

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Frères Mentouri Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1

كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Domaine : Science de la nature et de la vie

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Intitulé

Etude phytochimique et évaluation des activités antioxydante et anti-enzymatique des feuilles de *Ceratonia siliqua* L

Présentée par :

ABID CHAREF LINDA & BOUSSAOUI WAHIBA

Soutenu le : 16/07/2019.

Membres du jury :

Rapporteur : MADI Aicha

(MCB) Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Président de jury : MAAMRI-Habibatni Zeineb

(MCA) Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Examineurs : Bensouici Chawki

(MRB) Centre de Recherche en Biotechnologie Constantine.

Année universitaire : 2018-2019.

Remerciements

Tout d'abord nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères à Dieu de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour terminer ce modeste travail.

Nous tenons à remercier notre directrice de mémoire Madame Madi Aicha maitre de conférence (B) à l'université frères Mentouri Constantine 1, pour son précieux conseils, la direction, la confiance et son aide durant toute la période de travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner et évaluer notre travail et de l'enrichir par leur propositions, la présidente de jury Madame Habibatni Zeineb, maitre de conférence (A) à l'université frères Mentouri Constantine1, et Dr. Bensouici Chawki maitre de recherche(B) à Centre de Recherche en Biotechnologie Constantine, Algérie.

Ce travail a été réalisé au sein du Centre de Recherche et Biotechnologie (CRBT) et l'université Frère Mentouri dans le cadre d'une Mémoire sous la direction de Dr.Bensouici Chawki et Dr.Abdessamed Alaa et Mr.Aidi Bilel et aussi Mr. Nabile directeur de laboratoire de biochimie à l'université.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes et nos amies qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Je dédie mon travail à

Mes chers parents et surtout ma chère mère pour son soutien et ses sacrifices.

Aucune dédicace ne saurait exprimer, le respect et l'amour que je vous porte

Mes frères Abd almalek, Nadjib, Nabil et Louai

Mes chères sœurs Rima, Chahinez, et Bessma

Toutes la famille Boussaoui et Zamri

A mon binôme Linda qui partage avec moi les moments difficiles de ce travail

Toutes mes chères amies Rania, Karima, Rayene, Kaouther, Racha,

Soumia... Et toutes mes collègues de la promotion de Biochimie appliquée

2019.

Wahiba



Dédicace

Je dédie ce travail à

Mon père et Ma mère

Mes très chers frères et sœurs

Adlan, Badr El-dine, Badis, Hicham, Charihane, Zahra.

Toutes la famille Adid Charef et Louaar

Une grand merci pour une fille exceptionnelle mon binôme Wahiba.

Mes amies

Karima, Rayene, Fairouz, Rania, Kaouther, Soumia, Racha.

Tous mes collègues de promotion de Biochimie Appliquée 2019.

Linda



Sommaire

<i>Remerciement</i>	<i>I</i>
<i>Dédicace</i>	<i>II</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>VIII</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>X</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>XI</i>
<i>Introduction</i>	<i>IX</i>

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

Etude botanique de la plante *Ceratonia Siliqua* L

I.1. Famille des fabaceae.....	1
I.2. Description général de la plante.....	1
I.3. Origine et air de répartition.....	1
I.4. Dénomination de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	1
I.5. Classification.....	2
I.6. Description de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	2
I.6.1. Feuilles.....	2
I.6.2. Fleurs.....	3
I.6.3. Fruits.....	4
I.6.4. Graines	4
I.6.5. Ecorces.....	5
I.7. Composition chimique de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	5
I.8. Utilisation de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	5
I.8.1. Utilisation traditionnelle.....	5
I.8.2. Usage alimentaire.....	5
I.8.3. Utilisation cosmétique.....	6
I.8.4. Importance économique.....	6
I.8.5. Travaux antérieur.....	6

Chapitre II

Les métabolites secondaires

Introduction.....	9
I. Composées phénolique.....	9
I.1. Définition	9
I.2. Structure chimique.....	9
I.3. Biosynthèse des polyphénols.....	10
I.3.1. Voie d'acide shikimique.....	10
I.3.2. Voie d'acétate/ malonate	12
I.4. Classification des composés phénolique.....	12
I.4.1. Acide phénolique.....	12
I.4.2. Flavonoïdes.....	13
a. Définition.....	13
b. structure.....	13
c. Localisation et distribution.....	13
d. Classification des flavonoïdes.....	15
e. Biosynthèse des flavonoïdes.....	16
I.5. Propriétés biologique des polyphénols et les flavonoïdes.....	18

Chapitre III

Activités biologiques

I. Activité antioxydante.....	20
I.1. Introduction.....	20
I.2. Stress et radicaux libre.....	20
I.2.1. Définition des stress.....	20
I.2.2. Qu'est-ce qu'un radicale libre.....	20
I.2.3. Origine des radicaux libre.....	21
a. Origine endogène.....	21
b. Origine exogène.....	21
I.3. Espèce réactive d'oxygène ERO.....	21
I.4. Conséquence de stress oxydatif.....	22

I.4.1. Les lipides.....	22
I.4.2. Les protéine.....	22
I.4.3. ADN.....	23
I.5. Antioxydants et système de défense.....	23
I.5.1. Antioxydant enzymatique.....	23
a. Super oxyde dismutase (SOD).....	23
b. Catalase.....	23
c. Système Glutathion Peroxydase/ Glutathion réductase (GPx/GR)	23
d. Thioridoxine peroxydase (Trx).....	23
I.5.2. Antioxydant non enzymatique.....	24
a. Vitamine C ou acide ascorbique.....	24
b. Vitamine E ou α -tocophérol.....	24
c. Glutathion.....	25
d. Caroténoïdes.....	25
e. Acide urique	25
f. Bilirubine.....	25
g. Les phénols.....	25
I.5.3. Antioxydant synthétique.....	26
II. Activité anti-enzymatique.....	26
II.1. activité anti Alzheimer.....	26
II.1.1. la maladie d'Alzheimer.....	26
II.2. Acétylcholinestérase.....	26

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

I. Matériel.....	29
I.1. Matériel végétal.....	29
II. Méthodes.....	29
II.1. Extraction solide-liquide.....	29
II.2. Extraction en phase liquide- liquide.....	31

II.3. Screening biochimique.....	33
II.4. Dosage.....	35
II.4. 1. Total Flavonoïde	35
II.4. 2. Total Phénolique.....	35
II.5. Activité anti-oxydante <i>in vitro</i>	36
II.5.1. Piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH.....	36
II.5.2. Activité ABTS	37
II.5.3. La réduction du complexe cuivre-neocuproéne (CUPRAC méthode).....	38
II.5.4. Pouvoir réducteur.....	39
II.5.5. Piégeage de radical superoxyde par la méthode DMSO-alkalin	40
II.5.6. Phénanthroline.....	40
II.6. Activité enzymatique <i>in vitro</i>	40
II.6.1. Anti-cholinestérase (Alzheimer <i>in-vitro</i>).....	40

Chapitre II

Résultats et discussion

I. Rendement des extraites.....	43
II. Criblage phytochimique.....	43
III. Dosage.....	46
III.1. Dosage des polyphénols.....	46
III.2. Dosage des flavonoïdes.....	48
IV. Evaluation des activités antioxydantes.....	49
IV.1 Evaluation de l'activité anti-radicalaire DPPH.....	49
IV.2. Activité ABTS.....	52
IV.3. La réduction du complexe cuivre-neocuproéne (CUPRAC méthode).....	54
IV.4. Phénanthroline.....	56
IV.5. Pouvoir réducteur.....	57
IV.6. Piégeage de radical superoxyde par la méthode DMSO-alkalin.....	59
V. Evaluation d'activité enzymatique.....	61
V.1. anti-acétylcholinestérase (anti-Alzheimer).....	61
Conclusion.....	64

Référence bibliographique

Liste Des Figures

Figure 1 : Arbre de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	2
Figure 2 : Feuilles de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	3
Figure 3 : Inflorescence de caroubier femelle et male.....	3
Figure 4 : Fruits de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	4
Figure 5 : Graine de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	4
Figure 6 : Voie de shikimate.....	11
Figure 7 : Structure des acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamiques.....	12
Figure 8 : Structure de base des flavonoïdes.....	13
Figure 9 : Structure des squelettes de base des flavonoïdes.....	15
Figure 10 : Biosynthèse des flavonoïdes.....	17
Figure 11 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.....	20
Figure 12 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène	22
Figure 13 : structure de la vitamine C.....	24
Figure 14 : Structure de la vitamine E.....	24
Figure 15 : Formules développées du BHA et du BHT.....	26
Figure 16 : Feuilles sèches et broyées.....	29
Figure 17 : Extraction solide/liquide des feuilles par macération et ultrason.	30
Figure 18 : Etape d'extraction solide /liquide.....	30
Figure 19 : Reprise de l'extrait méthanolique.....	31
Figure 20 : Transformation de radical DPPH en DPPH.....	36
Figure 21 : Formation et piégeage du radical ABTS + par un antioxydant donneur de H [•]	38
Figure 22 : Réduction du complexe chromogène de Cu ⁺² -Nc.....	39
Figure 23 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique.....	37
Figure 24 : Courbe d'étalonnage d'acide quercétine.....	48
Figure 25 : Activité anti-radicalaire DPPH des extraites des feuilles de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	50
Figure 26 : Histogramme d'activité anti-radicalaire DPPH des extraits des feuilles de <i>Ceratonia siliqua</i> L et des standards (BHT et BHA).....	51
Figure 27 : Activité anti-radicalaire ABTS des extraites des feuilles de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	52
Figure 28 : Histogramme d'activité anti-radicalaire ABTS des extraits des feuilles de <i>Ceratonia siliqua</i> L et des standards (BHT et BHA).....	53
Figure 29 : Absorbance en fonction des différentes concentrations de six extraits.....	54

