oleaster*) et au lentisque du Mont Atlas (*Pistacia atlantica*), et rarement au laurier-rose (*Nerium oleander*) dans les thalwegs de la steppe algérienne (Mahdad et al., 2022).

I.3 Aire de production du caroubier dans le monde

La superficie récoltée totale du caroubier dans le monde en 2017 est estimée à 45.626 ha (Tableau 02) desquels 38.227 ha (83,78 %) sont répartis entre le Portugal, le Maroc, l'Espagne et l'Italie (Mahdad, 2022). La production mondiale de la caroube est estimée à 173.423 t et se concentre principalement en Portugal, premier pays producteur avec 41.329 t, ce qui représente le quart de la production mondiale (Figure 03) suivi par l'Espagne avec le 1/5 de la production

mondiale et l'Italie (16,67 %). L'Algérie occupe le neuvième rang avec une production de 4042 t, soit 2,33 % de la production mondiale (Mahdad, 2022).

Tableau 02. Estimations de la superficie récoltée, de la production et du rendement de la caroube pour l'année 2017 (Mahdad, 2022)

Pays	Superficie récoltée (ha)	Production (tonnes)	Rendement (t /ha)
Portugal	13240	41329	3.12
Maroc	10234	21611	2.11
Espagne	9177	36368	3.96
Italie	5576	28910	5.18
Grèce	1757	12287	6.99
Israël	1730	477	0.27
Chypre	982	7475	7.61
Algérie	827	4042	4.89
Turquie	674	15016	22.28
Croatie	513	461	0.90
Liban	413	4431	10.73
Tunisie	402	819	2.04
Ukraine	101	197	1.95
Total	45626	173423	72.04

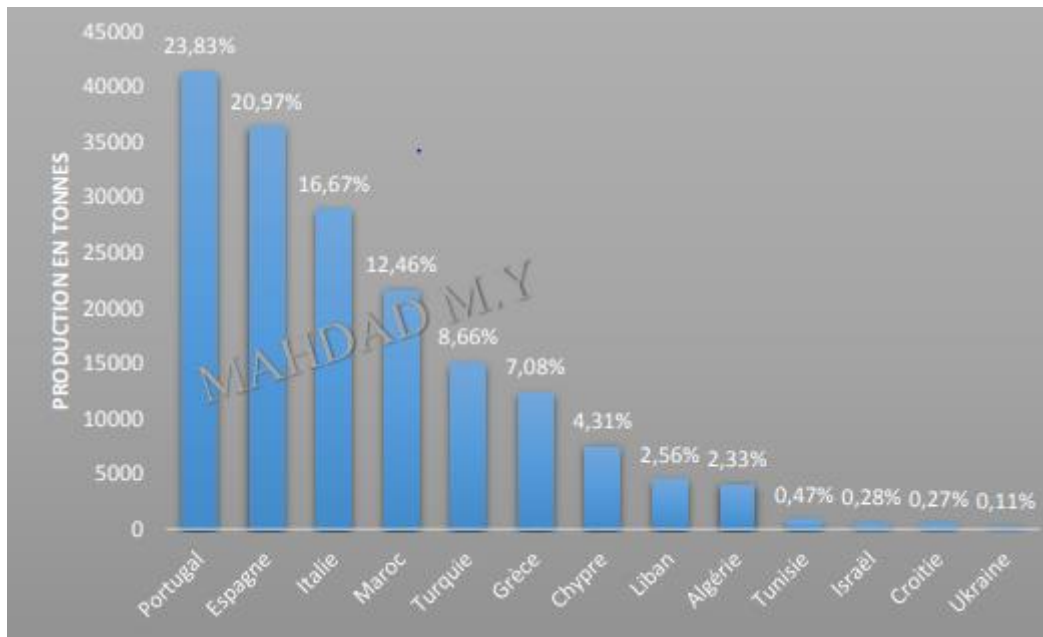


Figure 03. Production mondiale de la caroube, année 2017 (Mahdad, 2022)

I.4 Aire de production en Algérie

En Algérie, la superficie récoltée du caroubier a diminué de façon spectaculaire, passant de 11 000 hectares en 1961 à 732 ha en 2019 (Mahdad, 2022). Le caroubier était cultivé sur 927 hectares en 2009, dont 645 hectares, soit 69,58 % de la superficie totale, dans la wilaya de Bejaïa. La production nationale de caroube a été estimée à 3384 tonnes, la wilaya de Bejaïa représentant 54,42% du total (842 tonnes), suivie des wilayas de Blida (23,79%) et Tipaza (16,55%) (Mahdad, 2013).

Les opérateurs économiques, notamment la SARL Boublenza, leader national de la transformation et de l'exportation des dérivés de la caroube, ont estimé la production nationale de caroube à 11 500 tonnes en 2018, soit une hausse de 340 % par rapport à 2009 (Mahdad, 2022). Cette forte augmentation n'est pas due à une augmentation de la surface de production, qui est en baisse constante depuis l'indépendance, mais plutôt à une augmentation de l'exploitation de la caroube par les collecteurs, de plus en plus motivés par des prix qui augmentent sensiblement d'année en année, grâce à l'intensification de la concurrence suite à l'installation de nouveaux acteurs économiques dans le secteur de la transformation et l'exploitation du caroubier (Mahdad, 2022).

I.5 Description botanique

Le caroubier est un arbre présentant un aspect général qui peut être ouvert, érigé ou pleureur avec un feuillage abondant et persistant et son houppier est généralement peu dense à dense chez les pieds femelles et dense à très dense chez les arbres mâles et se caractérise par des branches solides (Mahdad, 2022). Il peut atteindre dans des conditions propices une hauteur de 12 mètres (Figure 04) et enregistrer une circonférence au niveau de la base du tronc pouvant atteindre les 4 mètres (Mahdad, 2022).



Figure 04. Caroubier imposant de plus de 12 mètres de hauteur (Mahdad, 2022)

I.5.1 Racines

La racine du caroubier est très ramifiée en surface (Figure 05), avec des formations épaisses dans sa partie supérieure qui en se séparant du tronc vont prendre une direction oblique par géotropisme positif. Ces formations caractérisent la majeure partie du système racinaire du caroubier et forment un socle considérable même s'il est moins marqué que celui formé chez l'olivier (Mahdad 2013).

Les racines se caractérisent par une croissance lente mais avec un développement important au niveau des extrémités, de sorte que le volume des racines dépasse rapidement le double ou le triple de celui de l'houppier, ce qui permet de classer cette espèce parmi celles qui présentent un système racinaire très étendu et spécialement distribué en surface (Melgarejo et Salazar, 2003).

Bien que le caroubier ait été classé dans la "famille des légumineuses" grâce aux caractéristiques de son fruit, cependant, il n'a pas été possible de démontrer qu'il possédait des nodules symbiotiques de *Rhizobium* excepté dans un seul cas (Mahdad, 2013).



Figure 05. Racines du caroubier (Mahdad, 2013)

I.5.2 Tronc

Le tronc du caroubier (Figure 06) est épais, robuste avec de clairs canaux de circulation de la sève associés aux racines les plus épaisses, ce qui leur donne un aspect tortueux, particulièrement marqué chez certaines variétés (Melgarejo et Salazar, 2003). L'écorce est

rugueuse à la base et lisse sur la partie supérieure du tronc et à la base des branches (Mahdad, 2013), sa couleur est généralement brin-grisâtre et occasionnellement grise ou brune (Mahdad, 2022).

I.5.3 Branches

Selon leur âge, les branches présentent les différentes caractéristiques suivantes (Albanell, 1990) :

- Les branches principales d'âge avancé sont généralement épaisses, tortueuses et avec une tendance à l'horizontalité (Figure 07) due à leur poids et aux tailles de formation.
- Les branches secondaires sont de taille moyenne avec une tendance à être plus au moins érigées selon leur âge en particulier dans la partie supérieure de la couronne.
- Les jeunes branches ou rameaux, de taille plus petite, sont situées dans la partie externe de la couronne ou zone de croissance.



Figure 06. Tronc du caroubier (Mahdad, 2013)



Figure 07. Branches du caroubier : la flèche rouge indique une branche principale produisant des gousses (Mahdad, 2022)

I.5.4 Feuilles

Les feuilles (Figure 08) persistantes, d'une longueur de 12 à 25 cm, se caractérisent par un rachis mesurant 9 à 22 cm et portant 5 à 12 folioles opposées. Elles sont coriaces, entières, de

forme ovale, lobée ou elliptique, avec une couleur vert foncé, verte ou vert clair (Mahdad, 2022).



Figure 08. Feuille de caroubier (Photos prises par les auteurs).

I.5.5 Fleurs

Le caroubier est un arbre polygame-trioïque ; cette dénomination fut donnée par Linné (Mahdad, 2013). D'un point de vue sexuel, *C. siliqua* se caractérise par l'existence de quatre types d'arbre. Ainsi, il est possible de rencontrer des pieds (Mahdad, 2022) :

- ❖ Mâles avec des fleurs caractérisées par des étamines à filaments longs et avec un pistil non développé (Figure 09-A). Ces pieds utilisés comme pollinisateurs sont habituellement nommés en espagnol "borrers" ou "judíos", signifiant juifs en français (Albanell, 1990) ;
- ❖ Femelles avec un pistil bien développé et des étamines rudimentaires (Figure 09-B) ; ils sont les plus abondants ;
- ❖ Hermaphrodites à fleurs avec étamines et pistils bien développés (Figure 09-C) ; peu abondants ;
- ❖ Polygames avec des fleurs femelles, mâles et hermaphrodites (Figure 09-D) ; ils sont rares.

I.5.6 Fruits

Le fruit du caroubier connu sous le nom de kharrouba en arabe, algarroba en castillan et caroube en français est classifié habituellement compte tenu de sa faible teneur en eau au moment de sa collecte comme un fruit sec et cela malgré son aspect pulpeux (Albanell, 1990).

La caroube est un fruit indéhiscent, allongé d'une grande taille de 7 à 25 cm de long (Figure 10) et de 1 à 3,5 cm de large, et environ 0,9 cm d'épaisseur. Il est vert puis brun et au moment de la maturité d'un ton brun, brun foncé, brun rougeâtre ou noir selon les variétés. Il est sinueux autour des bordures, courbé, torsadé ou droit et présente un tissu pulpeux riche en sucre. La gousse est divisée à l'intérieur par des cloisons pulpeuses contenant 3 à 16 graines, soit 3,5 à 36,5 % du poids de la gousse en fonction de la variété et des conditions environnementales (Mahdad, 2022).



Figure 09. Différents types d'inflorescences chez le caroubier : Inflorescence A) Femelle ; B) Mâle ; C) Hermaphrodite ; D) Polygames (Mahdad, 2022).



Figure 10. Gousse de caroubier mesurant plus de 24 cm de longueur (Mahdad, 2022)

I.5.6 Graines

Les graines du caroubier sont petites et aplaties, d'une forme ovale, ronde ou amorphe avec un pôle basal tronqué et écrasé en zone apicale (Figure 11). Son tégument est lisse ou rugueux, dur et de couleur marron, brun, rougeâtre ou brun rougeâtre. Elles présentent des dimensions de 7 à 12 mm de long sur 5 à 9 mm de largeur avec 1 à 6 mm d'épaisseur.

La graine du caroubier est composée de trois parties (Melgarejo et Salazar, 2003) :

1. Episperme ou tégument, il recouvre la graine et est constitué principalement de cellulose, de lignine et de tanin. Il se compose de deux enveloppes distinguées, l'une externe appelée testa, colorée et dure et l'autre interne nommée tegmen qui est plus blanche et moue. Le tégument représente 30 à 33 % de la graine ;
2. Endosperme ou albumen, il se situe sous l'épisperme et constitue le tissu de réserve pour la germination de l'embryon. Economiquement, c'est la partie la plus intéressante de la graine grâce à sa teneur élevée en galactomannane ou gomme de caroube. L'endosperme représente 42 à 46 % de la graine ;
3. Germe ou embryon, représente 23 à 25 % de la graine.



Figure 11. Graines de caroubier (Mahdad, 2022)

1.6 Reproduction du caroubier

À l'instar de nombreuses plantes tropicales, le caroubier est l'unique arbre méditerranéen dont la saison de floraison est en été - automne. Cependant, le temps et la durée de la période de floraison dépendent des conditions climatiques locales (Batlle et Tous, 1997). En effet, une floraison précoce a été observée en Juin chez les caroubiers des régions côtières (climat doux) surtout chez les pieds mâles et hermaphrodites et occasionnellement chez les femelles, tandis que ce phénomène était absent chez les caroubiers des zones intérieures à climat continental où les conditions environnementales sont plus rudes (Mahdad, 2022). La pollinisation chez le caroubier est assurée en grande partie par les insectes (Retana et al., 1990; Rejeb et al., 1991; Ortiz et al., 1996).

1.7 Ecologie du caroubier

Le caroubier appartient à l'écosystème "garrigue du littoral méditerranéen" sur sols calcaires. C'est une espèce thermophile, xérophile et héliophile. Elle croît bien dans certaines régions tempérées et subtropicales et tolère les zones côtières chaudes et humides, mais elle est très sensible au froid d'hiver, de sorte qu'elle peut vivre seulement à proximité des côtes avec des altitudes de moins de 700 m (Mahdad, 2022), bien qu'elle soit dans certaines zones présente sur des terrains plus élevés (1168 m) mais toujours avec des expositions adéquates (Mahdad, 2013).

Le caroubier et l'oranger ont des exigences en température similaires, mais le caroubier tolère des sols plus pauvres et nécessite beaucoup moins d'eau (Batlle, 1997) et peut tolérer des taux très élevés de salinité et de calcaire actif (Mahdad et Gaouar, 2016 ; Mahdad, 2022).

1.8 Multiplication du caroubier

1.8.1 Par semis

Cette technique de multiplication par voie sexuée est la plus utilisée en Algérie (Mahdad, 2022), toutefois elle présente des inconvénients non négligeables. En effet, le semis chez le caroubier, espèce dioïque, donne un ratio de 50% de femelles et 50% de mâles improductifs, de plus, la descendance issue des semences et donc d'une ségrégation allélique est très hétérogène et est génétiquement non conforme au parent femelle sélectionné (Mahdad, 2022).

1.8.2 Par greffage

La propagation par greffage chez le caroubier est une technique efficace et dominée. Elle fut pratiquée en Andalousie musulmane via la technique de la greffe grec ou en écusson (Mahdad,

2022). En Algérie, la technique en placage d'écusson chez le caroubier a donné de bons résultats (Boublenza, 2020), toutefois, la greffe en écusson reste la technique la plus utilisée (Mahdad, 2022).

1.8.3 Par culture *in-vitro*

C'est l'une des voies de multiplication asexuée les plus prometteuses, essentiellement depuis le développement de protocoles d'organogénèse via des explants issus de semences germées *in-vitro*, permettant d'atteindre des pourcentages efficaces d'enracinement (Mahdad, 2022).

1.9 Propriétés et utilisations du caroubier

1.9.1 Propriétés

La pulpe et les graines sont les deux composants majeurs de la gousse du caroubier et représentent respectivement 90% et 10% de son poids total (Mahdad, 2013). Elle possède une teneur élevée en sucre (48-56%) (Ayaz et al., 2007). En outre, elle contient environ 18% de cellulose et d'hémicellulose (Batlle et Tous, 1997). L'analyse de la composition en sucre de la pulpe de plusieurs populations Algériennes de caroubier a révélé une richesse en sucre totaux de 43,22 à 50,28% (Boublenza et al., 2019). En valeur alimentaire, les caroubes sont similaires à la plupart des graines de céréales (NAS, 1979).

La graine (Figure 12) est composée de 30 à 33% de tégument, 42 à 46% d'albumen et 23 à 25% d'embryon (Neukom, 1988). L'épisperme est considéré comme une source naturelle pour la production de polyphénols antioxydants (Makris et Kefalas, 2004). L'endosperme est constitué essentiellement d'une gomme nommée galactomannane. C'est une molécule de polysaccharide composée de deux unités de sucre : la mannose et la galactose dans un rapport de 4 : 1 (Mahdad, 2013).