Figure 30 : Histogramme représentant la capacité antioxydant réductrice cuprique, les résultats obtenus sont comparés aux normes BHT et BHA	55
Figure 31 : Absorbance de six extraits en fonction de leur concentration.....	56
Figure 32 : Histogramme d'absorbance 0,5 de six extraits des feuilles de <i>Ceratonia siliqua L</i> et des standards (BHA et BHT).....	57
Figure 33 : Absorbances des extraits en fonction des concentrations.....	58
Figure 34 : Le pouvoir réducteur de six extraits des feuilles de <i>Ceratonia siliqua L</i> et le standard.....	58
Figure 35 : Les % d'inhibition en fonction des concentrations pour les différents extraits.....	59
Figure 36 : Histogramme représente les CE50 pour l'activité superoxyde DMSO alcalin exprimé en µg/ml.....	60
Figure 37 : L'activité anti-acétylcholinestérase de six extraits des feuilles de <i>Ceratonia siliqua L</i>	61
Figure 38 : CE50 pour l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase de <i>Ceratonia siliqua L</i> exprimé en µg/ml.....	62

Liste Des Tableaux

Tableau 1 : Propriété thérapeutique de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	6
Tableau 2 : Sources des alimentaires des flavonoïdes.....	14
Tableau 3 : Matériel de laboratoire.....	29
Tableau 4 : Fractionnement en phase liquide- liquide.....	32
Tableau 5 : Couleur et aspect et rendement de chaque extrait.....	43
Tableau 6 : Résultats de screening phytochimique de six extraites des feuilles de <i>Ceratonia siliqua</i> L.....	44
Tableau 7 : Teneurs en polyphénols totaux de six extraites	47
Tableau 8 : Teneurs en flavonoïdes totaux de six extraits	48
Tableau 9 : CI50 de six extraits et les deux standards BHA et BHT.....	50
Tableau 10 : Concentration inhibitrice (CI50) de six extraits et les deux standards BHA et BHT.....	52
Tableau 11 : Absorbance 0,5 de six extraits et les standards (BHA et BHT).....	54
Tableau 12 : Absorbance 0,5 de six extraits et les standards	56
Tableau 13 : Absorbance 0,5 de six extraits et le standard α - Tocophérol	58
Tableau 14 : CI50 de six extraites et les standards acide gallique et α -tocophérol.....	60
Tableau 15 : CI50 de six extraites et le standard (Galantamine).....	62

Abréviations

ABTS: sel d'ammonium de l'acide 2,2-azinobis-(3éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).

AcEt : Acétate d'éthyle.

ACh: acétylcholine.

AChE: acétylcholinestérase.

ADN : Acide DésoxyRibonucléique.

Al³⁺: ion aluminium.

AQ : Aqueuse.

A 0,5 : Concentration à absorbance 0,5.

BHA: Butyl Hydroxy Anisole.

BHT: Butyl Hydroxy Toluene.

BuOH : Buthanol.

Chf : Chloroforme.

CH₃COOK : Potassium d'acétate

CI₅₀ : Concentration inhibitrice à 50%.

CUPRAC: Cupric Reducing Antioxidant Capacity.

DPPH: 1, 1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

EAG : Equivalent Acide Gallique.

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène.

EQ : Equivalent Quercétine.

EtPe : Ether de pétrole.

FCR : Folin-Ciocalteu Réactif.

Fe³⁺ : Fer ferrique.

Fe²⁺: Fer ferreux.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

HCl: chlorure d'hydrogène.

HDL : High density lipoproteins (lipoprotéines de haute densité)

H₃PMO₁₂O₄₀ : Acide phosphomolybdique.

H₃PW₁₂O₄₀ : Acide phosphotungstique.

LDL : Low density lipoproteins (lipoprotéines de faible densité).

nm: nanometre

Mg : Microgramme.

MeOH : Méthanol

SOD : Superoxyde dismutase.

TCA : Acide trichlorure acétique.

UV : Ultra-Violet

Introduction

Depuis longtemps, les plantes ont occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. Toutes les civilisations ancienne ont utilisé les plantes soit sauvages soit cultivées pour se nourrir, se défendre, et se soigner (**Messai, 2011**). Le recours à la médecine traditionnelle est une pratique très courante dans les campagnes et même dans les villes. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2002) estime que 80% de la population des pays en développement utilisent les plantes médicinales pour combattre plusieurs maladies et assurer leurs soins de santé, en recourant principalement aux extraits de ces plantes pour satisfaire leurs besoins (**Gisèle, et al 2018**). Cette situation peut s'expliquer par la toxicité des produits synthétiques, coût élevé des médicaments chimiques, ou l'insuffisance des centres de santé surtout en milieu rural (**Mpondo et al, 2012**).

De façon plus large, une plantes médicinale est un végétal doué d'un effet thérapeutique sur l'organisme sans être toxique à dose normale comme un antioxydant, antibactérienne, anti-inflammatoire, inhibiteur enzymatique par des molécules et composés actifs, (les polyphénols, les flavonoïdes, les alcaloïdes).

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

Dans ce contexte notre choix est basé sur une plante médicinale qui est nommée *Ceratonia siliqua L* largement répartie en Algérie et qui attire beaucoup d'attention en raison de son importance économique, sa richesse en composition bioactive et donc pour ses propriétés thérapeutique

L'objectif de notre étude est l'évaluation des activités biologiques principalement l'activité antioxydante mesurée par plusieurs tests (DPPH, ABTS, CUPRAC, Pouvoir réducteur...) et enzymatique (AChE) ces tests étaient réalisés sur les feuilles de *Ceratonia siliqua L*, dans le but de trouver des molécules et composés naturels plus actives et puissantes que celle des molécules synthétiques.

Notre travail a été divisé en deux grandes parties :

- La première partie concerne la recherche bibliographique ou la partie théorique qui comporte trois chapitres : l'étude botanique de la plante *Ceratonia siliqua* L, les métabolites secondaires et finalement les activités biologiques.
- La deuxième partie concerne, la partie expérimentale du mémoire, qui comporte un chapitre de matériel et méthodes utilisées lors de travail et un chapitre qui présente les différents résultats obtenus avec leur discussion et finalement une conclusion générale qui résume l'ensemble du travail réalisé.

Partie 1

Revue Bibliographique

Chapitre 1

Etude botanique de la plante

Chapitre 1 : Etude botanique de la plante

I.1 famille des fabaceae

Les Fabaceae ou Légumineuses constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs les plus connues, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical (Sylvie, 2011).

I.2. Description général de la plante

Le caroubier ou *Ceratonia siliqua* L appartient à la famille des légumineuses (Fabacées), (Abdullatif, 2017). Il est un arbuste dioïque à feuilles persistantes et de croissance lente. C'est une essence thermophile. *Ceratonia siliqua* L atteint une taille de 15 à 17 mètres et une durée de vie de 200 à 500 ans (Sébastien, 2018).

Le genre *Ceratonia* renferme en plus de *Ceratonia siliqua* L deux autres espèces :

- *Ceratonia oreothauma* qui est natif d'Arabie (Oumane).
- *Ceratonia somalensis* originaire du nord de la Somalie (Batte et Tous, 1997).

I.3. Origine et aire de répartition

Ceratonia siliqua L est une espèce thermophile cultivée en climat méditerranéen, mais originaire des pays arabes. On le retrouve principalement en Espagne, en Italie, en Grèce, au Portugal et au Maroc. Le caroubier présente une bonne résistance à la sécheresse mais est sensible au froid (Sébastien, 2018).

En Algérie, comme dans plusieurs pays méditerranéens, le caroubier croît dans les conditions naturelles à l'état sauvage sous des bioclimats de type subhumide, semi-aride et aride. Il est généralement en association avec l'olivier (Benmahioul *et al*, 2011).

I.4. Dénomination de *Ceratonia siliqua* L

Le mot « caroubier » venant de l'arbre alkharrube, connu sous le nom scientifique de *Ceratonia siliqua* L qui désigne en grec Keratina (ceratonia) signifiant petit corne et le nom d'espèce siliqua désigne en latin une silique ou gousse, il est aussi connu sous le nom de carouge, pain de saint Jean –baptiste, figuier d'Egypte et en arabe الخروب (Boublenza, 2012).

I.5. Classification

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

- Règne : plantae
- Sous –règne : Tracheobionta (plante vasculaire).
- Embranchement : spermaphytes.
- Sous-embranchement : Magnoliophyta (Angiosperme)
- Classe : Magnoliopsida.
- Sous-classe : Rosidae.
- Ordre : Fabales.
- Famille : Caesalpiniaceas.
- Sous –famille : Caesalpinioideas.
- Genre : Ceratonia.
- Genre espèce : *Ceratonia siliqua* L.

I.6. Description de *Ceratonia siliqua* L



Figure 1: Arbre de *Ceratonia siliqua* L (Battle et Tous, 1997).

I.6.1. Feuilles

Les feuilles de *Ceratonia siliqua* L sont assez grandes (10 à 20 cm), composées de 4 à 10 folioles ovales opposées, de couleur verte luisantes à la face supérieure et vert pâle à la face inférieure. *Ceratonia siliqua* L, perte ses feuilles tous les deux ans, au mois de Juillet (Benamar et al, 2011).



Figure 2 : Feuilles de *Ceratonia siliqua* L (Battle et Tous, 1997).

I.6.2. Fleurs

Elles sont groupées en grappes latérales possèdent une couleur pourpre et parfois rougeâtre. La morphologie florale chez *Ceratonia siliqua* L est très complexe dont on peut distinguer (**Figure 3**) :

- Des inflorescences male (**Simon, 2010**) avec des étamines courtes ou bien longues.
- Des inflorescences femelles avec des étamines rudimentaires.
- Des inflorescences hermaphrodites.

La floraison à lieu en automne c'est pour ça cette espèce considérée comme la seule dans la région méditerranéenne qui fleurisse en été (**Benamar et al, 2011**).



Figure 3 : Inflorescence de caroubier femelle et male (**Hassan, 2008**).

I.6.3. Fruits

La gousse de *Ceratonia siliqua* L est principalement composée de deux éléments : la pulpe et les graines. Elle nécessite 9 à 10 mois pour atteindre la maturité (Batlle et Tous, 1997).

La gousse possède une couleur verte avant la maturité, et devient brune foncée à noire et parfumées après la maturité (Figure 4) (Haddarah, 2013).



Figure 4 : Fruits de *Ceratonia siliqua* L (Mohammed Yahya et al, 2017).

I.6.4. Graines

Les graines sont ovoïdes, rigides, d'une couleur qui dépend de la variété, elle peut-être marron ou rougeâtre (Figure 5) (Batlle et Tous, 1997).

Elles sont constituées de trois éléments : les téguments, la radicule, l'endosperme (Sébastien, 2018).



Figure 5 : Graine de *Ceratonia siliqua* L (Yassine, 2013).

I.6.5. Ecorces

Ceratonia siliqua L possède une écorce lisse et grise lorsque la plante est jeune ; et brune et rugueuse à l'âge adulte. Son bois de couleur rougeâtre est très dur (Ait Chitt *et al*, 2007).

I.7. Composition chimique de *Ceratonia siliqua* L

Ceratonia siliqua L est une espèce présente un réservoir potentiel de molécules naturelles bioactives, elle contient également des composés phénoliques qui lui confèrent différents rôles biologique (Dallali *et al*, 2018).

Des tannins condensés insolubles, terpenoïdes (stérole), alcaloïdes, quinones (Klonev *et al*. 2007 ; Iachkar *et al* 2016)

Des acides phénoliques (acide coumarique et l'acide gallique) sont identifiés dans les extraits des pulpes (Fedal *et al*, 2011).

Des flavonoïdes qui sont des (flavones, flavonoles, flavonones, isoflavones) (Metrouh, 2009). Les gousses et les graines de *Ceratonia siliqua* sont riches en glucides, fibres alimentaires, les matières grasses et les protéines (Gaouar, 2011).

Cette espèce est aussi riche en acides aminés tel que l'acide aspartique, l'alanine, la valine et également des minéraux de potassium et de calcium (Irfan et Khalid, 2017).

I.8. Utilisation de *Ceratonia siliqua* L

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

I.8.1. Utilisation traditionnelle

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

I.8.2. Usages alimentaires

L'utilisation de *Ceratonia siliqua* L comme ingrédient alimentaire par les industries pharmaceutiques et alimentaires pourrait être développée.

De nombreux fabricants agroalimentaires utilisent la farine de pulpe de *Ceratonia siliqua* L comme additif (E410), comme substitut du cacao dans les pâtisseries et la crème glacée. La richesse de la pulpe et des graines de caroube en éléments minéraux reflète l'importance

accordée à cet aliment depuis longtemps pour la nutrition animale et humaine (El bouzdoudi, 2017).

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

I.8.3. Utilisation cosmétique

L'une des applications industrielles de *Ceratonia siliqua* L est utilisée en cosmétique pour sa capacité à former une solution très visqueuse à une faible concentration en raison de ses propriétés épaississantes, émulsifiantes et stabilisantes (Addarah, 2013).

I.8.4. Importance économique

Ceratonia siliqua L est une source de bon marché d'hydrates de carbone actuellement explorées comme matériaux pour la production de bioéthanol. Le bois de *Ceratonia siliqua* L est très utilisé pour la fabrication du charbon. L'écorce et les racines sont employées dans le tannage (Addarah, 2013).

I.8.5. Travaux antérieur

Tableau 1 : Propriétés thérapeutiques de *Ceratonia siliqua* L.

Propriétés thérapeutiques	Action	Références
Effet anticancéreux des feuilles <i>Ceratonia siliqua</i> L	Extrait riche en polyphénols de feuilles de <i>Ceratonia siliqua</i> L a fortement diminué la viabilité de la lignée cellulaire d'adénocarcinome cervical humain (HeLa).	Custódio <i>et al</i>, 2011.

<p>Effet anti-inflammatoire</p>	<p><i>Ceratonia siliqua</i> L possède un effet anti inflammatoire significatif et peut être liée à l'inhibition de médiateurs inflammatoires (sérotonine, l'histamine, prostaglandine et cytokine).</p>	<p>Lachkar et al, 2016.</p>
<p>Effet sur le cholestérol et les triglycérides</p>	<p>Les fruits de <i>Ceratonia siliqua</i> L contient une teneur élevée en fibres insolubles qui réduisent les triglycérides chez la femme et réduisent le taux de cholestérol LDL /HDL</p>	<p>Zunft et al, 2003 (Nadia et al, 2014)</p>
<p>Effet antioxydant</p>	<p>- La présence de vitamine E dans les graines de <i>Ceratonia siliqua</i> L a été démontrée.</p> <p>-La richesse du fruit et feuille en polyphénols qui sont la principale source de pouvoir antioxydant de <i>Ceratonia siliqua</i> L, par piégeage des radicaux libres (OH).</p>	<p>Mokhtari et al, 2012. Sebail et al, 2013.</p>
<p>Effet hypoglycémiant</p>	<p>La gousse de <i>Ceratonia siliqua</i> L immature empêche l'absorption intestinale du glucose par l'inhibition du transport électrogène du glucose.</p> <p>L'effet hypoglycémiant exemple pancréatique in vitro de l'extrait méthanoïque en évidence par l'inhibition de l'α -amylase et de la -glucosidase.</p>	<p>Kaïs et al, 2017. Mousa et al, 2018.</p>

Chapitre 2

Les Métabolites Secondaires

Introduction

Le **métabolisme** (du grec : métabole, changement) est un processus très dynamique, dont les molécules sont en continuel renouvellement ; la composition d'une cellule à un instant donné est un équilibre entre synthèse et dégradation. L'essentiel des synthèses est orienté vers la production de molécules qui sont importantes pour la structure et le fonctionnement de la cellule (**Hopkins, 2003**). Les produits de métabolisme secondaire sont en très grand nombre, plus de 200 000 structures définies et sont d'une variété structurale extraordinaire mais sont produits en faible quantité (**Mansour, 2015**).

Ces molécules ne se rencontrent pas chez toutes les espèces donc ils n'interviennent pas dans les activités fondamentales de l'organisme végétal (croissance, développement, reproduction), ils sont accumulés après leur élaboration, mais peuvent être dégradés (**Gseyra, 2006**).

Les composés de métabolisme secondaire sont classés en 3 grandes classes :

- Les composés aromatique ou polyphénols.
- Les terpenoïdes et leurs dérivés.
- Les alcaloïdes (**Merghem, 2009**).

I. Composés phénoliques

I.1. Définition

Comme définition, nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considéré (**Akroum, 2011**). Ces composés chimiques sont très divers depuis les simples acides phénoliques jusqu'aux grands polymères complexes (**Hopkins, 2003**).

I.2. Structure chimique

La structure de base qui les caractérise est la présence d'un ou de plusieurs noyaux aromatiques auxquels sont directement liés un ou plusieurs groupements hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction (éther, ester), parmi ces métabolites on cite : les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins (**Amrouche et Yaya Koko, 2017**).

I.3. Biosynthèse des polyphénols

I.3.1. Voie d'acide shikimique

Dans cette voie l'erythrose 4- phosphate et le phosphoenol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement (**Akroum, 2011**). Ils sont condensés pour former le 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate 7-phosphate (DAHP). Cette réaction est catalysée par l'enzyme DAHP synthase (2-dehydro-3-deoxyarabinoheptulosonate-7phosphate synthase). La série des réactions enzymatiques conduit respectivement à la formation de : l'acide 3-déhydroquinique par l'enzyme 3- déhydroquinase synthase ; l'acide 3-déhydroshikimique par l'enzyme 3-déhydroquinase déhydratase et finalement l'acide shikimique par l'enzyme shikimate déshydrogénase. L'acide shikimique est encore converti en shikimate 3-phosphate par l'enzyme shikimate kinase, et plus tard en 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) par l'enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase, EPSP est alors converti en acide chorismique par la chorismate synthase. L'acide chorismique est à un point de branchement pour la biosynthèse des acides aminés aromatiques : le tryptophane et la tyrosine, la phénylalanine (**Boubekri, 2014**) qui, par désamination donne le précurseur immédiat des phénols, l'acide cinnamique (**Sarni-Manchado et Cheynier, 2006**). L'acide cinnamique est rapidement transformé en acide p-coumarique par l'addition d'un radical hydroxyle. La tyrosine est également désaminée en acide p-coumarique (**Hopkins, 1995**).