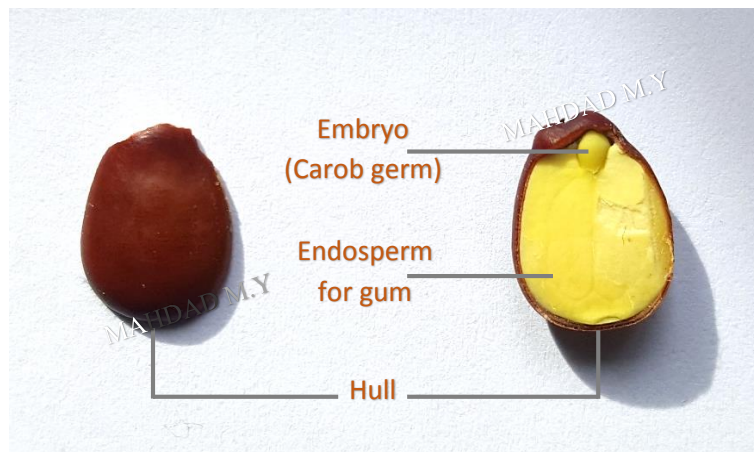


Figure 12. Composants de la graine du caroubier (Mahdad, 2022)

1.9.2 Utilisations

Toutes les parties du caroubier (racines, bois, écorce, feuilles, fleurs et fruits) ont une valeur économique et des avantages considérables pour la santé et peuvent être utilisées dans plusieurs secteurs.

Le bois du caroubier, appelé carouge (Rivière et Leco, 1900) est dur à grain fin, il est utilisé dans la fabrication d'ustensiles et la production de combustible (Batlle et Tous, 1997). L'écorce de l'arbre est utilisée en tannerie (Batlle, 1997) et est très riche en substances antioxydantes (El Hajaji et al., 2011).

Rejeb et al. (1991) ont estimé la valeur énergétique des feuilles du caroubier à 0,25 UF/kg de matière sèche. Par ailleurs, Corsi et al. (2002) ont démontré la capacité extraordinaire des extraits de feuilles et de gousses à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales.

Les gousses de caroube sont traditionnellement utilisées comme aliment pour les ruminants (Louca et Papas, 1973) et les non-ruminants (Sahle et al., 1992), mais aussi pour la consommation humaine (Azab, 2017). Sa pulpe (Figure 13) est utilisée comme substituant du cacao dans la production de chocolat car elle est moins calorifique et ne contient pas de caféine ni de théobromine (Craig et Nguyen, 1984). Elle joue un rôle effectif dans l'élimination des parasites intestinaux (Min et Hart, 2003) et dans le traitement des diarrhées aiguës infantiles (Serairi-Béji et al. 2000). Elle peut être utilisée comme ingrédient dans certains aliments (Figure 15), tels que les gâteaux, bonbons, crèmes glacées, boissons, pâte à pizza, café, pâte à tartinée, confiture...etc. (Mahdad, 2022).

Compte tenu de son énorme intérêt économique, la gomme de caroube (Figure 14) reste le produit le plus important parmi ceux dérivés de la graine (Tableau 03). Elle constitue un tiers du poids total de la graine (Jones, 1953). Cette gomme mucilagineuse, riche en galactomannane connue sous le code E-410, est utilisée dans l'industrie alimentaire, dans l'impression, la photographie, les textiles, les produits pharmaceutiques, les cosmétiques, les produits chimiques, le pétrole, les explosifs et les aliments mixtes (Tous et al., 2013). L'utilisation possible, dans l'industrie alimentaire, de polyphénol antioxydant contenu naturellement dans l'enveloppe tégumentaire (Makris et kafalas, 2004) a soulevé d'énormes intérêts au même titre que la production industrielle de gomme de caroube (Batista et al., 1996).



Figure 13. Farine de la caroube (photo internet)



Figure 15. Gomme de caroube E-410 (photo internet)



Figure 14. Produits alimentaire dérivés de la caroube (photo internet)

Tableau 03. Utilisations de la gomme de caroube et ses applications techniques.

Utilisations industrielles	Applications
Pharmaceutiques	Produits anti cœliaques, pommades, comprimés, dentifrice
Cosmétiques	Emulsions et mousses, mousse à raser
Textiles	Epaississant de coloration
Papier	Produit de flottation pour matériel de couverture ; épaississant pour traitement de surface
Chimiques	Colles, coloriage, polissage, teinture, allumettes, pesticides
Pétrole	Adjuvant de floculation pour augmenter la stabilité
Mines	Produit de flottation
Béton	Renforcement de la solidification
Explosifs	Liant d'eau pour les explosifs

Droste (1993) mentionné dans (Batlle et Tous, 1997).

II. Les métabolismes secondaires

Les études épidémiologiques ont montré que l'alimentation riche en produits végétaux semble aider à lutter contre le développement de diverses maladies associées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et divers cancers, et ce grâce aux micro-constituants de ce régime, dont les polyphénols sont les principaux représentants (Pincemail, 2007). Ces polyphénols sont connus pour leur pouvoir antioxydant via leur capacité à piéger les radicaux libres et pourraient donc être impliqués dans la contribution à limiter le stress oxydatif.

II.1 Les polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires très répandus dans le règne végétal. Ils sont présents dans toutes les parties des plantes mais ils varient dans la répartition quantitative des différents tissus. (Dai et al., 2010 ; Waksmundzka H et al., 2011).

Ces métabolites ne sont pas strictement vitaux pour les végétaux, Cependant ils jouent un rôle majeur dans les interactions environnementale de la plante, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème (Richter, 1993).

Les polyphénols se distinguent par l'union de plusieurs « phénols », qui sont considérés comme leur composant principal et structurel. Ils peuvent avoir la présence d'au moins un noyau phénolique à 6 carbones (Figure 23), auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle (OH) libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside (Bruneton, 1999 ; Balasundram et al., 2006).

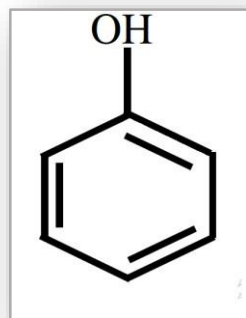


Figure 16. Structure du noyau phénol (Sarni et al., 2006)

La classification des polyphénols est basée essentiellement sur la structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux (D'Archivio et al., 2007 ; Kanti et al., 2009).

II.1.1 Les acides phénoliques

Peuvent être divisés en deux catégories selon leur structure : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique (Figure 17) (Kanti et al., 2009).

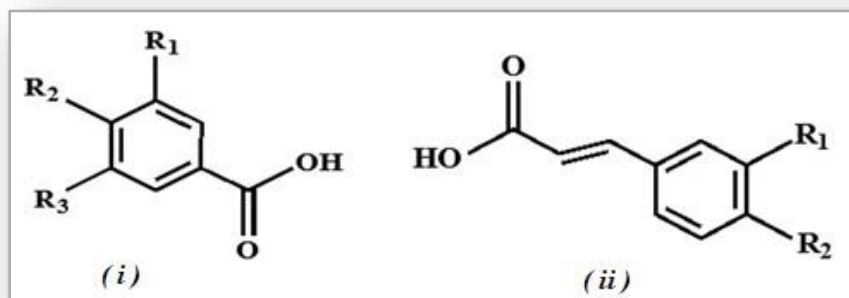


Figure 17. Structures chimiques des acides phénoliques (i) : acide hydroxy-benzoïque ; (ii) acide cinnamique (Kanti et al., 2009)

II.1.2 Les flavonoïdes

Un groupe qui possèdent un squelette de base à quinze atomes de carbones constitués de deux noyaux aromatiques et d'un hétérocycle central de type pyrane, formant une structure C6-C3-C6 (Figure 18) (Ghedira, 2005 ; Kanti, al., 2009).

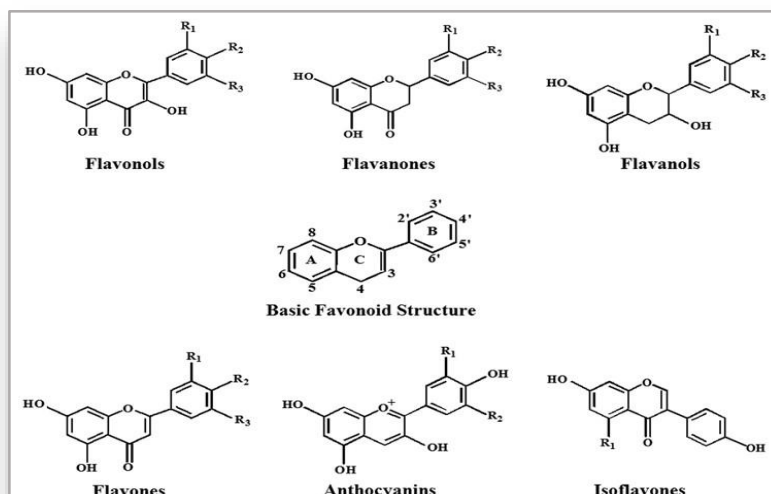


Figure 18. Structures chimiques des sous-classes des flavonoïdes (Kanti et al., 2009)

II.1.3 Les tanins

Sont divisés selon leur structure en deux groupes, tanins hydrolysables et tanins condensés (Figure 19) (Linden et Lorient, 1994).

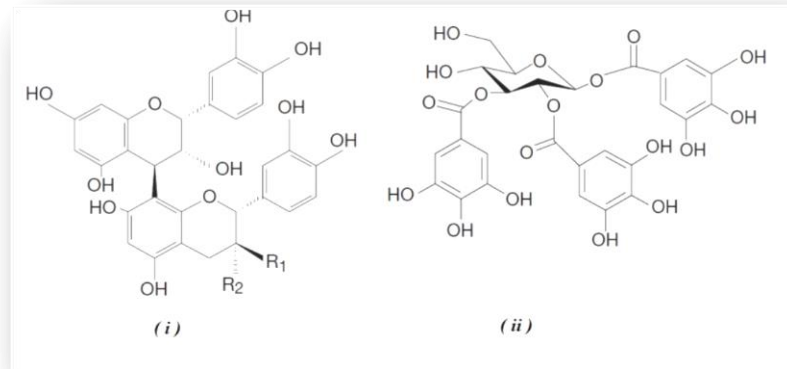


Figure 19. Structures chimiques des sous-classes des tanins (i) proanthocyanidine (un tanin condensé) ;(ii) 1, 2,3-tri-O-galloyl-β-D-glucose (un tanin hydrolysable) (Derbel et al., 2005)

II.2 Propriétés

L'activité biologique des composés phénoliques est largement démontrée (Figure 20). En effet, de nombreuses études ont attribué à ces molécules des propriétés, anti-radicalaire (Fleuriet et al., 2006), anti- inflammatoire (Karlsen et al., 2007), anticancéreuse (Garcia-Lafuente et al., 2009), antidiabétiques (Hanhineva et al., 2010), anti-athérosclérose (Chanet et al., 2012), antimicrobienne très puissantes (Rodrigo et al., 2011).

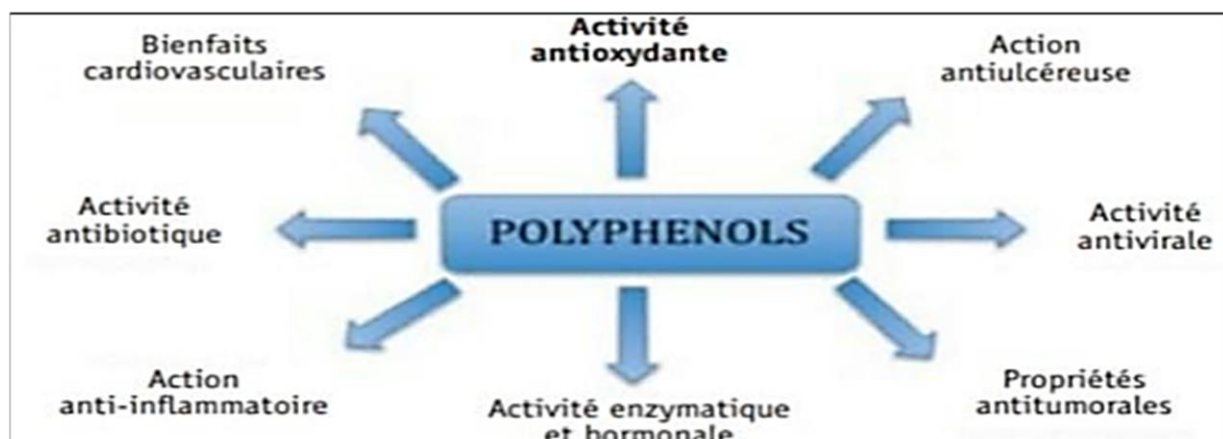


Figure 20. Activité biologique des polyphénols (Hanhineva et al., 2010)

II.2.1 L'activité antimicrobienne

Le terme «agent antimicrobien» désigne toute substance utilisée pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antiviraux, antifongiques et antiparasitaires (Yala et al., 2001). Les nouvelles recherche sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés biologiques notamment l'activité antimicrobienne (Middleton et al., 2000; Ksouri et al., 2007).

L'activité antimicrobienne peut être exercée selon diverses voies. Certaines exercent leurs activités en oxydant ou en dénaturant les protéines bactériennes (Shiota et al., 2012) ; d'autres ont un pouvoir plus spécifique en altérant des structures membranaires ou en inactivant des composés clés ou des fonctions essentielles de la cellule. De ce fait, ces biomolécules sont bactéricides ou bactériostatiques selon leur nature et leur concentration (Alcaraz et al., 2000).

II.2.2 L'activité antioxydante

L'organisme humain produit continuellement, du fait des processus physiologiques de la respiration et du métabolisme cellulaire, des espèces oxydantes appelé radicaux libre. Ces radicaux libres sont des espèces chimiques, atomes ou molécules, possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur leur orbital externe (Afonso et al., 2007). La présence des électrons confère souvent à ces molécules une grande instabilité, elles ont la possibilité de réagir avec de nombreux composés (Fendri et al., 2006). Ces radicaux oxygénés sont susceptibles de réagir avec les différents constituants cellulaires et de provoquer de profonds dégâts tissulaires (Evans, 1993).

Cette agression oxydative est contrecarrée par deux systèmes de défense antioxydants qui neutralisent les radicaux libres oxygénés et s'opposent de la sorte aux processus d'altération cellulaire (Fulbert et al., 1992) :

- Un système enzymatique : les super oxydes dismutases, les catalases et les glutathions peroxydases.
- Un système non enzymatique : les vitamines (A, E et C) ainsi que certaines molécules dont ce n'est pas la fonction principale (acide urique, bilirubine et mélatonine) (Baudin, 2015).

L'activité antioxydante consiste à l'inhibition des réactions en chaînes de production de radicaux libres et limitant ainsi leurs action. Cette propriété est souvent exprimée dans les nombreuses familles de polyphénols. Les polyphénols agissent par Piégeage des radicaux libres ou par inhibition enzymatique ou par chélation des ions métallique qui renforce l'effet oxydant.

À l'état normal les défenses antioxydantes sont capables de neutraliser les espèces réactives d'oxygène (EROs) produites pour maintenir leur flux cellulaire au niveau utile, on dit que la balance antioxydant/pro oxydants est en équilibre (Favier, 2003). Lorsque cet équilibre est rompu en raison d'une carence en antioxydants ou d'une production excessive incontrôlée d'espèces radicalaires et de leurs dérivés secondaires, un stress oxydatif se produit (Hennibelle, 2004).

Il existe de nombreux tests disponibles pour mesurer l'efficacité des antioxydants .parmi les tests standard d'évaluant l'activité antioxydant les simples, peu coûteux et rapides les tests DPPH et FRAP.

PARTIE II :
ETUDE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE 1 :

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel et méthodes

I.1 Extraction et fractionnement des composés phénoliques

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biochimie et des laboratoires de recherche scientifique de l'Institut des Sciences et Techniques au Centre Universitaire SALHI Ahmed Naâma.

Pour l'extraction des composés phénoliques, nous avons utilisé la méthode décrite par El-Haci et al. (2016), tout en y apportant quelques modifications.

Le matériel végétal utilisé dans cette étude correspond à des graines de l'espèce *Ceratonia siliqua* récoltées au mois d'Août 2020 à partir de plusieurs régions d'Algérie. Les graines sont lavées puis séchées à l'air libre. Ensuite elles sont broyées à l'aide d'un broyeur électrique (Figure 21).

La méthode d'extraction que nous avons utilisée est la décoction par le méthanol qui extrait les composés polaires (Figure 22).