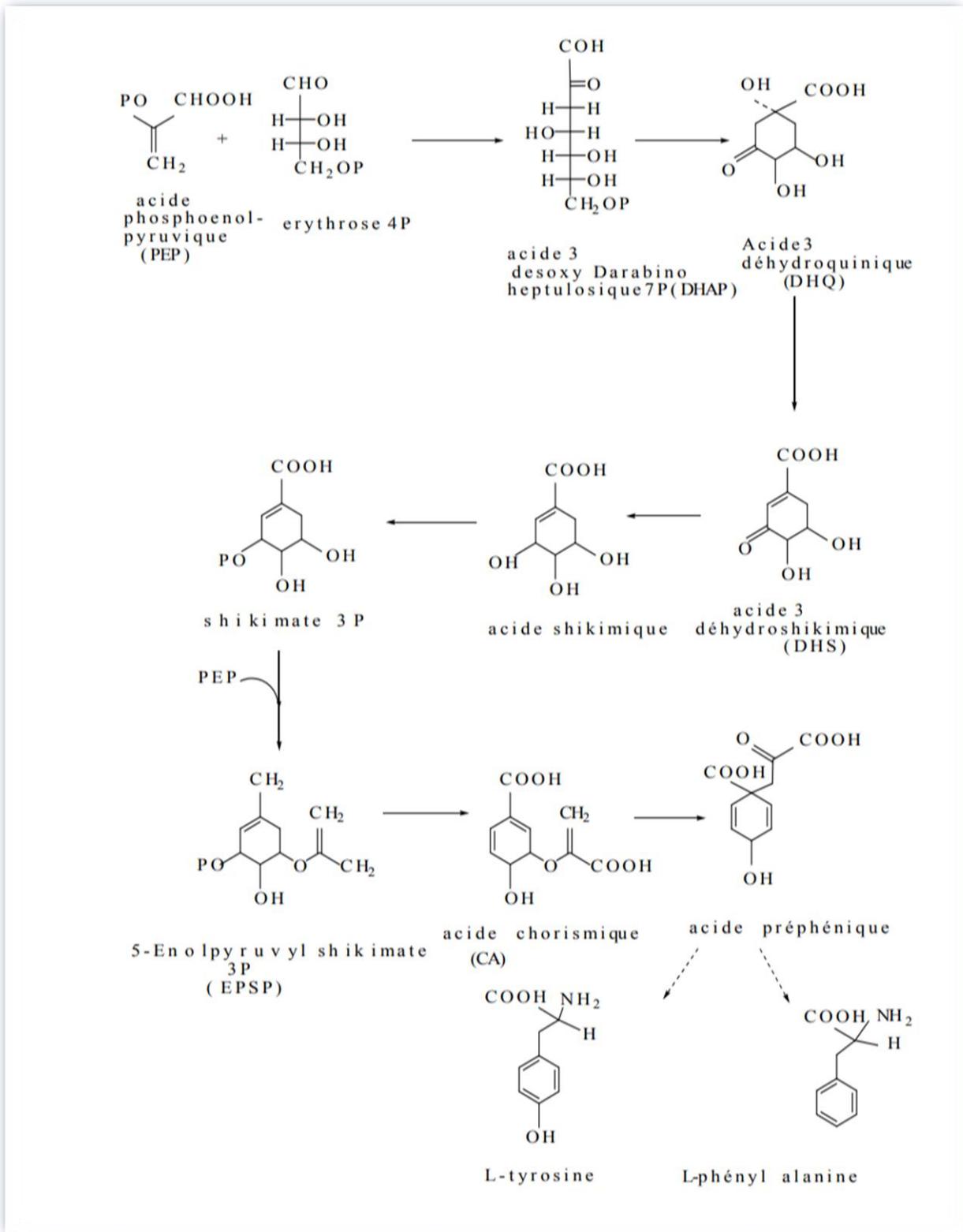


Figure 6 : Voie de shikimate (Talbi, 2015).

I.3.2. Voie d'acétate/ malonate

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l-acétylCoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités * Acétate * qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Djefel, 2017).

I.4. Classification des composés phénoliques

I.4.1. Acide phénolique

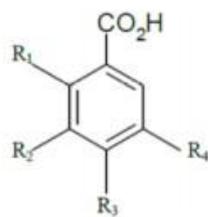
Les acides phénoliques sont largement distribués dans les fruits, les tiges et les feuilles des légumes (Andriale *et al*, 1997). Ces molécules sont caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzoïque auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle libre ou engagé dans une autre fonction : éther ou ester, hétéroside (Madi, 2018).

- Acide phénols dérivés d'acide benzoïque (Amrouche et Yaya Koko, 2017) :

- Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque.
- Ils ont une structure générale de base de type (C6-C1).
- Ils existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides.

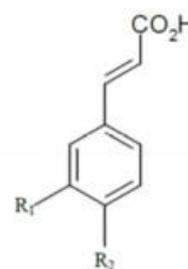
- Acide phénols dérivés d'acide cinnamique (Amrouche et Yaya Koko, 2017) :

- Ils dérivent de l'acide cinnamique.
- Ils ont une structure générale de base de type (C6-C3).
- Ils existent souvent sous forme combinée avec des molécules organiques.



Acides hydroxybenzoïques

R1=R4=H, R2=OCH₃, R3=OH Acide vanillique
 R1=H, R2=R3=R4=OH Acide gallique
 R1=OH, R2=R3=R4=H Acide salicylique



Acides hydroxycinnamiques

R1=R3=H, R2=OH Acide p-coumarique
 R1= R2=OH, R3=H Acide caféique
 R1=OCH₃, R2=OH, R3=H Acide férulique

Figure 7 : Structure des acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques (Saffidine, 2015).

I.4.2. Flavonoïdes

a. Définition

L'appellation *flavonoïdes* ressemble une très large gamme de composés polyphénolique. Ces composés représentent le groupe de composés phénoliques le plus diversifié. Le terme *flavonoïdes* est du à leur couleur jaune (= flavus en latin) qu'ils engendrent (Akroum, 2011).

b. Structure

De nos jours, plus de 9000 flavonoïdes ont été identifiés et leur nombre ne cesse d'accroître (Ben khaldi, 2013). Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux noyaux aromatiques (noyau A et B), et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) (Figure 8) (Benguerba, 2008). Des groupements hydroxyles, oxygènes, méthyles, ou des sucres peuvent être attachés sur les noyaux de cette molécule (Talbi, 2015).

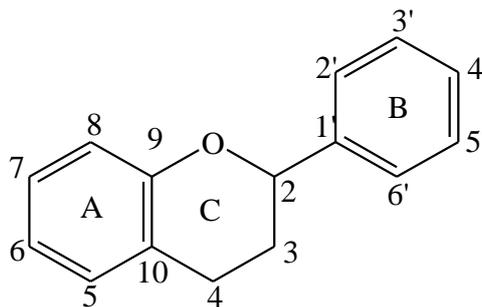


Figure 8 : Structure de base des flavonoïdes. (BENGURBA, 2008).

c. Localisation et distribution

Les flavonoïdes sont présents dans différentes parties des végétaux supérieurs selon le type de l'espèce : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois....etc (Tableau 2) (Akroum, 2011).

Tableau 2: Sources alimentaires des flavonoïdes (Bengurba, 2008).

<i>flavonoïdes</i>	<i>aliment</i>
<i>flavonols</i>	
kaempférol	Radis, brocoli, thé noir
quercétine	Oignon, pomme, olive, tomate
myricétine	Canneberge, vin rouge
Quercétine-3-glucoside	oignon
Quercétine-3-rhamnoglucoside (rutine)	Thé noir
<i>flavones</i>	
chrysine	Peau des fruits
apigénine	Persil, thym, romarin, céleri
lutéoline	Persil, céleri
Lutéoline-7-apiosylglucoside	Poivron rouge
<i>flavonones</i>	
naringénine	Fruits des genres <i>citrus</i>
Hespertine-7-rhamnoglucoside (hesperidine)	Jus d'orange
Naringénine-7-rhamnoglucoside (narirutine)	Jus d'orange
<i>Flavan-3-ols</i>	
épicatéchine	Thé vert, thé noir
catéchine	Thé vert, thé noir, pomme
épigallocatechine	Vin rouge
<i>Anthocyanidol</i>	
cyanidol	Cassis, myrtille
malvidol	Raisin, fraise, cassis
apigénidol	Framboise, fraise
<i>isoflavones</i>	
Genisteine-7-glucoside	soja
Daidzeine-7-glucoside	soja

d. Classification des flavonoïdes

En basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones, aurones (**Figure 9**) (**Belyagoubi, 2011**).

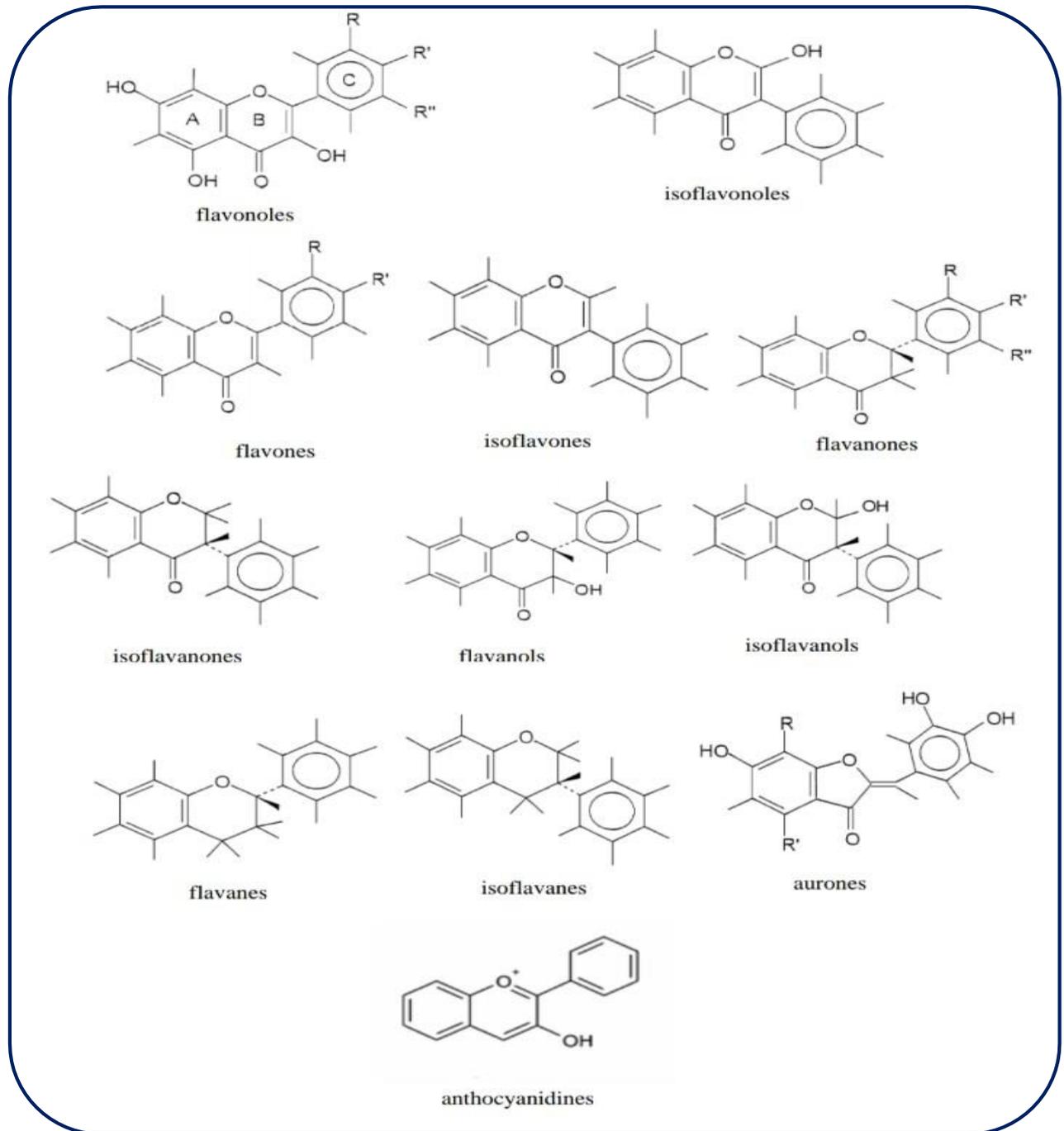


Figure 9 : Structure des squelettes de base des flavonoïdes (**Belyagoubi, 2012**).

e. Biosynthèse des flavonoïdes

Les connaissances actuelles sur la biosynthèse et la production des flavonoïdes catalysées par des enzymes proviennent de plusieurs études réalisées par de nombreux chercheurs. Malgré leur diversité structurale importante tous les flavonoïdes semblent avoir une voie synthétique commune (**Mekkiou, 2015**).

Ce sont des dérivés des phénylpropanoïdes caractérisés par l'adjonction au noyau coumaryle (en C6-C3) activé par le coenzyme A (coumaryle-CoA), de 3 acétyles (fournis par 3 malonyl-CoA), réaction suivie d'une cyclisation qui aboutit à une chalcone, la tétrahydroxychalcone (**Jean-François et al, 2017**). 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone est intermédiaire pour la formation de toutes les classes des flavonoïdes. Ces condensations sont catalysées par la chalcone synthase (CHS), enzyme clé dans la formation des flavonoïdes qui conduit à un précurseur, une chalcone (**Figure 10**). La chalcone néoformée donne une flavonone (la naringénine), une transformation catalysée par une chalcone-isomérase (CHI) (**Saffidine, 2015**).

La biosynthèse des différents groupes de flavonoïdes implique un ensemble complexe de réactions comprenant des hydroxylations, méthylation, oxydation, réduction, glycosylation. (**Madi, 2018**).

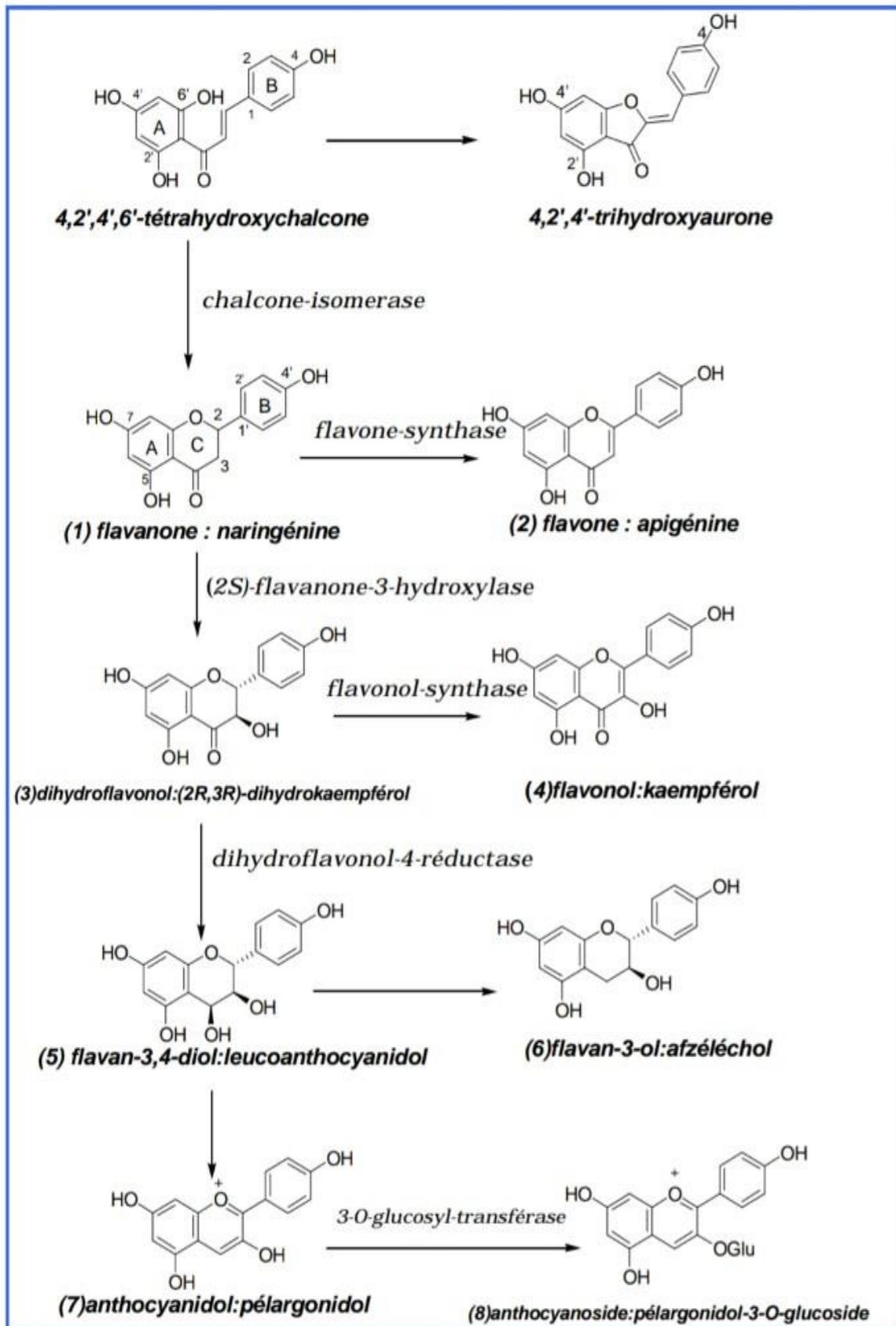


Figure 10 : La biosynthèse des flavonoïdes (Bengourba, 2008).

I.5. Propriétés biologiques des polyphénols et des flavonoïdes

Les polyphénols sont une multitude d'activités biologiques dépendant de leur structure chimique, puis qu'elles comprennent plus de 6000 molécules. Il constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes (**Kessoum, 2014**).

Permis ces activités : l'activité antiallergique, antimicrobienne, antivirale, antibactérienne, anti-carcinogènes, anti-inflammatoire et vaso-dilatatoire (ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leur propriété redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène) (**Belaidi et Boubendir, 2018**). Les polyphénols sont également utilisés dans l'industrie agro-alimentaire comme additif, colorant, arôme ou agent de conservation (**Kessoum, 2014**).

Ce qui concerne les flavonoïdes ont une activité :

- Activité antioxydante : ces composées peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capteur des radicaux hydroxyles, super oxydes, et peroxydes, soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre), soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (**Belyagoubi, 2012**).
- Activité anti-inflammatoire : les flavonoïdes et les tanins sont reconnue par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes par l'inhibition des hydrolases (**Cowan, 1999**).
- Activité sur le système cardio-vasculaire : Ils ont un effet positif dans l'athérosclérose et les maladies cardio-vasculaires en diminuant l'oxydation de LDL, et également un intérêt dans le traitement de l'hypertension artérielle, prévention des infarctus myocardiques (**Mladinka et al, 2010**).
- Et en plus, des activités antivirales, anti-tumorales, antiallergique, anticancéreuses, ils ont également des actions positives sur le diabète, les maladies d'Alzheimer et de parkinson (**Saffidine, 2015**).

Chapitre 3

Activités Biologiques

I. Activité antioxydante

I.1. Introduction

Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du ***stress oxydant***, c'est –à-dire d'une situation où la cellule ne contrôle plus la présence excessive de radicaux oxygénés toxiques, situation que les chercheurs impliquent dans la plupart des maladies humaines (**Alain Favier, 2003**).

I.2. Stress et radicaux libres

I.2.1. Définition de stress

Le stress oxydant est défini comme l'incapacité de l'organisme de se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO) en raison de la perturbation d'équilibre endogène entre ces derniers et les agents oxydants (AO). Ce déséquilibre conduit potentiellement à des dégâts structuraux et fonctionnels (**Bensakhria, 2018**).

Notre mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense), mais aussi nos mauvaises habitudes alimentaires, augmentent de façon anormale la production des EOA dans notre organisme (**Haleng et al, 2007**).