Figure 21. Les graines de caroube après broyage

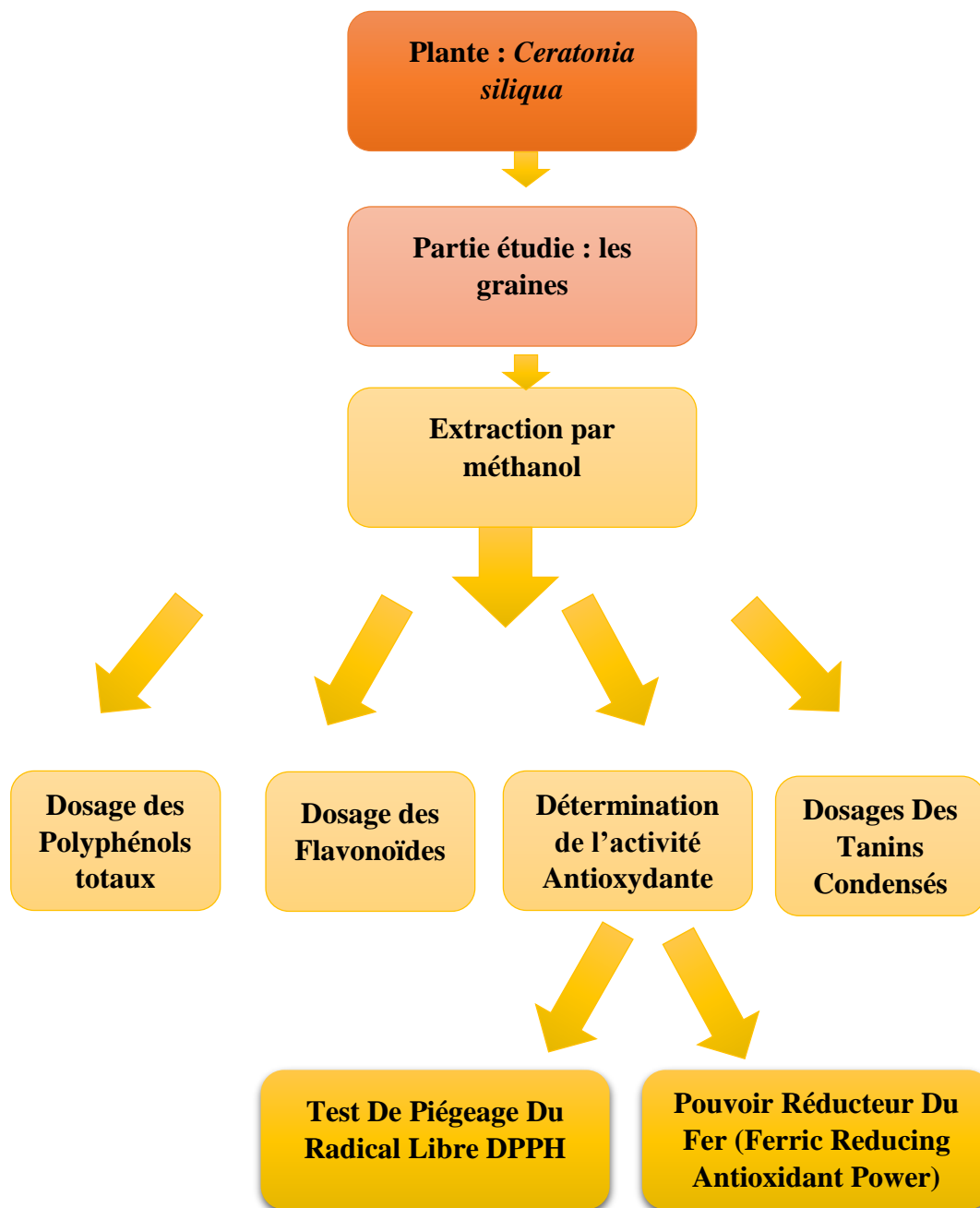


Figure 22. Schéma représentant les étapes de l'extraction des graines de caroube et les différentes activités antioxydantes

Notre poudre végétale a été mise en contact avec le mélange méthanol-eau (70 :30) (v/v). La formulation a été portée sous reflux à une T° de 64 °C pendant 2 heures. Après refroidissement à température ambiante, l'extrait méthanolique a été filtré puis évaporé sous pression réduite à sec (180 rpm, 70 °C) par un évaporateur rotatif. Le résidu sec a été récupéré soit avec 3 ml de méthanol, sous forme d'extrait méthanolique brut que nous utiliserons pour évaluer l'activité

antioxydante et des composés phénoliques, soit par 3 ml de DMSO sous forme d'extrait méthanolique utilisé pour évaluer l'activité antifongique. Les extraits ont été conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

Pour avoir les fractions acétate d'éthyle et n-butanolique, on a procédé au partage liquide-liquide. Les résidus secs obtenus après évaporation du filtrat méthanolique ont été partagés en deux phases entre 10 ml d'acétate d'éthyle et 10 ml d'eau distillée dans une ampoule à décanter. Après agitation et décantation des deux phases, la phase d'acétate d'éthyle a été récupérée et séchée par un évaporateur rotatif sous pression réduite à sec (180 rpm, 60 °C).

La phase aqueuse issue a été, quant à elle, partagée avec 10 ml du n-butanol. Après agitation et décantation des deux phases, la phase organique a été récupérée et séchée au rota-vapeur à sec (180 rpm, 60 °C). Les résidus secs ont été repris par 3 ml de méthanol et conservé à 4°C.

Ces derniers ont servis respectivement à avoir une fraction acétate d'éthyle et n-butanolique. Les différentes étapes de l'extraction hydrométhanolique à partir des graines de caroubiers sont représentées dans la figure 23.

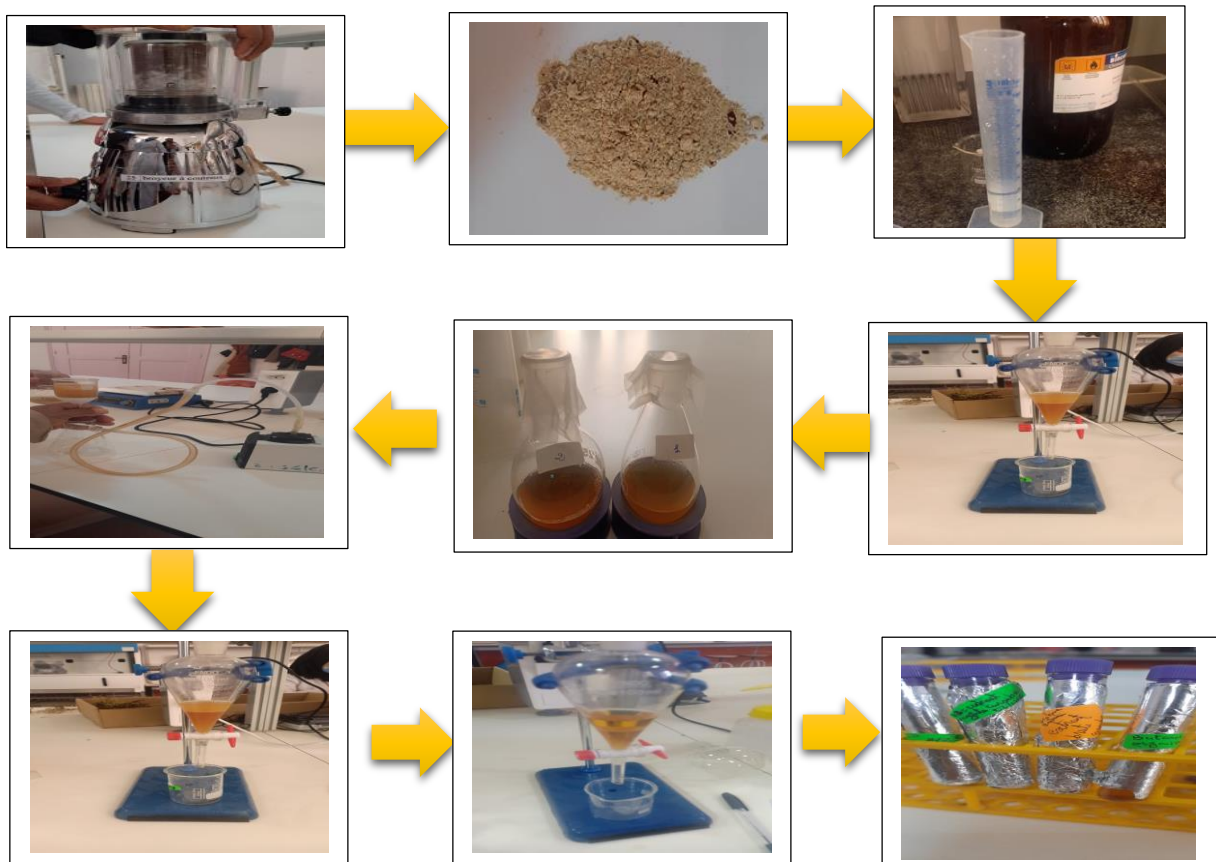


Figure 23. Les principales étapes de l'extraction hydrométhanolique à partir des graines de caroubier

I.1.1 Dosage des composés phénoliques

I.1.1.1 Dosage des polyphénols totaux

Nous avons utilisé pour le dosage des polyphénols la méthode décrite par (Vermerris et Nicholson, 2006). Le principe réside dans la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu par des groupements hydroxyles des composés phénoliques. Le produit obtenu est de couleur bleue avec une intensité proportionnelle à la teneur en polyphénols présente dans l'extrait.

Nous avons réalisé une courbe d'étalonnage en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant l'acide gallique comme contrôle positif (Figure 24).

Les résultats sont exprimés en mg équivalent acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg EAG/g).

Le protocole du dosage des polyphénols totaux est représenté par la figure 25.

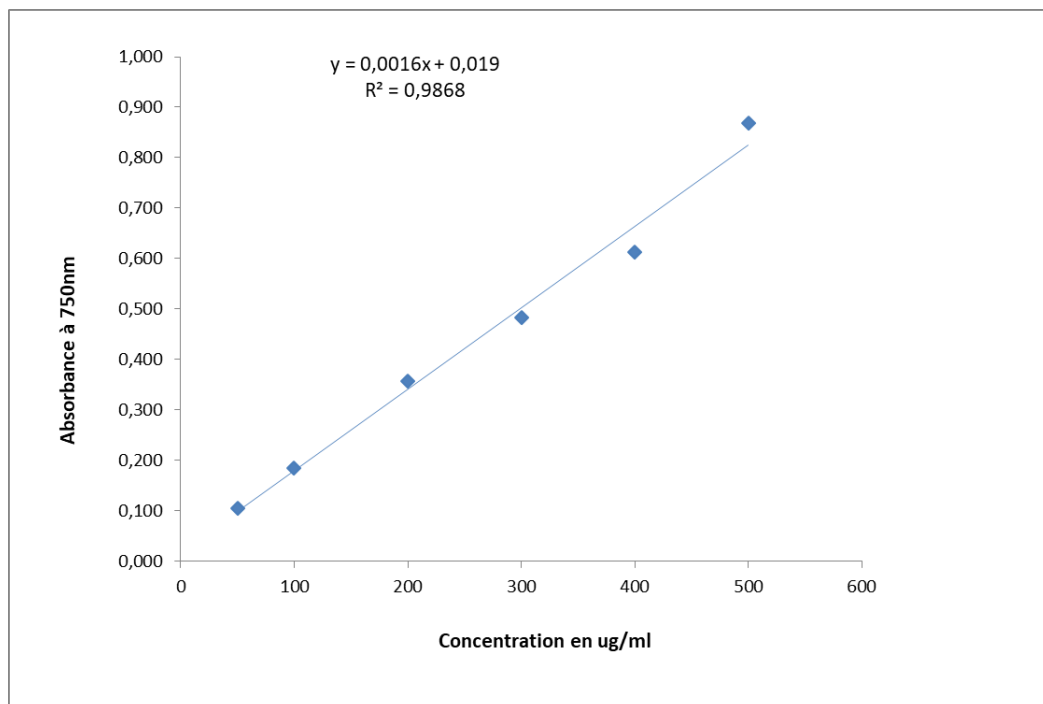


Figure 24. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

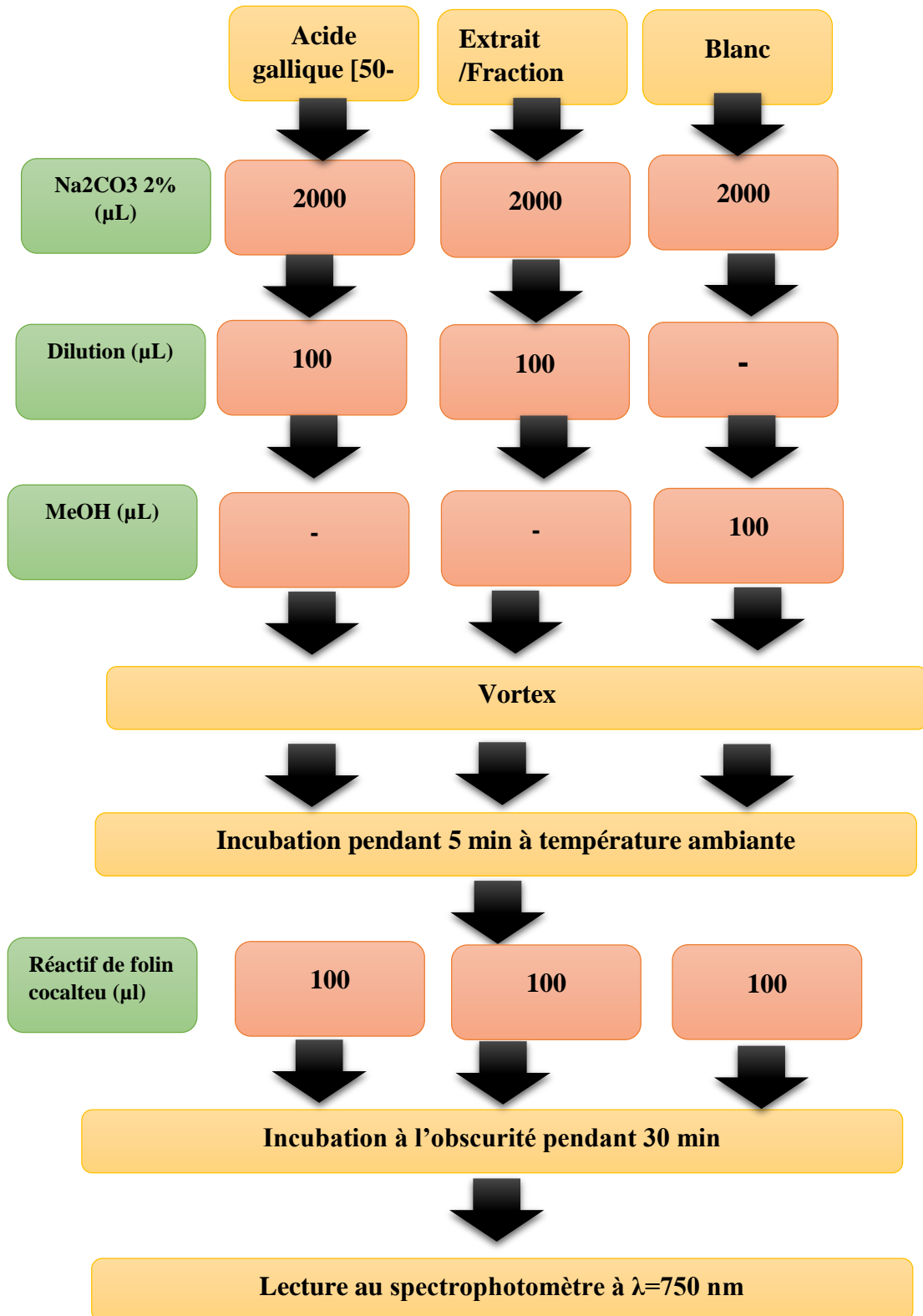


Figure 25. Protocole du dosage des polyphénols totaux

I.1.1.2 Dosage des flavonoïdes

La méthode utilisée est décrite par Zhishen et al., (1999) tout en y apportant quelques modifications (Figure 26). Le principe est fondé sur la formation d'un complexe très stable entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes (Rachedi et al., 2018).

Nous avons réalisé une courbe d'étalonnage en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif (Figure 27).

Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g).

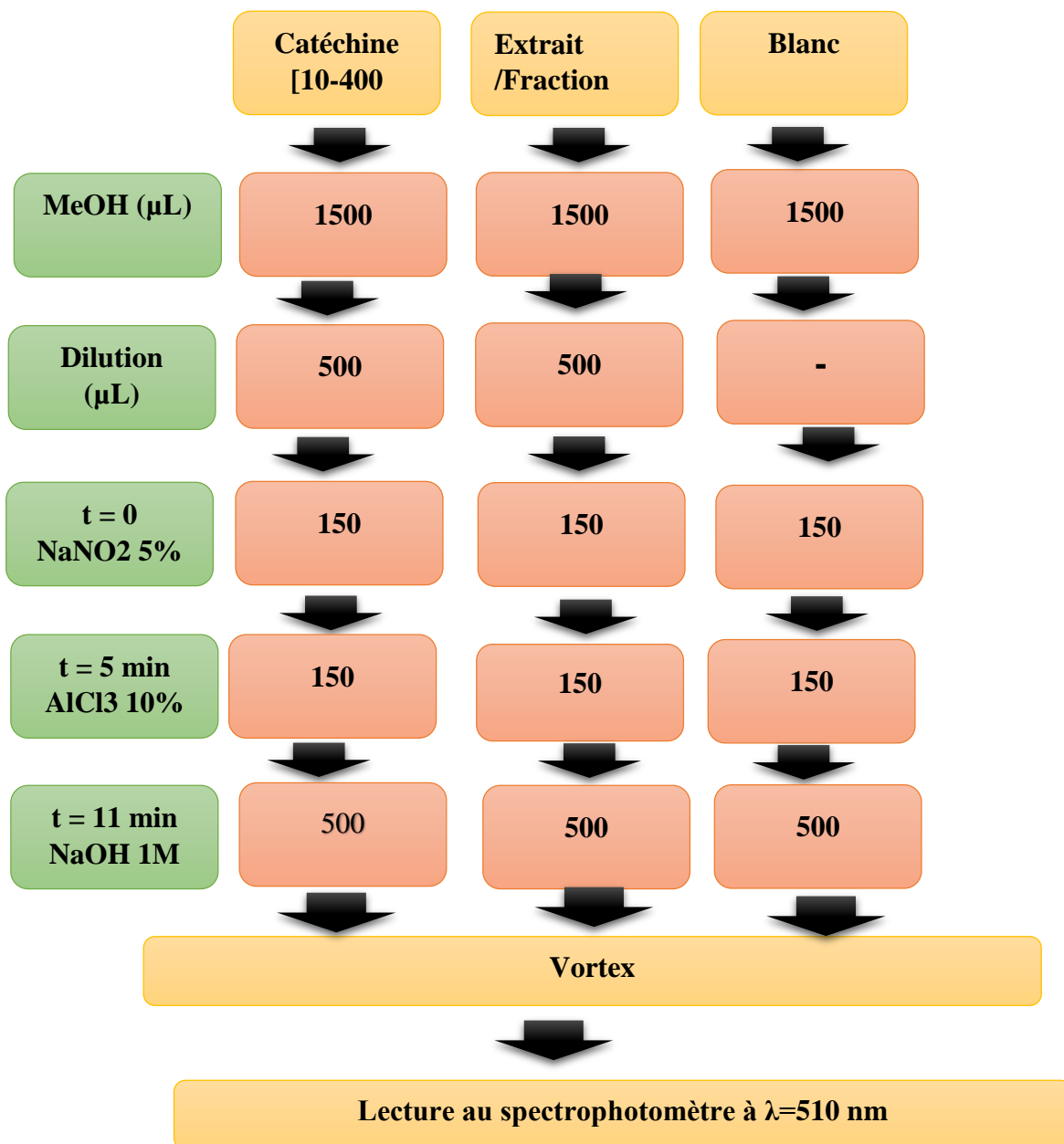


Figure 26. Protocole du dosage des flavonoïdes

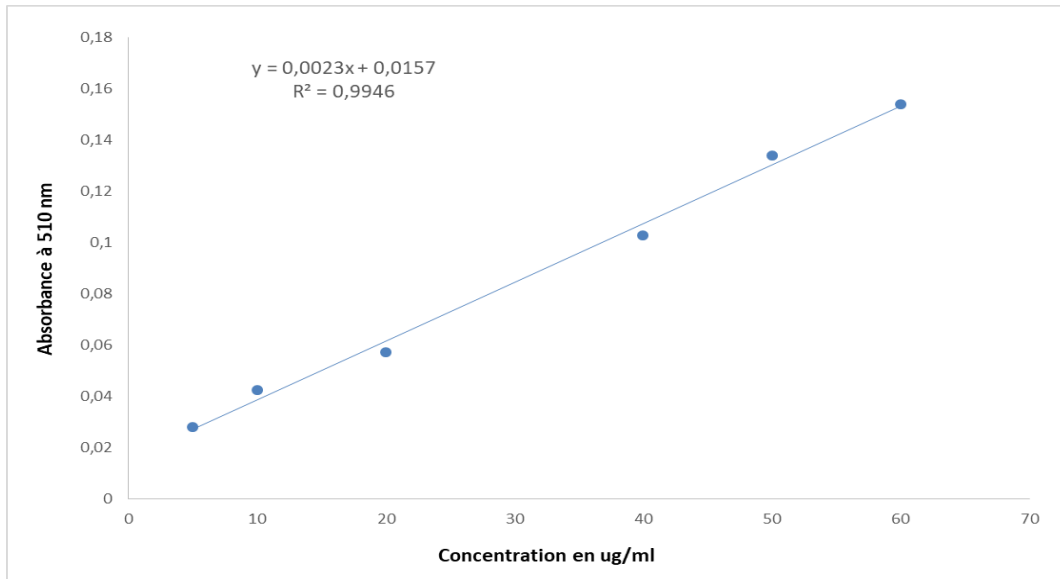


Figure 27. Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes

I.1.1.3 Dosage des tanins condensés

La méthode utilisée pour le dosage des tanins condensés est celle décrite par Julkunen-Titto (1985). Cette méthode est basée sur la réaction de la vanilline avec les groupements flavonoïdes terminaux des tannins condensés. La formation du complexes est de couleur rouges (Schofield et al., 2001). Nous avons réalisé une courbe d'étalonnage en parallèle dans les mêmes conditions opératoires en utilisant la catéchine comme contrôle positif (Figure 28). Les résultats sont exprimés en milligramme équivalent catéchine par gramme de la matière végétale sèche (mg EC/g).

Le protocole du dosage des tanins condensés est représenté par la figure 29.

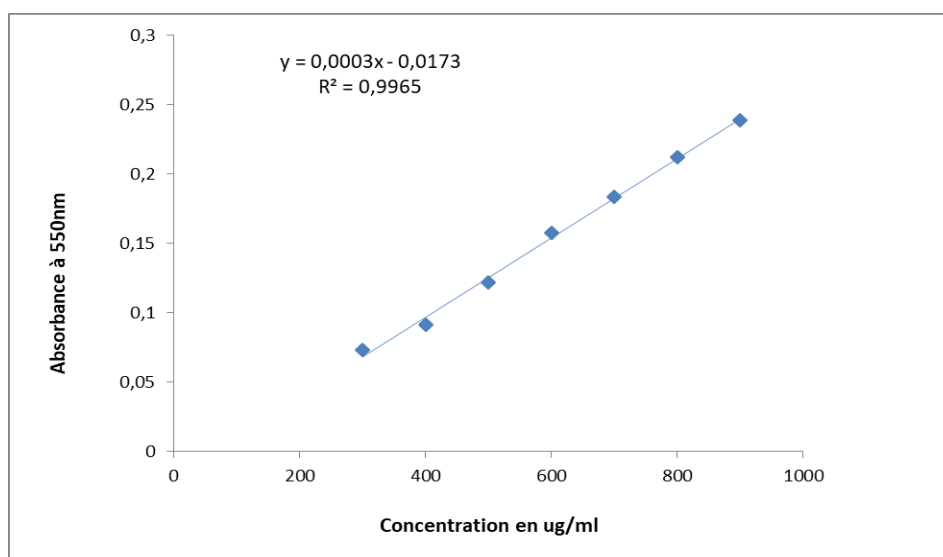


Figure 28. Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des tanins condensés

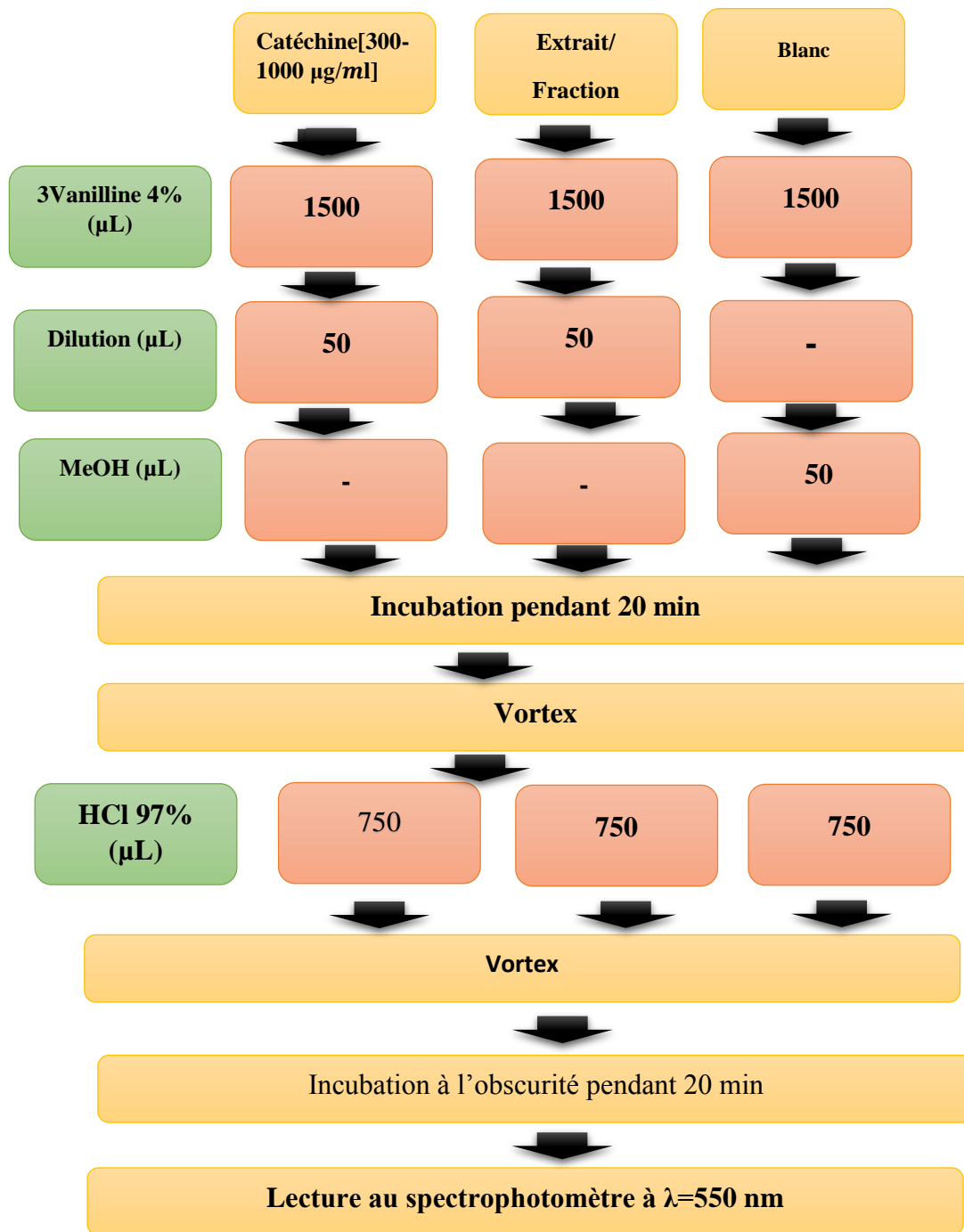


Figure 29. Protocole du dosage des tanins condensés

I.1.2 Evaluation *in-vitro* de l'activité antioxydant

L'évaluation de l'activité antioxydante *in-vitro* de l'extrait a été réalisée par deux tests ; DPPH et FRAP dont l'acide ascorbique utilisés comme contrôle positif dans le même dosage et conditions expérimentales afin de comparer son activité avec l'extrait.

I.1.2.1 Test de piégeage du radical DPPH

La méthode du DPPH inclut les changements de concentration surveillée par spectrophotométrie en présence d'antioxydants donneurs d'hydrogène (Bondet et al., 1997 ; Andrzej et al., 2012). Le protocole expérimental suivi est celui décrit par El-Haci et al. (2009) (Figure 30), où l'activité anti-radicalaire des extraits testés correspond au pourcentage d'inhibition (I%) de DPPH calculé selon l'équation suivante :

$$I\% = [(AC - AT) / AC] \times 100$$

Dont : AC : Absorbance du contrôle ; AT : Absorbance du test effectué

Pour cela il faut évaluer la capacité antioxydante de l'extrait et la comparer avec celle de l'acide ascorbique ; déterminer la concentration de chaque composant nécessaire pour réduire les radicaux libres de 50 %, également connu sous le nom d'indice IC50 ; graphiquement à partir de la courbe de régression logarithmique du pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction de la concentration de l'extrait (Annexe 01).

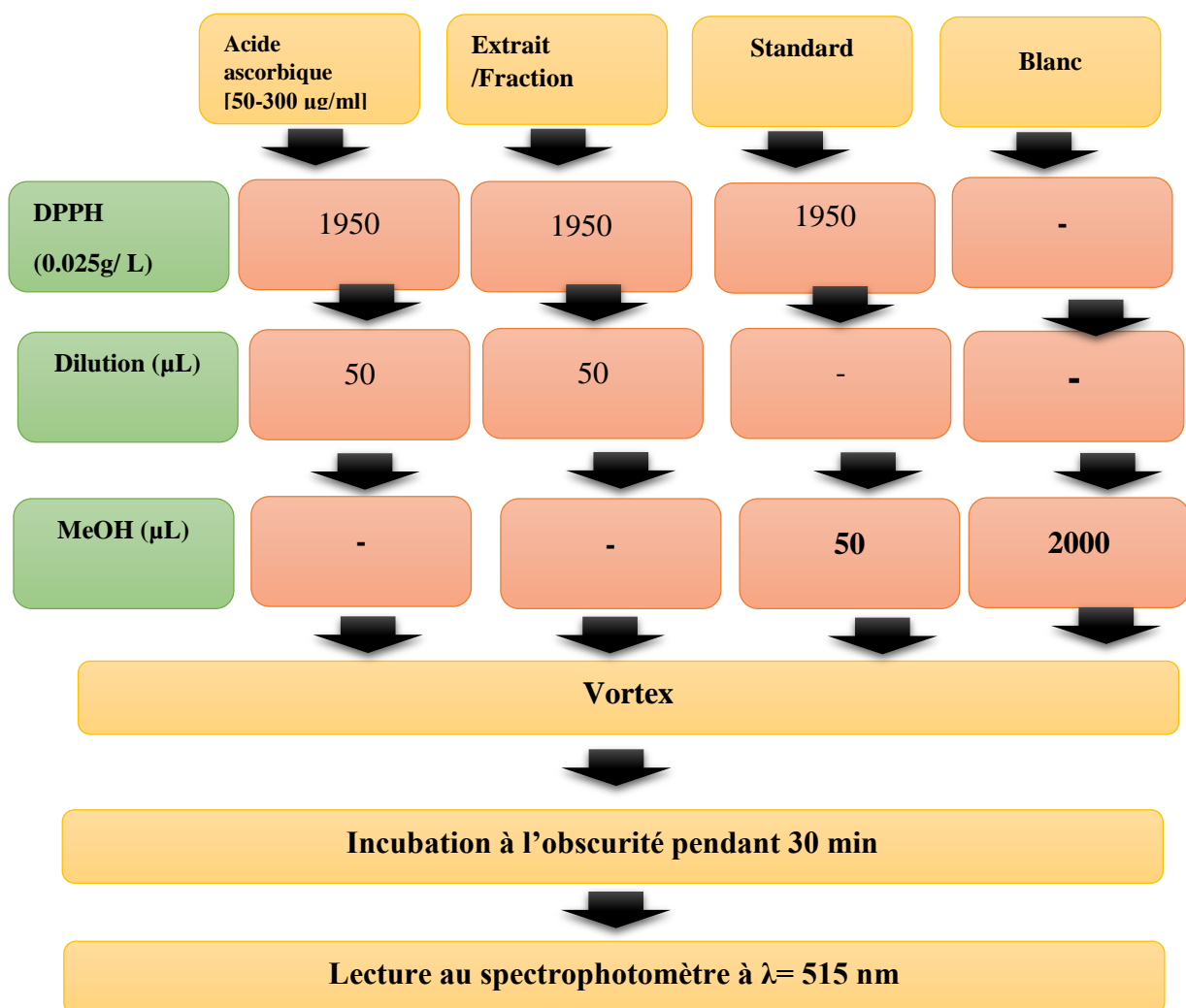


Figure 30. Protocole du test DPPH

I.1.2.2 Pouvoir réducteur du fer (Ferric reducing antioxidant power)

La méthode FRAP est basée sur le pouvoir de l'extrait ou de la fraction testée à réduire le fer ferrique (Fe^{+3}) en fer ferreux (Fe^{+2}) dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, qui peut être dosée par spectrophotométrie par concentration pour mesurer la densité bleue des complexes de fer dans le milieu réactionnel. Une augmentation de l'absorbance signifie une augmentation du pouvoir réducteur de l'échantillon d'essai (Ozturk et al., 2007).