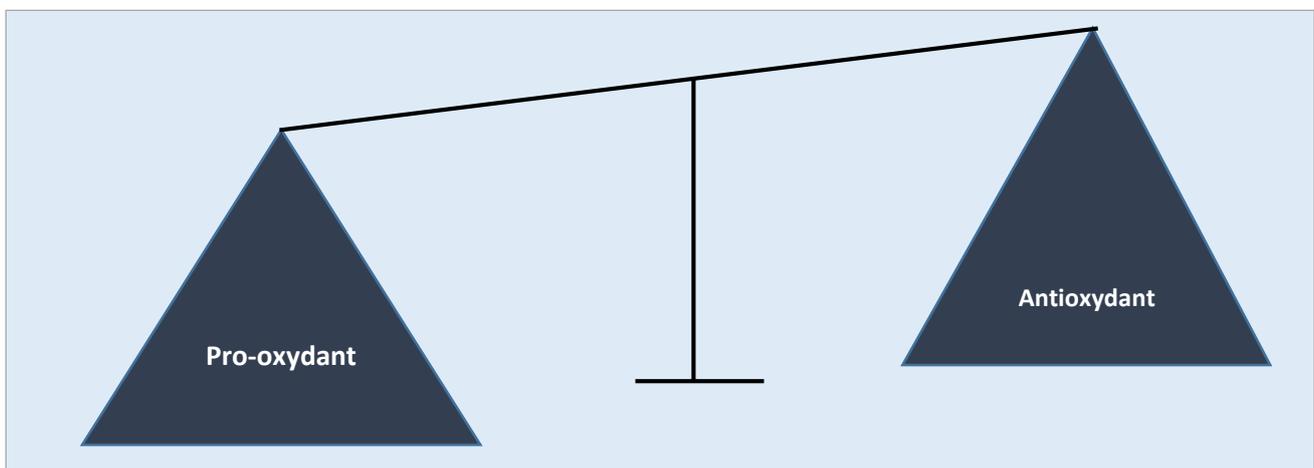


Figure 11 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et pro-oxydants.

I.2.2. Qu'est-ce qu'un radical libre

Un radical libre est une espèce caractérisée par une instabilité et /ou un pouvoir oxydant fort, il se différencie par la présence d'un électron non apparié sur la couche électronique la plus externe (**Akroum, 2011**).

I.2.2.1. Origine des radicaux libre

a. Origine endogène

Elles peuvent être de différents types, mais est essentiellement d'origine enzymatique comme le NADPH oxydase et du complexe mitochondriale de la chaîne respiratoire.

Il existe d'autre source joue un rôle dans la production de radicaux comme la xanthine oxydase, les peroxysomes, les lipo-oxygénases, les réactions inflammatoire (**Rezaire, 2012**).

b. Origine exogène

Peut avoir diverses origines, telle que (**Madi, 2018**) :

Les radiations ionisantes (exposition importante au soleil, radioactivité artificielle ou naturelle), la pollution, la consommation de tabac et d'alcool, tous processus susceptible de surcharger les réactions de détoxification hépatique, notamment une perte de poids importante.

I.3. Espèce réactive d'oxygène ERO

L'oxygène est un élément pour les organismes multicellulaires parce qu'il permet de produire de l'énergie en oxydant de la matière organique, mais nos cellules convertissent une partie de cet oxygène en métabolites toxique : les radicaux libres organiques (**Benmansour, 2016**) qui peut donner l'espèce réactive d'oxygène (ERO) issus de l'oxygène moléculaire. Elles représentent la plus importante classe d'espèces réactives générées dans les organismes vivants à cause de l'importance du métabolisme aérobie (**M.Ronald ST-Louis, 2011**).

a. Radical super oxyde 1O_2

À l'état naturel, l'oxygène qui comporte naturellement deux électrons célibataire sur la couche périphérique, est très instable avec une très forte tendance à oxyder les composés qu'il rencontre en leur arrachant un électron pour l'apparier à l'un de ses électrons célibataire, donc ces composés deviennent à leur tour instables (**Xavier Leverve, 2009**).

b. Radicale hydroxyle OH

Il est une espèce radicalaire hautement réactive. Il est principalement formé lors de réactions d'ion métallique avec le peroxyde d'hydrogène (**Boudjouref, 2011**).

c. Peroxyde d'Hydrogène H_2O_2

L'anion super oxyde subit généralement une réaction spontanée de dismutation, aboutissant à la formation de peroxyde hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène (**Figure 12**) (**M.Ronald ST-Louis, 2011**).

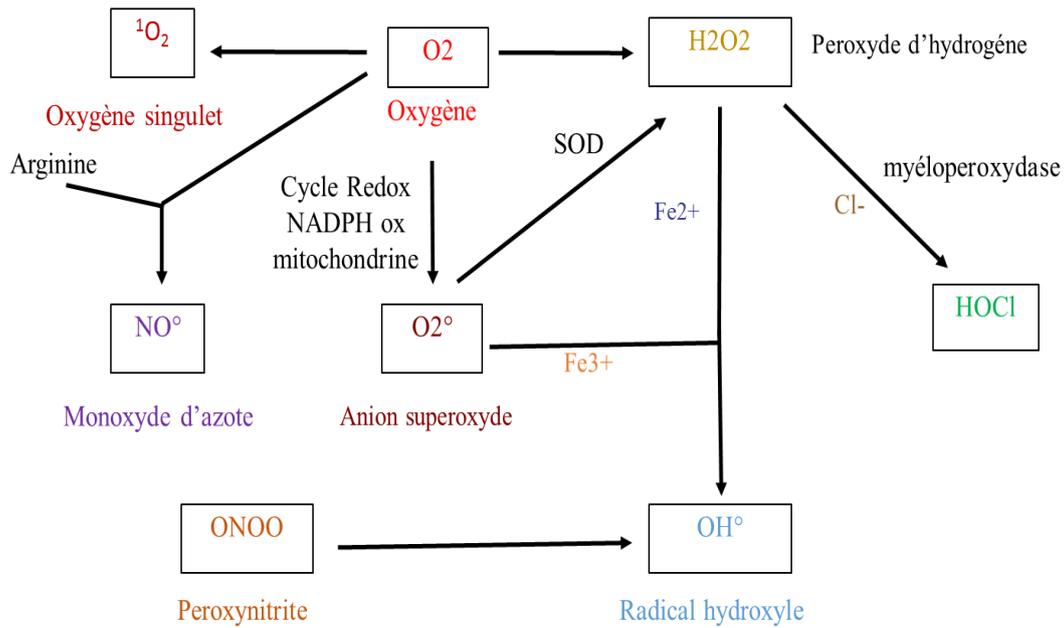


Figure 12 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène (Alain Favier, 2003).

Il existe d'autres espèces réactives de l'oxygène tel que le radical libre azoté (RNS) : l'oxydation azotique NO est principalement produite par un système enzymatique, NO synthétase qui transforme l'arginine en citrulline en présence de la NADPH.



I.4. Conséquence de stress oxydatif

Les espèces réactives d'oxygène sont produites d'une manière accrue lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène est perturbée (stress oxydant), ces espèces sont responsables de manière directe ou indirecte de nombreux dommages oxydatifs au niveau moléculaire (acide nucléique, protéine, lipides), peuvent affecter considérablement les mécanismes cellulaires (Monique Gardés-Albert *et al*, 2003).

I.4.1. Les lipides : les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires et subcellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation (Blandine, 2006).

I.4.2. Les protéines : L'oxydation des protéines et des acides aminés par les ERO aboutit à la formation des produits carbonyle et hydroxyle. Les acides aminés aromatiques tels que

tryptophane, la phénylalanine et la tyrosine et les acides aminés soufrés dont la cystéine et la méthionine, les acides aminés basiques (arginine, leucine) sont plus particulièrement sensibles à ces phénomènes (Clementine, 2013).

I.4.3. ADN : l'ADN (nucléaire ou mitochondriale) est également une cible majeure des ERO dont les radicaux O_2 et OH provoquent des lésions de l'ADN ceux-ci peuvent entraîner à long terme des mutations, délétion, amplification à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (Chistelle et Koechlin-Ramonatxo, 2006).

I.5. Antioxydante et système de défense

Un antioxydant est une substance qui à faible concentration prévient ou retarde significativement l'oxydation d'un substrat, il a pour rôle d'empêcher la formation des radicaux libres, de permettre leur élimination ou bien de réparer les dégâts causés par les radicaux libres (Clémentine, 2013).

I.5.1. Antioxydante enzymatique

a. Super oxyde dismutase (SOD)

Ces métalloprotéines qui représentent une des premières lignes de défense contre le stress oxydant entraînant l'élimination de l'anion super-oxyde O_2^- par une réaction de dismutation en le transformant en peroxyde d'hydrogène et en oxygène (Haleng *et al*, 2007).

b. Catalase

La catalase est une enzyme intracellulaire, localisée principalement dans les peroxysomes. Elle catalyse la réaction de détoxification du H_2O_2 (généralement produits par la SOD) (Benaïssa, 2012).

c. Système Glutathion Peroxydase/ Glutathion réductase (GPx/GR)

La glutathion peroxydase (GPx) est présente dans le cytoplasme où elle catalyse la régulation des hydroperoxydes (H_2O_2) et des peroxydes lipidique en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (Benaïssa, 2012).

d. Thioridoxine peroxydase (Trx)

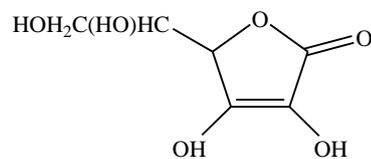
Grâce à ses propriétés de capture des radicaux libres il agit contre une grande variété de stress oxydatifs. Des données biochimiques montrent que les thiorédoxines réduisent des

protéines clés pour le développement, la division cellulaire ou la réponse au stress oxydatif (Anísio Francisco, 2005).

I.5.2. Antioxydants non enzymatiques

a. Vitamine C ou acide ascorbique

Il est une vitamine hydrosoluble (Boubekri, 2014), cytosolique ou extracellulaire. Elle peut capter directement l'oxygène et l'OH (Figure 13), elle peut aussi réduire le radical α -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E (Blandine, 2006).

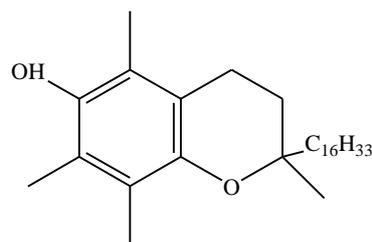


acide ascorbique

Figure 13 : Structure de la vitamine C (Vertuani, 2004).

b. Vitamine E ou α -tocophérol

Il est une vitamine liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique (Figure 14) (Blandine, 2006). Son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduit ainsi le radical RO_2 , et constitue par ce biais le seul antioxydant liposoluble assurant cette protection (Anísio Francisco, 2005).