Le protocole expérimental suivi dans ce présent travail est décrit par Karagozler et al. (2008) (Figure 31). Il consiste à évaluer la capacité antioxydante des extraits et les comparer avec celle de l'acide ascorbique ; La concentration de chaque fraction efficace utilisée pour réduire 50% Fe^{+3} , également appelée indice EC_{50} , a été utilisée pour déterminer graphiquement la concentration à partir d'une courbe de régression linéaire de l'absorbance du milieu réactionnel en fonction de la concentration de l'extrait (Annexe 02).

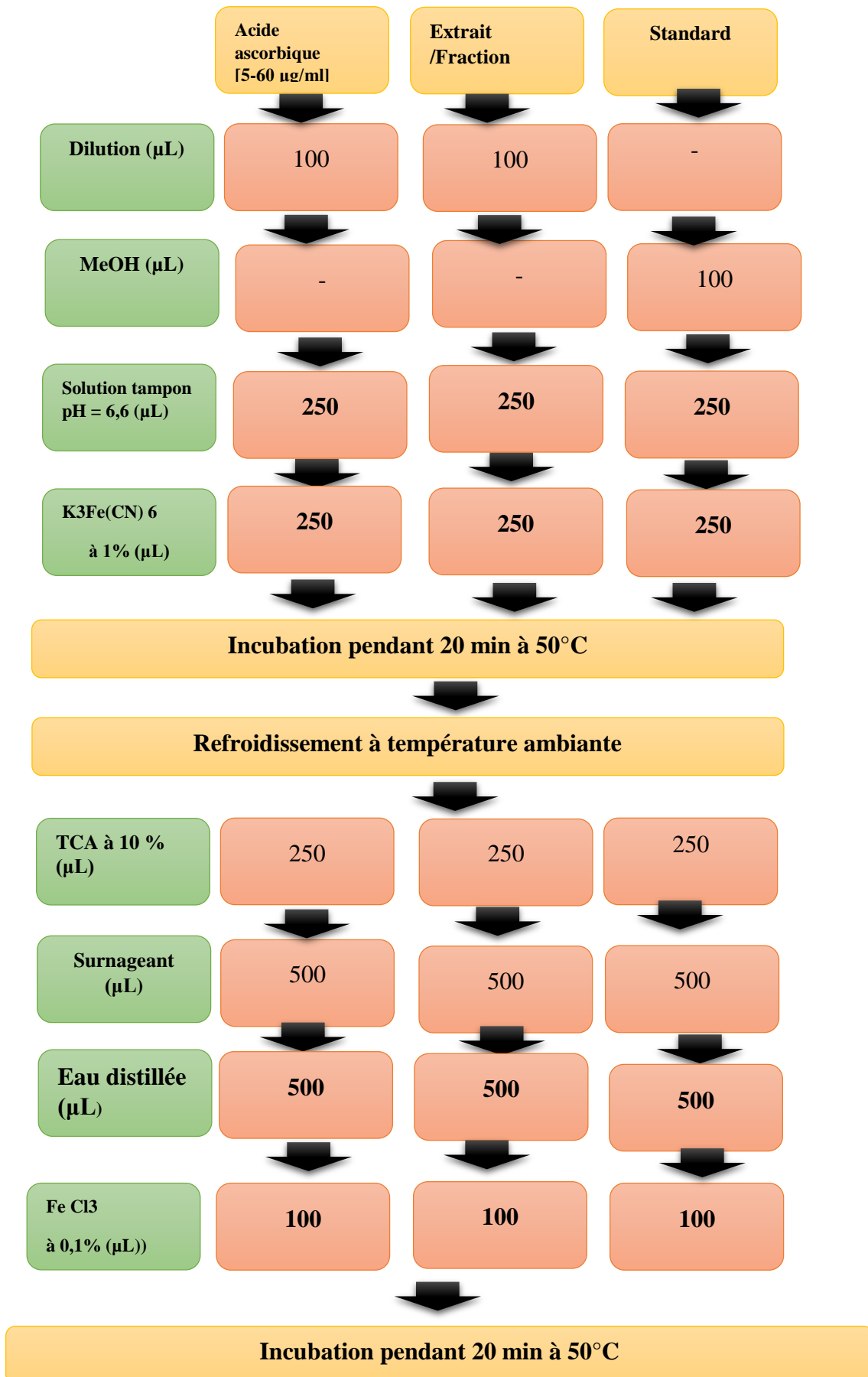


Figure 31. Protocole du test FRAP

I.1.3 Activité antimicrobienne

Cette partie a pour objectif d'évaluer l'activité antifongique de l'extrait hydrométhanolique des graines de caroube. Pour se faire, la méthode de diffusion sur milieu gélosé a été utilisée. La technique de Gulluce et al. (2007) a été modifiée afin de réaliser le test d'antibiogramme en utilisant des disques stériles. La sensibilité des souches testées se traduit par l'apparition d'une zone ou d'un halo clair autour des disques.

I.1.3.1 Effet antifongique de l'extrait

La technique a été réalisée en découpant des disques à partir d'un papier buvard de 6 mm de diamètre. Ceux-ci ont été stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 121°C. Les disques ont été par la suite imprégnés par 5 µL de l'extrait. Pour cela, des spots ont été déposés sur les disques qui ont été laissés à température ambiante pour absorber l'extrait.

Trois souches de *Candida albicans*, un champignon opportuniste, levuriforme responsable des candidoses des voies génitales, oropharyngées et des mycoses cutanées, ont été utilisées ; une souche de référence (*C. albicans* ATCC 10231) et deux autres sauvages (A9 et A5), ces deux dernières appartiennent à la collection de souche du laboratoire du Centre Universitaire de Naâma.

Des cultures jeunes ont été préparées en cultivant ces levures dans la gélose Sabouraud, des colonies ont été transférées à l'aide d'une anse de platine stérile dans de l'eau physiologique stérile. Après agitation au vortex, la densité optique a été ajustée (0,08 à 0,15) à 520 nm grâce à un colorimètre (WPA-Colourwave-CO7500 Colorimètre 10⁵).

À l'aide d'un écouvillon stérile, un ensemencement stries a été réalisé à la surface de la gélose de Mueller-Hinton, préalablement coulée dans des boîtes de Petri.

A l'aide d'une pince stérile, les disques préalablement imbibés de différentes concentrations de l'extrait ont été transférés dans les boîtes de Petri. Les boîtes ont été refermées, laissées agir pendant 15 min à la température ambiante du laboratoire. Les boîtes ont été incubées à 25 C° pendant à 48 h.

Pour le contrôle négatif des tests, un disque vierge et un autre imbibé de 5 µL de DMSO sont utilisés. Six répétitions ont été réalisées pour chaque souche.

I.1.3.2 Effet antifongique de l'extrait et du Fungizone dilué

Le Fungizone dont la molécule active est l'amphotéricine B, est un médicament commercialisé par le laboratoire Bristol Myers Squibb, et est indiqué pour le traitement des infections fongiques en général, notamment celles provoquées par des candidoses digestives, vaginales et cutanées. Cet agent est utilisé dans cette étude avec et sans dilution.

Les disques ont été imprégnés par différentes concentrations de l'extrait (30µL, 50µL, 80µL, 100µL, 110 µL). D'autres disques ont été imprégnés par les mêmes concentrations précédentes par le Fungizone (10%). Cette suspension a été diluée à raison de 200 µL de Fungizone dans 9800 µL d'eau distillée stérile, soit un rapport de 1/49. Cette partie a été testée uniquement sur la souche de référence, *C. albicans* ATCC10231.

Les disques ont été déposés sur la gélose comme cité plus haut. Vingt et une (21) répétitions ont été réalisées pour chaque concentration.

I.1.3.3 Effet antifongique de l'extrait et du Fungizone non dilué

Pour ce test, les étapes citées ci-dessous pour l'effet antifongique de l'extrait et du Fungizone dilué ont été reprises ; cependant l'agent antifongique (amphotéricine B) n'a pas été dilué.

Les disques ont été imprégnés par deux volumes de l'extrait (50 µL, 80 µL), de même pour les disques imprégnés par le Fungizone. Quatre répétitions ont été réalisées pour chaque concentration.

I.4 Analyse statistique des données

La représentation graphique des données de l'activité antioxydante a été réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Office Excel 2013.

L'analyse de la variance (ANOVA) des données a été réalisée à l'aide du logiciel GenStat Discovery 3, tandis que la séparation des moyennes a été effectuée via le test de Duncan à un niveau de signification $\alpha = 0,01$.

CHAPITRE 2 :
RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Résultats et discussion

I.1 Rendements selon la préparation

Le rendement d'extraction a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (\%)} = \left(\frac{m}{m_0} \right) \times 100$$

m : masse d'extrait sec pesée en g.

m₀ : masse du matériel végétal en g.

D'après les résultats obtenus (Tableau 04, 05 et 06) (Figure 32), le rendement le plus élevé est celui de l'extrait méthanol (16%), suivi par l'extrait butanol (5.33%), puis vient en dernier l'extrait de l'acétate avec 1.67%. Donc la polarité du solvant d'extraction a un rôle sur l'augmentation du rendement. Cela lui permet d'extraire les composés organiques de poids moléculaire faible avec des groupes fonctionnels (Nguyen et al., 2015).

Tableau 04. Concentration et rendement de l'extrait méthanolique des graines de caroube

Ext MeOH	Poids du matériel végétal (g)	Poids de l'extrait (g)	Concentration de l'extrait mg/ml	Rendement %
Graines	3	0,48	160	16,00

Tableau 05. Concentration et rendement de l'extrait acétate des gaines de caroube

Ext acétate	Poids du matériel végétal (g)	Poids de l'extrait (g)	Concentration de l'extrait mg/ml	Rendement %
Graines	3	0,05	16,666	1,67

Tableau 06. Concentration et rendement de l'extrait butanolique des graines de caroube

Ext butanol	Poids du matériel végétal (g)	Poids de l'extrait (g)	Concentration de l'extrait mg/ml	Rendement %
Graines	3	0,16	53,333	5,33

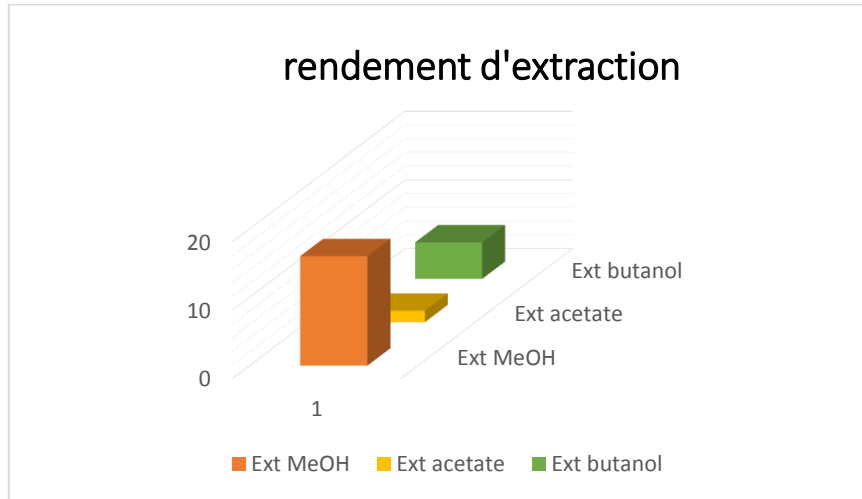


Figure 32. Rendement d'extraits méthanolique, d'acétate et butanolique des graines de caroube

I.2 Dosage des composés phénoliques

I.2.1 Teneurs en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés

Les résultats obtenus sont rapportés en milligramme par gramme d'extrait sec, et sont regroupés dans le tableau 07.

La teneur des polyphénols totaux obtenue à partir de l'échantillon de la présente étude est de 44,573 mg EAG/g ES. Ce résultat concorde avec celui enregistré par Avallone et al. (1997), (41,46 mg EAG/g, teneur totale à partir du germe et farine de la graine), mais il est plus important comparé à la teneur rapporté par Mekhoukhe et al. (2018) (11,97 mg EAG/g). Cette différence de variation en teneur des polyphénols totaux peut être due à des facteurs génétiques et/ou environnementaux, mais aussi à la méthode d'extraction utilisée.

La teneur en flavonoïdes de l'extrait de graine enregistré dans le présent travail est égal à 16,888 mg EC/ g ES. Pour ce qui est des tanins condensés, la concentration enregistrée est de 8,129 mg EC/ g ES, teneur supérieure à celle dosée (3,62 mg EC/g) à partir des graines de caroube récoltées à Bejaia en Algérie (Mekhoukhe et al., 2018). A noter qu'Avallone et al. (1997) ont obtenu à partir du germe des graines de caroube une concentration élevée en tanins condensés (16,2 mg EC/g).

Tableau 07. Teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés des extraits des grains de caroube

	Polyphénols totaux (mg EAG/ g ES)	Flavonoïdes (mg EC/ g ES)	Tanins condensés (mg EC/ g ES)
Extrait MeOH	44,573 ± 0.058	16,888 ± 0.022	8,129 ± 0.038

I.3 Evaluation *in-vitro* de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante *in-vitro* de l'extrait a été évaluée par deux méthodes à savoir le test de DPPH et la technique de la réduction du fer.

I.3.1 Capacité de piégeage du radical libre DPPH

DPPH est l'un des substrats utilisable pour l'évaluation de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale et la simplicité de l'analyse (Bozin et al., 2008).

Les résultats présentés dans le tableau 08 de l'activité anti radicalaire de l'extrait des graines de caroube montrent que les trois extraits testés possèdent une activité anti radicalaire avec un IC₅₀ égal à 126.79 µg/ml pour la fraction méthanolique, 12.90 µg/ml pour la fraction acétate d'éthyle, et 29.10 µg/ml pour la fraction butanolique. En comparaison avec l'antioxydant standard (l'Acide ascorbique) qui démontre un IC_{50%} = 5.97 µg/ml, nous constatons que les trois fractions de caroubier sont moins actives par rapport au standard et que la fraction acétate d'éthyle possède une activité antioxydante supérieure en comparaison avec les fractions méthanolique et butanolique.

L'activité antioxydante dépend de plusieurs facteurs qui sont, la concentration des extraits, la méthode d'évaluation, la sensibilité des antioxydants à la température de l'essai et la nature hydrosoluble ou liposoluble de l'antioxydant (Kadri et al., 2011 ; Ghedadba et al., 2014 ; Lafka et al., 2013). Ces facteurs pourraient expliquer la variation de l'activité observée entre les résultats.

L'activité antioxydante enregistrée dans la présente étude est supérieure à celle rapportée par Benkhaldi (2013) ainsi que par Letkesses et Ladraa (2017), lesquels ont trouvé des IC₅₀ de l'ordre de 480 µg/ml et 560 µg/ml respectivement.

Tableau 08. Valeurs de l'IC₅₀ des extraits méthanoliques des graines de caroube et ses différentes fractions, exprimé en µg/ml, accompagnée de l'IC₅₀ de l'acide ascorbique

Extrait méthanolique avec ses différents fraction	IC ₅₀ (µg/ml)
Ext MeOH	126.79 ± 4.84 R ² = 0.990
Ext ACeOH	12.90 ± 2.55 R ² = 0.9898
Ext ButOH	29.10 ± 2.73 R ² = 0.8701
IC ₅₀ de l'acide ascorbique = 5.97 ± 0.01 µg/ml avec R ² = 0,9122	

I.3.2 Capacité de la réduction du fer

Les valeurs de l'EC₅₀ déterminées par extrapolation à partir des courbes sont rapportées en microgramme par millilitre (µg/ml) et regroupées dans le tableau 09.

Les résultats présentés dans le tableau ci-dessous montrent que la fraction acétate d'éthyle présente la valeur EC₅₀ la plus faible (10.32 µg/ml), ce qui correspond au pouvoir réducteur du fer le plus puissant parmi nos fractions d'extrait. La fraction butanolique et la fraction méthanolique ont enregistré des EC₅₀ de l'ordre de 51.98 µg/ml et 181.67 µg/ml respectivement, ces derniers montrent un pouvoir de réduction du fer moyen. Toutefois, ces valeurs restent supérieures à l'EC₅₀ enregistrée avec l'acide ascorbique (4.4 µg/ml).

Tableau 9. Valeurs de l'EC₅₀ des extraits méthanoliques des graines de caroube et de ses différentes fractions, exprimées en µg/ml, accompagnée de l'EC₅₀ de l'acide ascorbique

Extrait méthanolique avec ses différents fraction	EC ₅₀ (µg/ml)
Ext MeOH	181.67 ± 4.84 R ² = 0.9951
Ext ACeOH	10.32 ± 2.55 R ² = 0.9862
Ext ButOH	51.98 ± 2.73 R ² = 0.9717
EC ₅₀ de l'acide ascorbique = 4.4 ± 0.02 µg/ml avec R ² = 0,9996	

I.4 Activité antifongique

I.4.1 Effet antifongique de l'extrait des graines de caroubier

Ce test a été effectué dans le but de tester l'effet inhibiteur de l'extrait des graines de caroube sur *Candida albicans*. L'activité antifongique se manifeste par l'apparition des zones autour des disques (Figure 33). Selon cette figure, des zones d'inhibitions ont fait leur apparition autour des disques chargés par l'extrait.

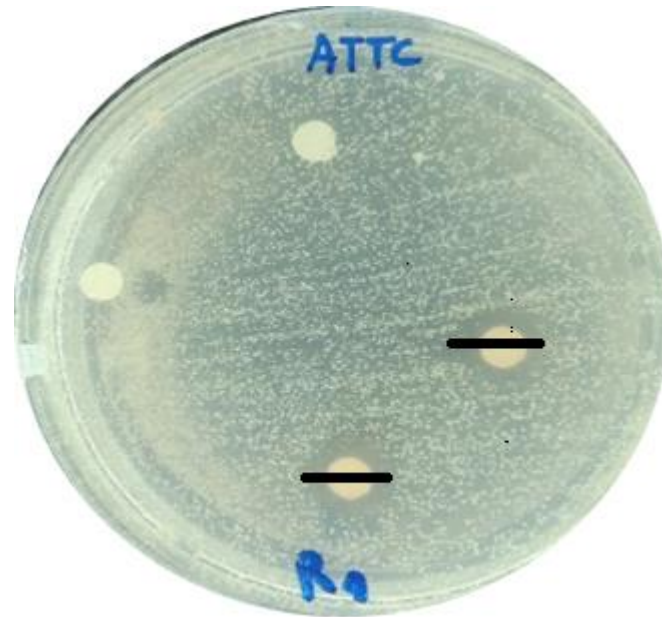


Figure 33. Effet antifongique de l'extrait sur la souche *C.albicans* ATCC10231.

Les barres horizontales (noire) représentent la zone d'inhibition

Selon Djahra et al, (2013), plus grande est la zone d'inhibition, plus la souche est sensible. Les observations soulignées quant aux effets des extraits de *Ceratonia siliqua* L. sur la croissance des souches fongiques de *Candida albicans* ATCC10231, A9, et A5 sont représentés dans la (Figure 34).

L'inhibition de la souche de référence par l'extrait a été représentée par une zone de diamètre égale à 10.6 ± 0.33 mm. Selon Drouhet et DuPont (1976), une zone d'inhibition dépassant 10 mm correspond à une sensibilité. Par conséquent, *C. albicans* ATCC 10231 peut être classée sensible vis-à-vis de l'extrait de graine de caroubier.

Cependant, A9 et A5 se sont révélées résistantes puisque leurs zones d'inhibitions ont enregistré des diamètres de $6,58 \pm 0.33$ mm et $6,66 \pm 0.42$ mm, respectivement.

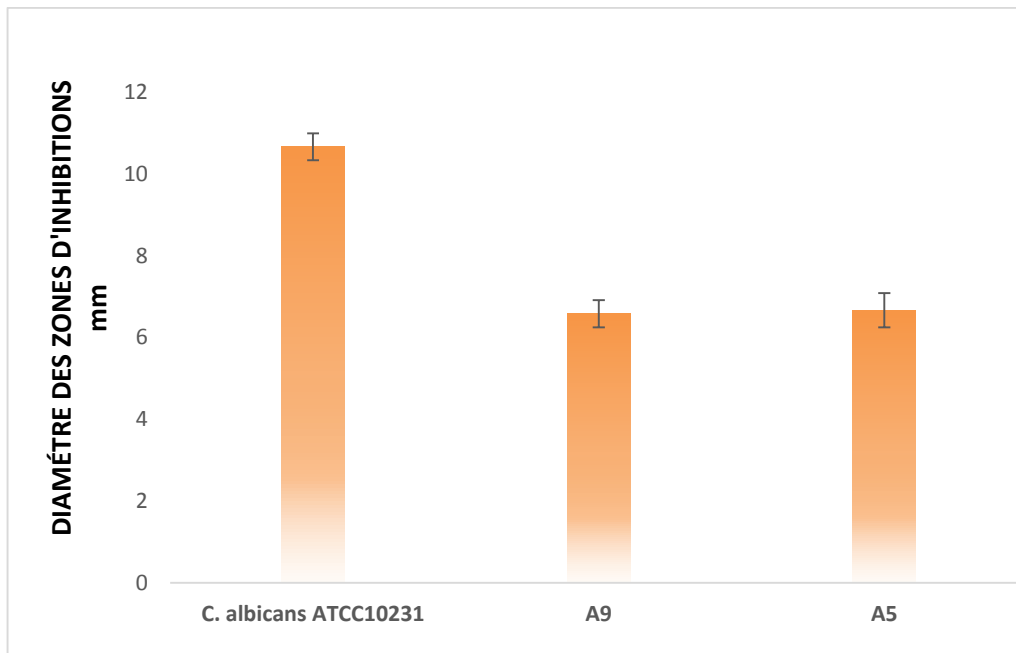


Figure 34. Moyenne des diamètres des zones d'inhibition.
Les barres représentent les erreurs standards des moyennes

I.4.2 Effet antifongique de l'extrait et du Fungizone dilué (1/49)

Selon les résultats obtenus (Tableau 10), les zones d'inhibitions autour des disques imbibés de 30 et 50 μ l, ont été inférieures à 10 mm (Figure 35). Par conséquent, *C. albicans* ATCC 10231 est résistante. Par ailleurs, aux volumes de 80, 100 et 110 μ l, les zones d'inhibitions autour des disques ont été supérieures à 10 mm ; ce qui traduit la sensibilité de cette espèce à partir d'un volume de 80 μ l et plus.

L'ANOVA a montré une différence significative pour le facteur dosage (P -value = < 0.001) et traitement (P -value = < 0.001). Cependant, l'interaction entre les deux facteurs était non significative (P -value = 0.016) à un seuil critique α = 0.01.

D'autre part, les zones de l'inhibition de la levure étudiées se sont révélées significativement différentes pour le volume de 80 μ l pour l'extrait des graines de caroube et celui du Fungizone dilué. Les diamètres des zones d'inhibitions sont de 12,29 mm et 9,37 mm, respectivement. Il apparaît donc que *C. albicans* ATCC 10231 est plus sensible à l'extrait des graines de caroube qu'au Fungizone dilué (1/49)

Tableau 10. Effet de l'extrait de graines de caroube et du Fungizone dilué sur la croissance (diamètre d'inhibition) de *Candida albicans* ATCC 10231

Dosage (μ l)	Fungizone dilué (1/49) (Moyenne \pm erreur standard mm)	Extrait de graines de caroube (Moyenne \pm erreur standard mm)
30	8,90 \pm 0,52	10,62 \pm 0,50
50	8,11 \pm 0,27	10,70 \pm 0,34
80	9,37 \pm 0,20	12,28 \pm 0,14
100	8,79 \pm 0,21	12,55 \pm 0,21
110	9,95 \pm 0,25	13,00 \pm 0,18

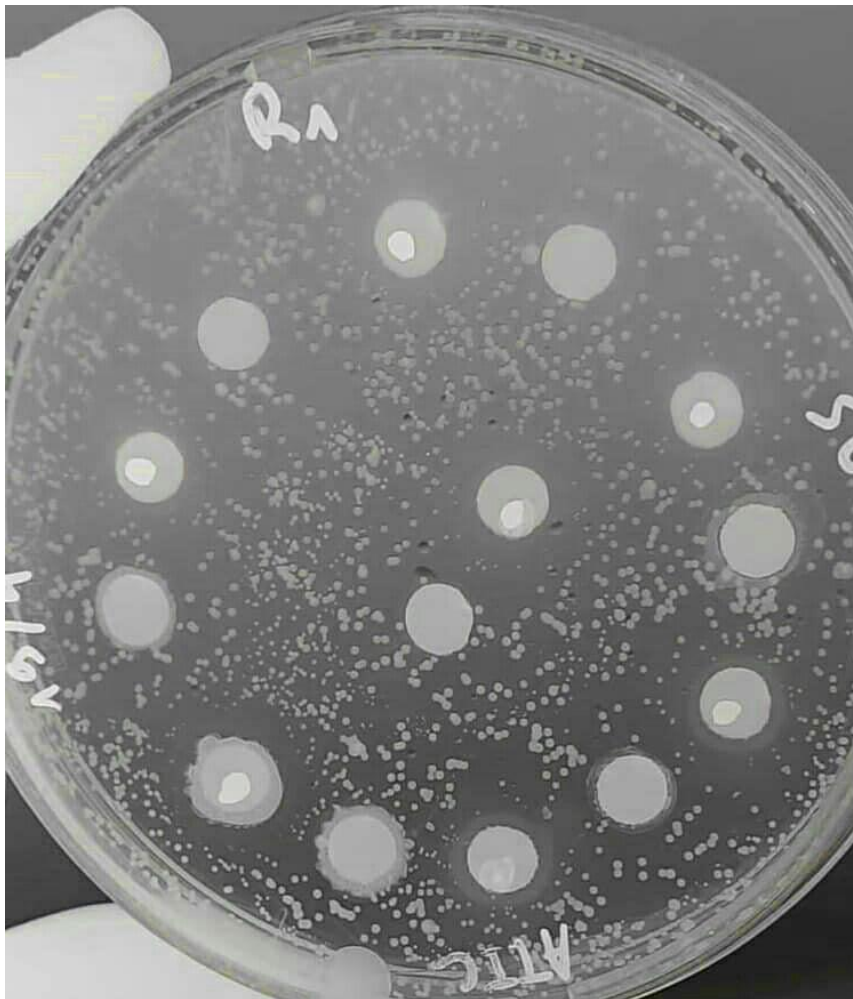


Figure 35. Effet antifongique de l'extrait de caroube (point blanc sur les disques) et du Fungizone dilué sur *C. albicans* ATCC 10231

I.4.3 Effet antifongique de l'extrait des graines de caroube et du Fungizone non dilué

L'ANOVA a montré une différence significative pour le facteur dosage (P -value < 0,001), traitement (P -value < 0,001) et leur interaction (P -value = 0,003) sur la croissance de *Candida albicans* ATCC 10231.

D'après les résultats obtenus (Tableau 11), les zones d'inhibitions autour des disques imbibés de 80 μ l (Figure 36) de Fungizone ont été supérieures (29,75 mm) à celles imprégnés de l'extrait de graines de caroube (27 mm). Cependant, la différence entre ces 2 diamètres n'était pas statistiquement significative, et par conséquent nous pensons que l'extrait de graines de caroube pourrait substituer le Fungizone en tant qu'agent d'inhibition de la croissance de *C. albicans*.

Par ailleurs, pour un volume de 50 μ l (Figure 37), les zones autour des disques imprégnés de l'extrait de graines de caroube ont été significativement inférieures à celles autour des disques imprégnés de Fungizone, les diamètres enregistrés étaient de 13 mm et 23,5 mm respectivement.

En fait, l'augmentation de la concentration de l'extrait, traduite par les volumes utilisés, a conduit à l'augmentation de l'effet antifongique ; les zones d'inhibitions ont passé de 13 mm à 27 mm.

Cette même constatation a été soulignée pour le Fungizone. L'augmentation des zones d'inhibitions a été cependant moindre, elle est passée de 23,5 mm à 29,75 mm. Par ailleurs, aucun effet synergique ni antagoniste n'a été observé entre le Fungizone et l'extrait de graines de caroube.

Tableau 11. Effet de l'extrait de graines de caroube et du Fungizone sur la croissance (diamètre d'inhibition) de *Candida albicans* ATCC 10231

Dosage (μ l)	Fungizone sans dilution (Moyenne \pm erreur standard mm)	Extrait de graines de caroube (Moyenne \pm erreur standard mm)
50	23,50 \pm 1,04 ^b	13,00 \pm 0,91 ^c
80	29,75 \pm 1,03 ^a	27,28 \pm 1,22 ^a

Les lettres distinctes mentionnées au dessus des erreurs standards indiquent des différences significatives entre moyennes

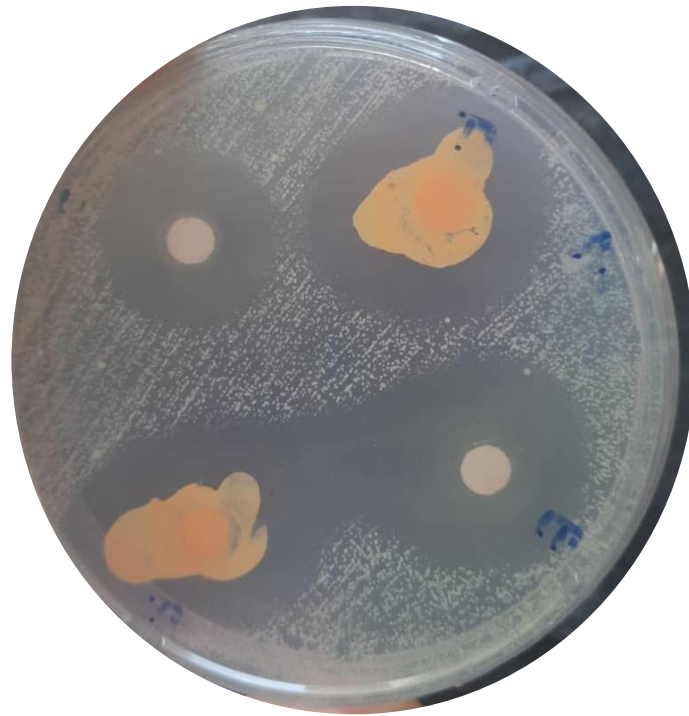


Figure 36. Effet d'inhibition sur la croissance de *C. albicans* (dose 80 μ l). Les disques de coloration orange représentent le Fungizone, ceux en blanc cassé, l'extrait de graines de caroube

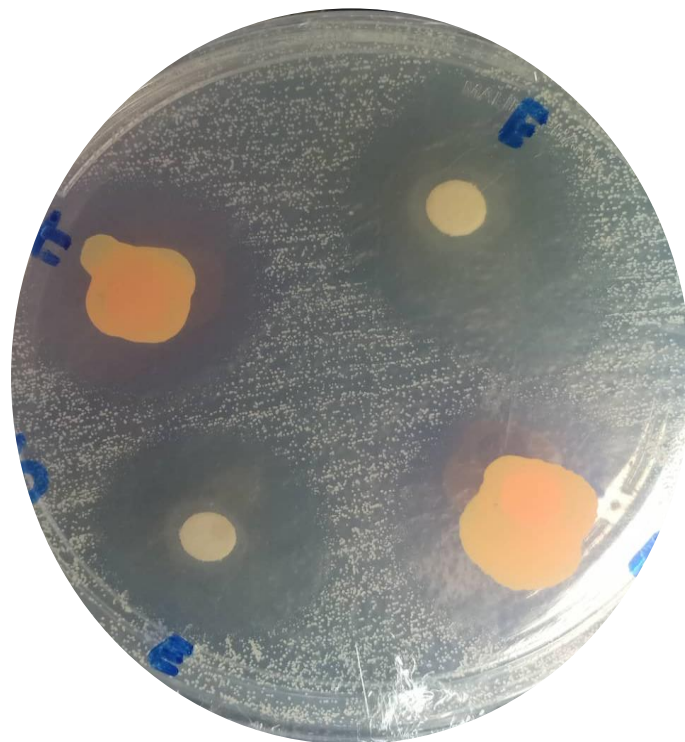


Figure 37. Effet d'inhibition sur la croissance de *C. albicans* (dose 50 μ l). Les disques de coloration orange représentent le Fungizone, ceux en blanc cassé, l'extrait de graines de caroube

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

La biodiversité de la flore algérienne possède de nombreuses plantes aromatiques et médicinales riches en métabolites secondaires avec des caractéristiques thérapeutiques et pharmacologiques différentes. Parmi ces plantes, *Ceratonia siliqua* L qui a fait l'objet d'une étude d'évaluation de ses potentiels biologique via ses activités antimicrobiennes et antioxydantes.

La présente étude a révélé une activité antioxydante des graines de *Ceratonia siliqua* L., cette activité a confirmé la richesse de cette espèce en métabolites secondaires, où nous avons constaté la présence des polyphénols, flavonoïdes et des tanins condensés.