α -tocophérol

Figure 14 : Structure de la vitamine E (Lopez, 2005).

c. Glutathion

Grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx), le glutathion réduit (GSH) réduit le peroxyde d'hydrogène il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique (**Blandine, 2006**).

d. Caroténoïdes

Les caroténoïdes possédant un rôle spécifique de capteur d'oxygène singulet O_2 , ce qui leur permet d'exercer une protection vis-à-vis des dommages induits par les rayons ultraviolets de la lumière solaire (**Monique Gardés-Albert et al, 2003**).

e. Acide Urique

Acide urique est un puissant réducteur des radicaux libres : il réduit les radicaux peroxyde, hydroxyle, l'acide urique représente 60% de la capacité antioxydante plasmatique (**Clementine, 2013**).

f. Bilirubine

La bilirubine est un composé non hydrosoluble, elle est capable de piéger des radicaux RO_2 , elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine contre les attaques radicalaires (**Bennamara, 2017**).

g. Les phénols

Les polyphénols sont des molécules organiques hydrosolubles, ils sont capables de piéger des espèces radicalaires et de chélater les métaux de transition comme le Fer et le Cuivre qui permettent de catalyser les oxydations (**Guillouty, 2016**).

I.5.3. Antioxydant synthétique

La butylhydroxyanisol (**BHA**) et butylhydroxytolène (**BHT**) sont les antioxydants synthétiques lipophiles les plus fréquemment utilisés comme conservateurs à faible concentration (**Figure 15**), dont les produits cosmétiques et alimentaires afin de protéger les lipides du rancissement. Les produits de dégradation du BHA et BHT étant suspectés d'être cancérogènes (**Carole Barus, 2008**).

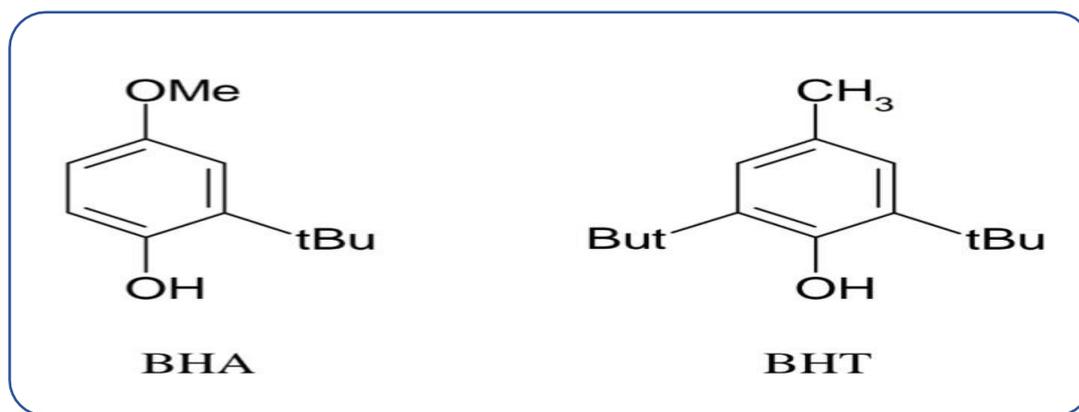


Figure 15 : Formules développées du BHA et du BHT (Carole Barus, 2008).

II. Activité enzymatique

II.1. activité anti Alzheimer

II.1.1. la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une affection dégénérative du système nerveux central entraînant une perte progressive des fonctions cognitives, notamment de la mémoire, et des troubles comportementaux. La maladie a été décrite pour la première fois par le psychiatre et anatomopathologiste Allemand, Aloïs Alzheimer en 1906 (Emiline, 2010). Elle se caractérise également par une atrophie cérébrale importante et sur le plan neurobiologique par un déficit en acétylcholine dû à la perte synaptique et neuronale (Duyckaerts, 2002). Il existe plusieurs stratégies pour améliorer la neurotransmission cholinergique, bien que celle qui a été la plus efficace jusqu'à présent soit l'hypothèse cholinergique, c'est-à-dire la stimulation des récepteurs cholinergique ou l'augmentation de la disponibilité de l'ACh libérée dans la fente synaptique neuronale en inhibant son hydrolyse par l'acétylcholinestérase (AChE) au moyen des inhibiteurs AChE (AChEIs) (Mohammed Saleem Ali, 2014).

II.1.2. Acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est une enzyme neuronale essentielle qui est présente dans le sang dans les synapses cholinergiques et les jonctions neuromusculaires chez les vertébrés et les invertébrés. La fonction principale de l'AChE est l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine (ACh), régulant ainsi la neurotransmission (Mutero et Fournier, 1992).

Partie 2

Partie Pratique

Chapitre 1
Matériels et Méthodes

I. Matériels

I.1. Matériel végétale

Les feuilles de *Ceratonia siliqua* L ont été récoltées de la région Constantine 19/01/1019, sécher à l'air libre pendant 10 jour à température ambiante, après séchage les feuilles sont broyées par un mixeur pour obtenir des petites particules de taille 1-2 cm (**Figure 16**).



Figure 16 : Feuilles sèches et broyées.

Tableau 3 : Matériel de laboratoire.

Matériel	Les solvants
- Bicher.	- Méthanol
- Papier filtre.	- Ether de pétrole
- Ultrason.	- Chloroforme
- Rota vapeur.	- Acétate d'éthyle
- Ampoule à déconté.	- Butanol
- Ultracent Fiche scientifique	

II. Méthodes

II.1. Extraction solide-liquide

Notre travail est effectué par deux méthodes successives, macération et ultrason, l'extraction est faite selon le protocole de **Laghari et al, 2013**.

200 g de la matière végétale broyée a été macérée dans un bicher contentent un système solvant méthanol-eau (70/30, V/V), pendant un jour, suivi par ultrason 1H/20 Mhz (**Figure17**). L'extrait est filtré, puis évaporé presque à sec sous pression réduite par l'évaporateur rotatif, cette extraction est répétée trois fois (**Figure18**).



Figure17 : Extraction solide/liquide des feuilles par macération et ultrason.

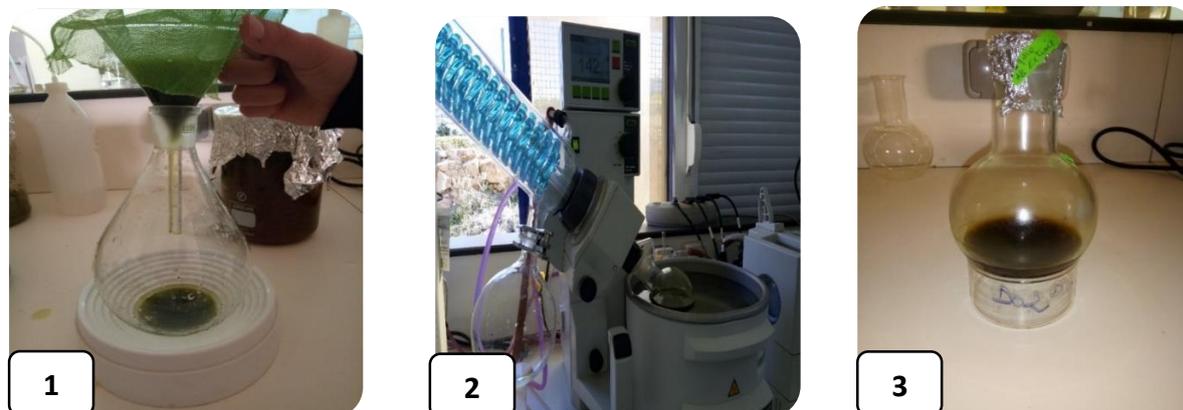


Figure18 : Etape d'extraction solide/liquide

- 1- Filtration,
- 2- Evaporation
- 3- Extrait brut

L'extrait obtenu est repris par de l'eau distillée jusqu'à volume 200 ml et filtré par papier wathman (**Figure19**).