Les estimations quantitatives de ces métabolites à partir de l'extrait des graines de caroube ont révélé des concentrations importantes de polyphénols totaux, des flavonoïdes ainsi que des tanins condensés.

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes : DPPH et FRAP. La fraction acétate d'éthyle des graines de *C. siliqua* L. fut celle présentant le meilleur pouvoir anti-radicalaire par rapport aux deux autres fractions, méthanolique et butanolique. Toutefois, il fut inférieur à celui de l'acide ascorbique.

La même fraction a montré le pouvoir réducteur du fer le plus important parmi les fractions des extraits de graines de caroube testés. Cependant, elle présenta une activité réductrice inférieure à celle de l'acide ascorbique. Parmi les trois extraits évalués, celui qui a présenté le pouvoir réducteur du fer le plus faible fut l'extrait méthanolique.

En conclusion et d'après les résultats obtenus, nous pouvons déduire que l'extrait de gaines de caroube testé dans la présente étude a une activité antioxydante intéressante.

L'activité antimicrobienne de l'extrait des graines de caroube ciblant l'espèce *Candida albicans* a été évaluée par 3 différents tests. Le premier a révélé que parmi les 3 souches utilisées de *C. albicans*, seule la souche de référence ATCC 10231 a présenté une sensibilité à l'extrait de graines de caroube.

Le deuxième test a indiqué que la sensibilité de *C. albicans* vis-à-vis de l'extrait de graines de caroube et du Fungizone dilué (1/49) n'est significative qu'à partir d'un volume de 80 µl et plus. En outre, ce test a montré que l'effet antifongique de l'extrait de graines de caroube pour un volume de 80 µl était meilleur que celui induit par le Fungizone dilué. Quant au troisième test, les résultats obtenus ont révélé que pour un volume égal à 80 µl, l'extrait de graines de caroube a un effet significativement identique à celui du Fungizone et par conséquent, nous pensons que l'extrait de graines de caroube pourrait substituer le Fungizone (*ayant comme effets indésirables : nausées/vomissements, fièvre, phlébite, manifestations allergiques sévères*) en tant qu'agent d'inhibition de la croissance de *C. albicans*.

Pour une meilleure continuité, on espère que notre travail soit complété par :

1. Une étude analytique approfondie en vue d'identifier, caractériser et séparer les molécules responsables de l'activité antioxydante et antifongique.
2. La mise en évidence des expériences *in-vivo* qui approuve nos résultats concédés *in-vitro*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

1. Afonso V., Champy R., Mitrovic D., Collan P. et Lomri A (2007) Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutases: rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74(7) :636-643.
2. Ait Chitt M., Belmir H. et Lazrak A (2007) Production de plants sélectionnés et greffés de caroubier. *Transfert de technologie en agriculture* 153: 1-4.
3. Albanell E (1990) Caracterización morfológica, composición química y valor nutritivo de distintas variedades de garrofa (*Ceratonia siliqua L.*) cultivadas en España. Tesis doctoral. Barcelona. España, pp. 209
4. Alcaraz G., Riondet C.R., Cachon Y. Waché Y. Diviès C (2000) Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential. *European Journal of Biochemistry*. 262(2): 595-599.
5. Andrzej L., Dawidowicz., Dorota Wianowska et Małgorzata OLSZOWY (2012). On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry* 131 (2012) 1037–1043. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.09.067.
6. Arista, M., and Talavera, S. (1990). Numeros cromosomicos para la flora Española. *Lagasalia*, 16(2), 323–328.
7. Avallone R., Plessi M., Baraldi M., Monzani. A. (1997). Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*) : Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of Food Composition and Analysis*, 10, 166-172.
8. Ayaz, F.A., Torun, H., Ayaz, S., Correia, P.J., Alaiz, M., Sanz, C., Grúz, J., and Strnad. M. (2007). Determination of chemical composition of Anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua*): sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of Food Quality*, 30, 1040–1055, doi: 10.1111/j.1745-4557.2007.00176.x.
9. Azab, A. (2017). Carob (*Ceratonia siliqua*): Health, Medicine and Chemistry. *European Chemical Bulletin*, 6(10), 456–469, doi: 10.17628/ecb.2017.6.456-469.

B

10. Balasundram N., Sundram K et Samman S (2006). Phenolic compounds in plants and agro industrial by-products : Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99 : 191–203.

11. Batista M. T., Amaral M. T. and Proença Da Cunha A. (1996) Carob fruits as source of natural antioxidant. In Proceeding of the III International Carob Symposium. Cabanas-Tavira, Portugal.
12. Batlle I. & Tous J., 1997. Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetic and Crops Plant.
13. Batlle I. and Tous J. (1997). Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Institute of Plant Genetic and Crops Plant Research. Gatersleben/International Plant Resources Institute. Rome. Italy.
14. Baudin, (2015). Stress oxydant et protections antioxydantes. Revue francophone des laboratoires N °522.
15. Baumel, A., Mirleau, P., Viruel, J., Bou Dagher Kharrat, M., LA Malfa, S., Ouahmane, L., Diadema, K., Moakhar, M., Sanguin, H., and Médail, F. (2018). Assessment of plant species diversity associated with the carob tree (*Ceratonia siliqua*, Fabaceae) at the Mediterranean scale. *Plant Ecology and Evolution*, 151(2), 185–193, doi: 10.5091/plecevo.2018.1423.
16. Ben Ayache, S., Saafi, E.B., Emhemmed, F., Flamini, G., Achour, L., and Muller, Ch.D. (2020). Biological Activities of Aqueous Extracts from Carob Plant (*Ceratonia siliqua* L.) by Antioxidant, Analgesic and Proapoptotic Properties Evaluation. *Molecules*, 25, 3120, doi: 10.3390/molecules25143120.
17. Ben Ayache, S., Reis, F.S., Dias, M.I., Pereira, C., Glamoclija, J., Sokovic, M., Saafi, E.B., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Achour, L. (2021). Chemical characterization of carob seeds (*Ceratonia siliqua* L.) and use of different extraction techniques to promote its bioactivity. *Food Chem.* 351, 129263.
18. Benkhaldi H., (2013). Détermination de l'activité antioxydante des polyphénols du caroubier (*Ceratonia siliqua*) de la région de Tlemcen. Mémoire de Master. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemecen, Algérie. 1-91.
19. Biner, B., Gubbuk, H., Karhan, M., Aksu, M., and Pekmezci, M. (2007). Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*, 100(4), 1453–1455, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.11.037.
20. Bolonos M (1955) Rapport sur le caroubier. Instituto forestal de Investigaciones y experiencias Madrid (Espagne) 9p.
21. Bondet V., Brand W., et Berset C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH_ free radical method. *LWT - Food Science and Technology*, 30, 609–615.

22. Boublenza, I., EL Haitoum, A., Ghezlaoui, S., Mahdad, M., Vasai, F., and Chemat, F. (2019). Algerian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations. Morphological and chemical variability of their fruits and seeds. *Scientia Horticulturae*, 256, 108537, doi: 10.1016/j.scienta.2019.05.064.
23. Boublenza, I. (2020). *Etude des populations spontanées et cultivées du caroubier (Ceratonia siliqua L.) en Algérie*. Thèse doctorale. Univ. Tlemcen, Algérie, pp. 115.
24. Bozin B., Mimica N., Samojlik I., Goran A., et Igetic R (2008) Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., *Alliaceae*), *Food Chemistry*, 111 : (2008) P. 925-929
25. Bruneton J. (1999). *Phytochimie. Plantes médicinales. Pharmacognosie. 3ème édition*, Paris, France. pp :125165.
26. Bures, P., Pavlicek, T., Horova, L., and Nevo, E. (2004). Microgeographic genome size differentiation of the carob tree, *Ceratonia siliqua*, at 'Evolution Canyon'. *Annals of Botany*, 93(5), 529–535, doi: 10.1093/aob/mch074.

C

27. Chanet A., Milenkovic D., Deval C., Potier M., Constans J., Mazur A., Bennetau- Pelissero C., Morand C., et Berard A M. (2012). Naringin, the major grapefruit flavonoid, specifically affects atherosclerosis development in diet-induced hypercholesterolemia in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23, 469-477.
28. Corsi L., Avallone R., Cosenza F., Farina F., Baraldi C. & Baraldi M.. (2002) Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line. *Fitoterapia*. 73: 674-684
29. Craig W. J. and Nguyen T. T. (1984). Caffeine and theobromine level in cacao and carob products. *J. Food Sci.* 49:302-305.

D

30. D'Archivio M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo, R., Giovannini C., et Masella R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali-dell'Istituto- Superiore-di Sanità*. 43(4) : 348-361.
31. Dai J & Mumper R. J (2010). Plant phenolics : extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 15 (10): 7313-52.
32. Derbel S., et Ghedira K. (2005). Phytothérapie et nutrition : Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie*. 1: 28-34.

33. Djahra A. B., Bordjib, O., et Benkherara S. (2013). Extraction, séparation et activité antibactérienne des tanins de marrube blanc (*Marrubium vulgare L.*). *Phytothérapie* (2013) 11:348-352.
34. Drouhet E., Duptont B (1976) Bulletin de la société française de mycologie médicale ,2 :165-170 page 1)

E

35. EL Hajaji H., Lachkar N., Alaoui K., Cherrah Y., Farah A., Ennabili A., El Bali B. & Lachkar M. (2010) Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*.
36. EL Hajaji, H., Lachkar, N., Alaoui, K., Cherrah, Y., Farah, A., Ennabili, A., EL Bali, B., and Lachkar, M. (2011). Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco. *Arabian Journal of Chemistry*, 4, 321–324, doi: 10.1016/j.arabjc.2010.06.053.
37. EL-Haci I. A., and Attik bekkara F (2016). Estimation du pouvoir antioxydant des differents extraits organiques d'ecballium elaterium (l.). *Substances Naturelles et Innovations Thérapeutiques*.
38. Evans PH. (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993 ; 49 : 577-87.

F

39. Favier A (2003) Le stress oxydant: intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *l'Actualité chimique*. 11:108-115.
40. Fendri C., Mechri A., Khiari G., Othman A., Kerkeni A. et Gaha L. (2006). Implication du stress oxydant dans la physiopathologie de la schizophrénie : revue de la littérature. *L'Encéphale*, 2006 ; 32 : 244-52.
41. Fidan, H., Stankov, S., Petkova, N., Petkova, Z., Iliev, A., Stoyanova, M., Ivanova, T., Zhelyazkov, N., Ibrahim, S., Stoyanova, A., et al. (2020). Evaluation of chemical composition, antioxidant potential and functional properties of carob (*Ceratonia siliqua L.*) seeds. *Food Sci. Technol.* 57, 2404–2413.
42. Fleuriet A., Jay-Allemand C., et Macheix J. J. (2005). Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaire romandes* pp 121-216.

43. Frahm-Leliveld, J.A. (1957). Observations cytologiques sur quelques Légumineuses tropicales et subtropicales. *Revue de cytologie et de biologie végétale*, 18, 273–287.
44. Fulbert J. C. et Cals M. J., (1992). Les radicaux libres en biologie clinique : origine, rôle pathogène et moyen de défense. *Path Biol* 1992 ; 40 (1) : 66-77.

G

45. Garcia-Lafuente A., Guillamon E., Villares A. et al. (2009). Flavonoids as anti inflammatory agents : implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*. 58: 537-552.
46. Ghedadba N., Bousselsela H., Hambaba L. (2014). Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare L.* *Phytothérapie* 12: 15–24.
47. Ghedira K (2005). Les flavonoïdes : structures, propriétés biologiques, rôles prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 04: 162-169.
48. Goldblatt, P. (1981). Cytology and phylogeny of the *Leguminosea*. In: POLHILL, R.M., AND RAVEN, P.H. (Eds). *Advances in Legume Systematic*. Vol. 2. Royal Botanic Gardens, Kew, England, pp. 237–464.
49. Gulluce M ., Sahin F., Sokmen M., Ozer H ., Daferera D., Sokmen A., Polissiou M., Adiguzel A. et Ozkan H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L. ssp. longifolia*. *Food Chemistry*, 103, 1449–1456P

H

50. Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H.. (2010). Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 1365-1402.
51. Hillcoat D., Lewis G. & Verdcourt B. (1980) A new species of *Ceratonia* (Leguminosae: Caesalpinoideae) from Arabia and the Somali Republic. *Kew bull.* 35: 261-271.

I

52. Irwin H.S. & Barneby R.C. (1981) *Cassieae*. In: Polhill R.M & Raven P.H., (Eds). *Advances In Legume Systematic*. Vol. 1. Royal Botanic Gardens, Kew, England, pp. 97-106.

J

53. Jones, D.K. (1953). Carob culture in Cyprus. *FAO 53/2/1225*. FOA. Rome.

54. Julkunen-Titto R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1985, Vol. (33), Page : 213.

K

55. Kadri A., Zarai A., Bekir A., et al. (2011). Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L essential oil from Tunisia. *Afr J Biotechnol* 10(19): 3908–14.

56. Kanti bhooshan P & Syed Ibrahim R. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2 : 5, 270-278 ; November / December ; 2009. Landes Bioscience.

57. Karagözler A. A., Erdag B., Emek Y. G., et Uygum D. A. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. *Food Chemistry*, 111, 400-407.

58. Karlsen A., Retterstol L., Laake P., et al. (2007). Anthocyanins inhibit nuclear factor kappa B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *Journal of Nutrition*. 137: 1951-1954.

59. Ksouri R., Megdiche W., Debez, A., Falleh H., Grignon C. et Abdelly C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile maritima*. *Plant. Physiol Bioch*, 45: 244-249.

L

60. Lafka T.I., Lazou A.E., Sinanoglou V.J., et Lazos E.S. (2013). Phenolic extracts from wild olive leaves and their potential as edible oils antioxidants. *Foods* 2013, 2, 18-31 ; doi:10.3390/foods2010018.

61. Lakkab I., El Hajaji H., Lachkar N., Lefter R., Ciobica A., El Bali B., and Lachkar M., (2019). *Ceratonia siliqua* L. seed peels: Phytochemical profile, antioxidant activity, and effect on mood disorders. *Journal of Functional Foods*. 54, 457-465, doi.org/10.1016/j.jff.2019.01.041.

62. Letkesses H et Ladraa I (2017) Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits de *Ceratonia siliqua* L. thèse de master en Sciences Biologiques, Université des Frères Mentouri Constantine 55p.

63. Linden et Lorient D. (1994). Pigments et arômes in *Biochimie agro-industrielle : valorisation alimentaire de la production agricole*. Ed : Masson. 338-340.

64. Louca, A., and Papas, A. (1973). The effect of different proportions of carob pod meal in the diet on the performance of calves and goats. *Animal Science*, 17, 139–146, doi: 10.1017/S0003356100016871.

M

65. Mahdad M.Y (2013). Situation et perspectives d'amélioration du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) dans le Nord-ouest de l'Algérie .Mémoire de Magister en Agronomie université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre et de l'Univers.
66. Mahdad M.Y., and Gaouar S.B.S. (2016). *Le Caroubier (Ceratonia siliqua L.) dans le Nord-ouest de l'Algérie: Situation et perspectives d'amélioration*. Germany: Editions Universitaires Européennes. ISBN-13: 978-3639542035.
67. Mahdad M.Y., Mediouni M.R., Viruel J., Selka N., and Gaouar S.B.S., (2022). Functional Diversity Based on Morphometric Analysis and Identification of the Algerian Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) Cultivars. *Genetics And Biodiversity Journal*, 6(2), 01-20, DOI:10.46325/gabj.v6i2.238.
68. Mahdad M.Y., (2022). Caractérisation par l'outil morphométrique, physico-chimique et moléculaire de la diversité génétique chez *Ceratonia siliqua* L. : identification et sélection des premiers cultivars de Caroubier en Algérie. Thèse doctorale. Université de Tlemcen, Algérie, pp.120.
69. Makris D.P. & Kefalas P. (2004) Carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) as a source of polyphenolic antioxidant. *Food Technol. Biotechnol.* 42: 105-108.
70. Mekhoukhe A, Kicher H, Ladjouzi A, Medouni-Haroune L, Brahmi F, Medouni-Adrar S, Madani K. Antioxidant activity of carob seeds and chemical composition of their bean gum by-products. *J Complement Integr Med.* 2018;3:1–11.
71. Melgarejo P. & Salazar D.M. (2003) Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas. Vol. II. Mundi-Prensa. España, pp. 19-162.
72. Middleton E., Kandaswami C. et Theoharides T.C (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells : implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 52: 673-839.
73. Min B.R. & Hart S.P. (2003) Tannins for suppression of intestinal parasites. *J. Anim. Sci.* 81: 102-109.

N

74. NAS. (1979) Tropical Legumes: Resources for the Future. National Academy of Sciences. Washington DC, USA, pp. 109-116.
75. Nguyen V T ., Bowyer., Michael C., Vuonga Q., Altena I A., et Scarlett., Christopher J (2015) Phytochemicals and antioxidant capacity of Xao tam phan (*Paramignya trimera*) root as

affected by various solvents and extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 67 :192-200

O

76. Ortiz P.L., Arista M. & Talavera S. (1996) Producción de néctar y frecuencia de polinizadores en *Ceratonia siliqua* L. (Caesalpiniaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 54: 540-546.
77. Ozturk M., Aydogmus O, F., Duru, M. E., et Topçu G. (2007). Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*) : An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, 103, 623-630

P

78. Pincemail J, Degruene F, Voussure S (2007) Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition Clin Metab*, 21, 6

R

79. Rejeb M.N. (1995) Le caroubier en Tunisie : Situations et perspectives d'amélioration. Dans : *Quel avenir pour l'amélioration des plantes*, Edit. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris, pp. 79-85
80. Rejeb M.N., Laffray D. & Louguet P. (1991) Physiologie du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) en Tunisie. *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides*, Groupe d'Etude de l'Arbre, Paris, France, pp. 417-426
81. Retana J., Ramoneda J. & García del Pino F.(1990) Importancia de los insectos en la polinización del algarrobo. *Bol. San. Veg. Plagas*. 16: 143-150.
82. Richter G. (1993). Composés phénoliques in *Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie*. Ed Presse polytechnique et universitaire romande. Pp : 317-339.
83. Riviere, C.H., and Leco, H. (1900). *Manuel pratique de l'agriculteur algérien*. Augustin CHALLAMEL (Ed.). Paris, France, pp. 349–353.
84. Rodrigo R., Miranda A., et Vergara L. (2011) Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *clinica chimica acta* 412, 410-424.

S

85. Sahle, M., Coleon, J., and Haas, C. (1992). Carob pod (*Ceratonia siliqua*) meal in geese diets. *British Poultry Science*, 33, 531–541.
86. Sarni-Manchado P., et Cheynier V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Ed Tec et Doc Lavoisier. pp : 02-11.

- 87.** Sbay, H., (2008) : « Le caroubier au Maroc un arbre d'avenir ». Centre de recherche forestière charia Omar Ibn Khattab, BP.763, Agdal, Rabat, Maroc. PP : 44. PP : 07-31.
- 88.** Schofield P., Mbugua D. M., et Pell A. N. (2001). Analysis of condensed tannins. A review. Anim. Feed Sci.Technol. 2001, Vol. (91), page : 21.
- 89.** Serairi-Béji R., Mekki-Zouiten L., Tekaya-Manoubi L., Loueslati M.H., Guemira F. & Ben Mansour. (2000). Can carob powder be used with oral rehydration solution for the treatment of acute diarrhea. Med. Top. 60: 125.
- 90.** Shiota S., Matsunari O ., Suzuki R., Watada M., Kinjo N., Murakami K., Fujioka T., Kinjo F., Yamaoka Y (2012). Association between Helicobacter pylori virulence factors and gastroduodenal diseases in Okinawa, Japan. Journal of Clinical Microbiology 50: 876-883.

T

- 91.** Tous, J., Romero, A., and Batlle, I. (2013). The Carob Tree: Botany, Horticulture, and Genetic Resources. In Jules Janick (Eds.), *Horticultural Reviews*, Volume 41 (pp. 385–456), doi: 10.1002/9781118707418.ch08.
- 92.** Tucker S.C. (1992a) The role of floral development in studies of legume evolution. Can. J. Bot. 70: 692-700.
- 93.** Tucker S.C., (1992b). The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Ceasalpinoideae: Cassieae). Am. J. Bot. 79: 367-327.

V

- 94.** Vermerris W., et Nicholson R (2006). Isolation and Identification of Phenolic Compounds, Phenolic Compound Biochemistry, Published by Springer, Dordrecht, 151-196

W

- 95.** Waksmundzka H ., et Sherma J. (2011). High performance liquid chromatography in phyto-chemical analysis. chromatographic science series. 477-478.

Y

- 96.** Yala D., Merad A.S., Mohamed D., Ouar Korich M.N (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine de Maghreb. N° 91.

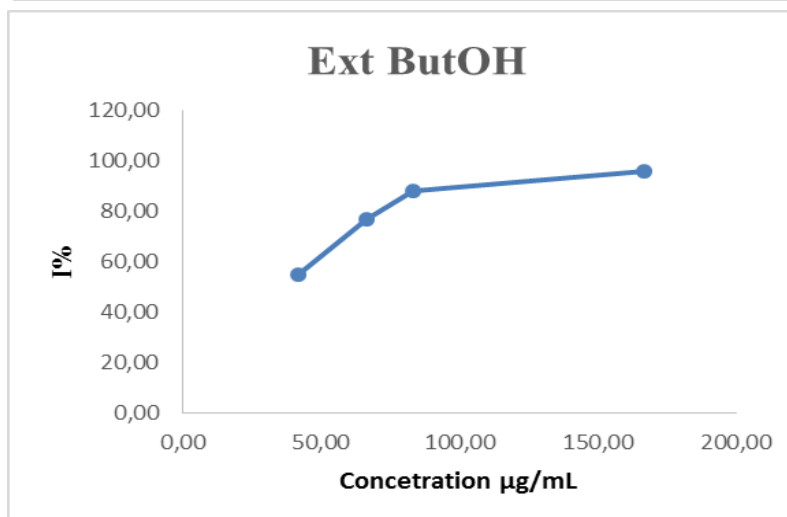
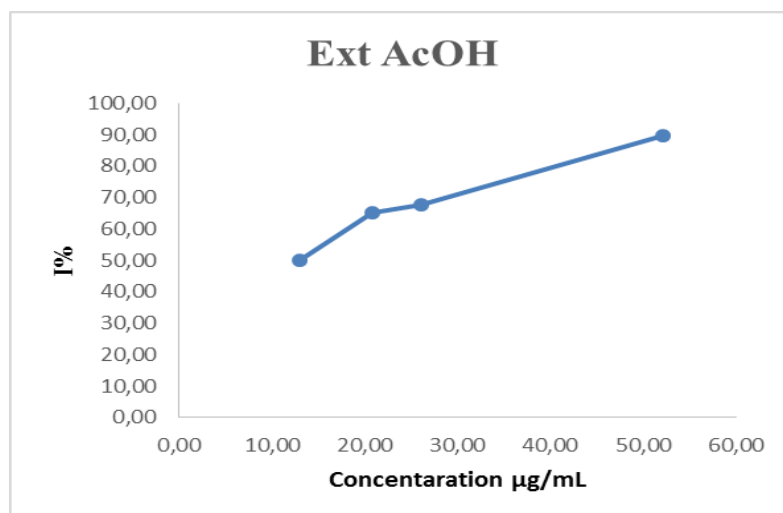
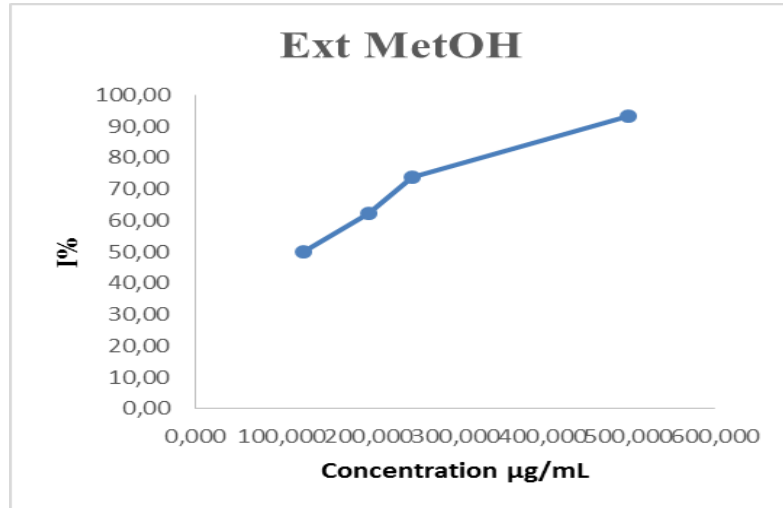
Z

- 97.** Zhishen J., Mengcheng T., et Jianming W (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. J Food Chem, 1999, Vol. (64), page : 555.

Annexe

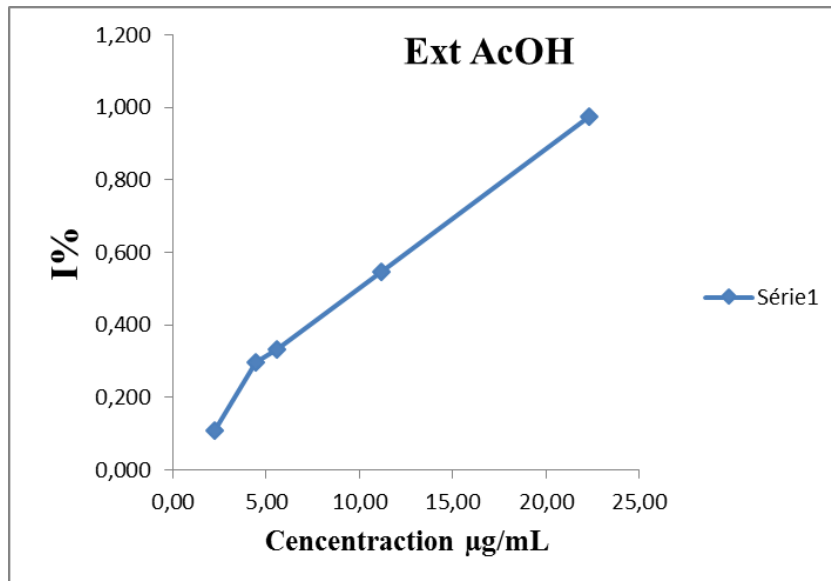
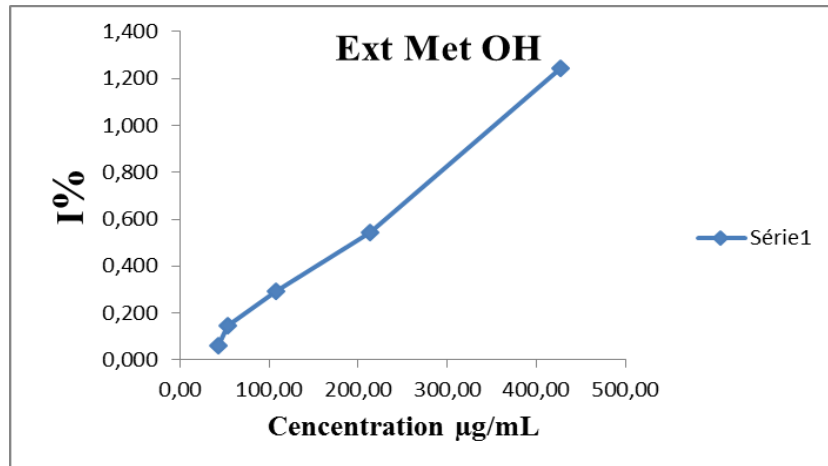
Annexe 1

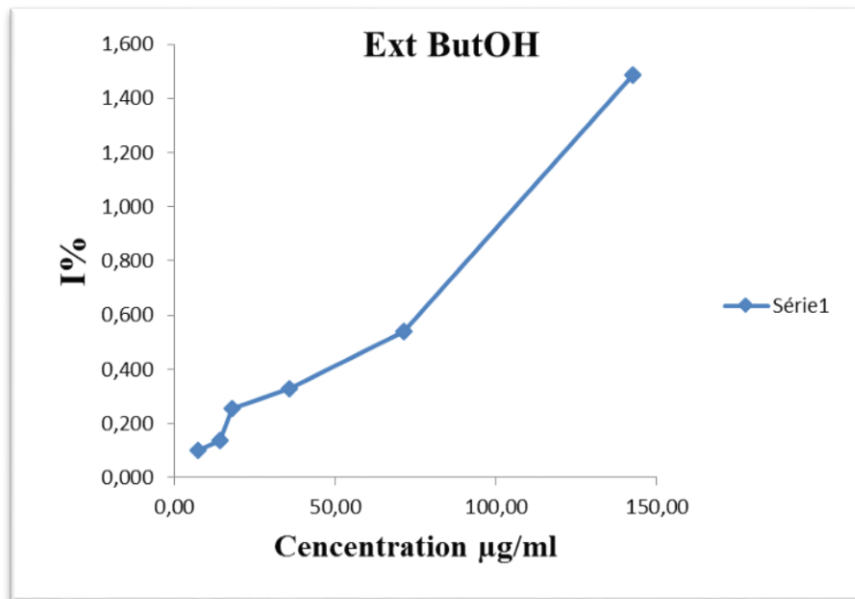
Pourcentages d'inhibition du DPPH• en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et des extraits méthanoliques et leurs fractions acétate d'éthyle et n-butanolique de l'espèce *Ceratonia siliqua*



Annexes 2

Pouvoir réducteur du fer en fonction des concentrations de l'acide ascorbique et des extraits méthanoliques et leurs fractions acétate d'éthyle et n-butanolique de l'espèce *Ceratonia siliqua*





Annexes 3 Milieux de culture

Préparation de gélose Muller-Hinton

Dissoudre 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri

Préparation de gélose de Sabouroud

Dissoudre 65g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis auto-claver pendant 15 minutes à 121°C et finalement couler le milieu dans les boîtes de Pétri.

Résumé

Le présent travail a porté sur l'évaluation *in-vitro* de l'activité antioxydante et antifongique de l'extrait de graine de *Ceratonia siliqua* L. ; espèce de la famille des Fabacées, présentant d'énormes intérêts écologiques et socio-économiques.

Les estimations quantitatives des métabolites secondaires à partir de l'extrait des graines de caroube ont révélé des concentrations importantes de polyphénols totaux, de flavonoïdes ainsi que de tanins condensés.

L'activité antioxydante a été évaluée par deux méthodes : DPPH et FRAP. La fraction acétate d'éthyle a révélé le meilleur pouvoir anti-radicalaire. La même fraction a montré le pouvoir réducteur du fer le plus important suivi par la fraction n-butanolique, tandis que l'extrait méthanolique a montré le plus faible pouvoir réducteur du fer.

L'activité antifongique a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu solide. Une capacité significative d'inhibition de la croissance fongique à partir de l'extrait de graines de caroube vis-à-vis de la souche *Candida albicans* ATCC 10231 a été trouvée.

Mots clés : Caroubier, graines, activité antioxydante, activité antifongique, extrait hydrométhanolique, *Candida albicans*

Abstract

The present work focused on the *in-vitro* evaluation of the antioxidant and antifungal activity of the seed extract of *Ceratonia siliqua* L.; a species of the Fabaceae family, of enormous ecological and socio-economic interest.

Quantitative estimations of secondary metabolites of the carob seed extract revealed significant concentrations of total polyphenols, flavonoids as well as condensed tannins.

Antioxidant activity was assessed by two methods: DPPH and FRAP. The ethyl acetate fraction showed the best anti-free radical activity. The same fraction showed the highest iron reducing power, followed by the n-butanolic fraction, while the methanolic extract showed the lowest iron reducing power.

The antifungal activity was evaluated by the solid state diffusion method. A significant ability to inhibit fungal growth from carob seed extract against *Candida albicans* strain ATCC 10231 was found.

Keywords: Carob tree, seeds, antioxidant activity, antifungal activity, hydromethanolic extract, *Candida albicans*

ملخص

ركز العمل الحالي على التقييم في المختبر للنشاط المضاد للأكسدة والفطريات لمستخلص بذور الخروب. ينتمي هذا النوع إلى عائلة الفصيلة البقولية ، ذات أهمية بيئية واجتماعية اقتصادية كبرى

أظهرت التقديرات الكمية للمستقلبات الثانوية لمستخلص بذور الخروب تراكيز معنوية من البوليفينول الكلي والفلافونويد وكذلك العفص المكثف.

تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة بطريقتين; حصر الجذور الحرة وارجاع الحديد. وقد أظهر مستخلص الأسيتات الميثيلية بفعالية ممتازة في تثبيت الجذور الحرة. نفس المستخلص كان الأفضل فعالية في تثبيت في ارجاع الحديد بين مجموعة مستخلصات هذه النبتة، بينما أظهر المستخلص الميثانولي ضعف قوة ارجاع الحديد.

تم اثبات قدرة هذه المستخلصات على تثبيط نمو الفطريات ضد سلالة *Candida albicans* ATCC 10231

الكلمات المفتاحية: شجرة الخروب ، البذور ، النشاط المضاد للأكسدة ، الفعالية المضادة للفطريات ، مستخلص الميثانول المائي