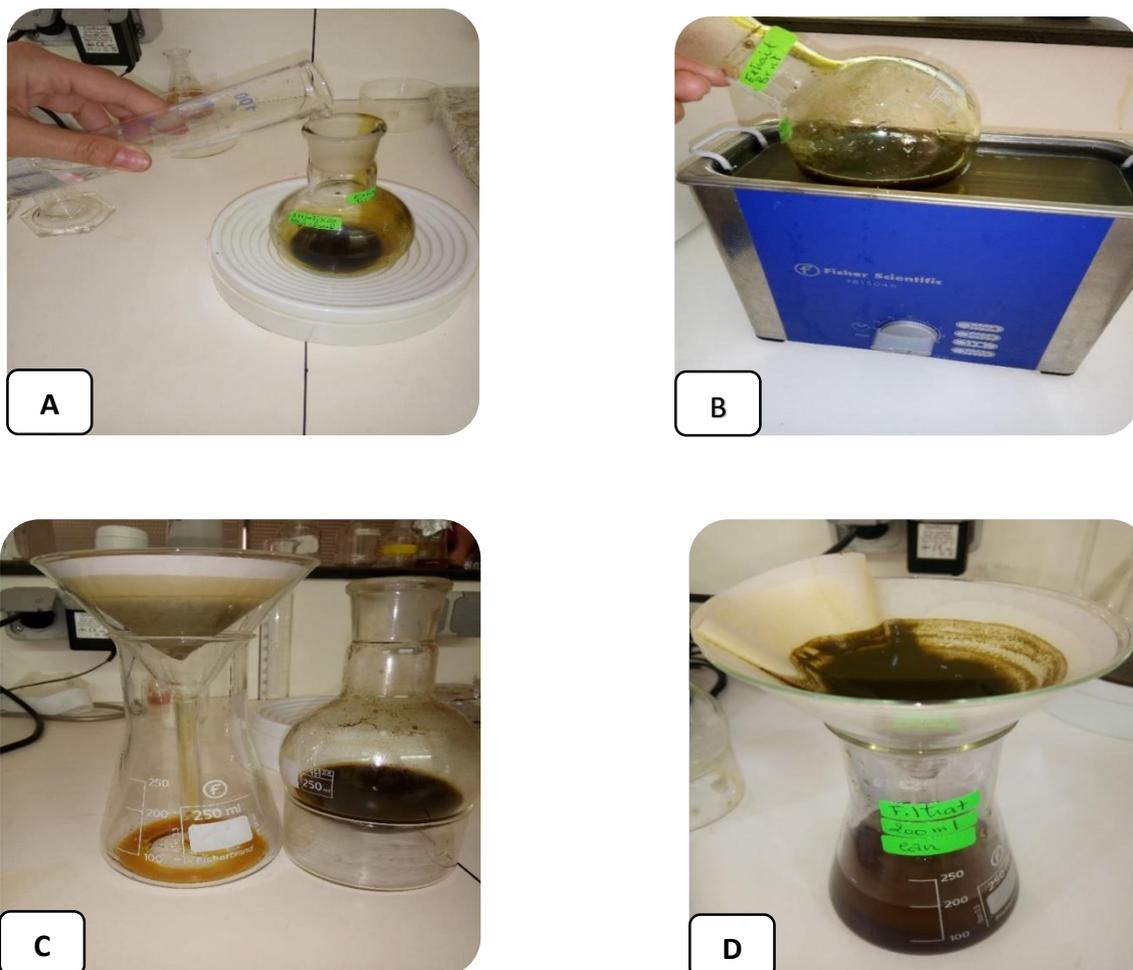


Figure 19 : Reprise de l'extrait méthanolique.

A : Reprise de l'extrait.

B : Sanification.

C : Filtration.

D : Filtrat.

II.2. Extraction en phase liquide- liquide

Cette extraction se repose sur la spécificité et la polarité croissante des solvants organiques vis-à-vis les molécules polyphénoliques séparées contenant dans l'extrait brut obtenu.

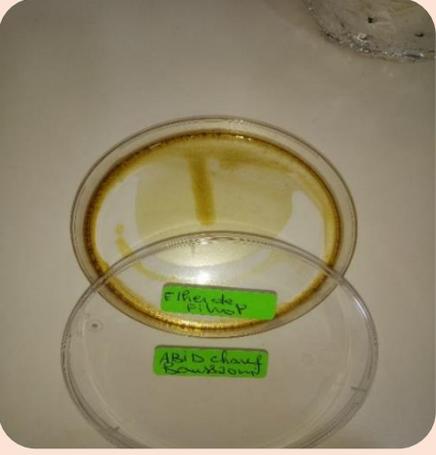
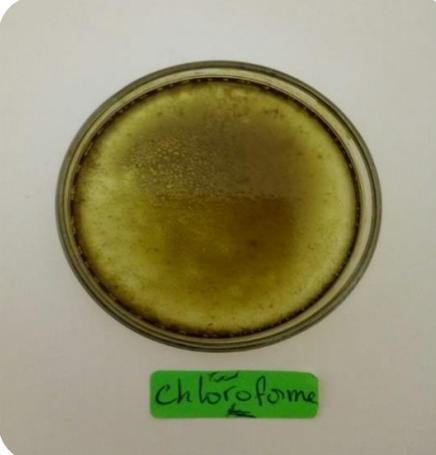
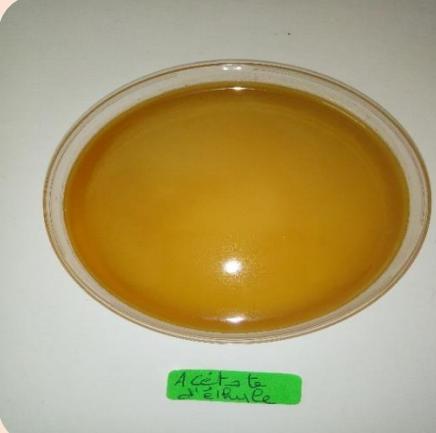
- Affrontement par l'éther de pétrole.
- Affrontement par le chloroforme.
- Affrontement par l'acétate d'éthyle
- Affrontement par le butanol.

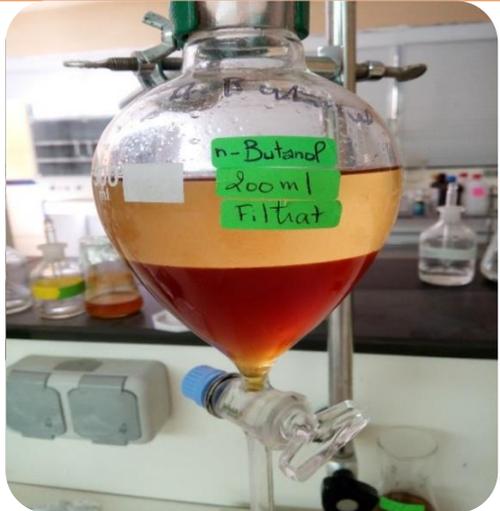
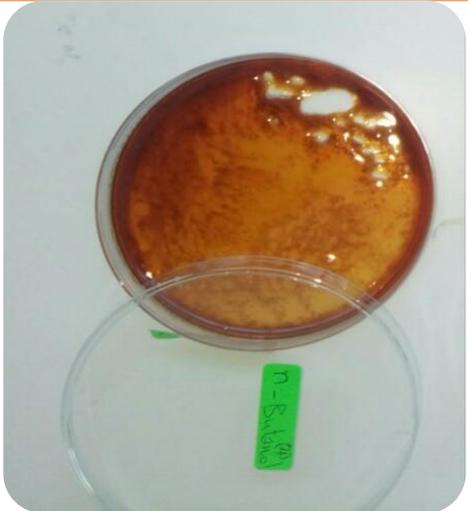
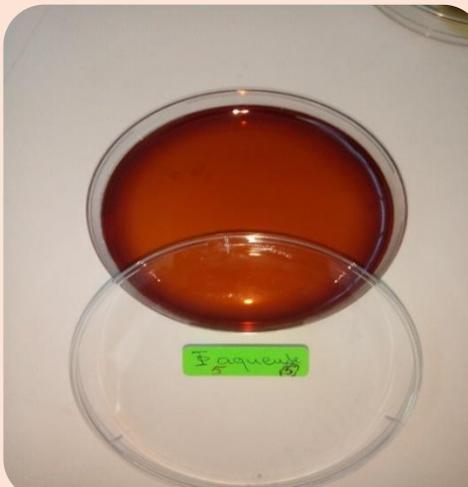
A l'aide d'une ampoule à déconté, la phase aqueuse a été mélangée avec 200 ml de premier solvant qui est l'éther de pétrole puis laisser pour bien séparée.

Les cinq phases (la phase éther de pétrole, phase chloroformique, phase acétate d'éthyle, la phase butanolique et aqueuse) sont récupérées et évaporé par l'évaporateur rotatif à pression et

température précise puis reprise par 10 ml de méthanol et laissé sous la hotte pour évaporer le solvant puis conservé à 4 °C (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Fractionnement de l'extrait brut en phase liquide- liquide.

Solvant	Fractionnement (deux phases)	Récupération
<p>Ether de pétrole (1 fois)</p>		
<p>Chloroforme (3 fois)</p>		
<p>Acétate d'éthyle (3 fois)</p>		

Butanol (3 fois)		
Phase aqueux résiduelle		

II.3. Screening biochimique

L'objectif de l'étude phytochimique est d'avoir une bonne caractérisation sur les activités biologiques par la recherche et la détection des différentes classes des métabolites secondaires de notre plante.

1. Test des stéroïdes

Les stéroïdes sont mis en évidence par dissoudre chaque extrait dans 1 ml de chloroforme et ajouter 1 ml d'acide sulfurique concentré. Le test positif est révélé par l'apparition d'une couche supérieure de couleur rouge (Trease & Evans, 1978).

2. Test des quinones libres

2 ml d'extrait a été mélangé avec quelques gouttes de NAOH (1/10). La présence des quinones libres est montrée par l'apparition d'une couleur jaune, rouge ou violet (**Najja et al, 2011**).

3. Test des flavonoïdes

La présence ou l'absence des flavonoïdes dans un extrait peut être mise en évidence par un test simple et rapides ; test au magnésium (**Karumi et al, 2004**). On met quelques gouttes de HCL concentré (2N) et 0.5 g de Mg dans 5 ml de l'extrait. On laisse agir 3 min. La coloration rose-rouge ou jaune, après 3 min d'incubation à température ambiante, indique la présence des flavonoïdes (**Karumi et al, 2004**).

4. Test des flavonoïdes glycosides

On mélange 2 ml de l'extrait dilué dans le méthanol avec 1 ml d'hydroxyde de potassium (KOH) à 1%. L'apparition d'une couleur jaune, révèle la présence des flavonoïdes glycoside (**Iqbal Hussain et al, 2011**).

5. Test des sucres réducteurs

5 ml de liqueur de Fehling est ajouté à 5 ml de l'extrait. La formation d'un précipité rouge brique après 2-3 min de chauffage au bain-marie à 70°C indique une réaction positive (**Yves Alain et al, 2007**).

6. Test des saponines

La détection des saponines est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 1 ml de l'extrait. Par la suite, cette solution est fortement agitée. Après 15 min de repos, la détection des saponines se traduit par la persistance d'une mousse d'eau moins 1 cm après les 15 min (**Dohou et al, 2003 ; Koffi et al, 2009**).

7. Test des anthocyanines

On mélange 5ml d'extrait avec 4ml d'hydroxyle d'ammoniac (NH₄OH) concentré (30%). L'apparition d'une coloration rouge indique la présence des anthocyanines (**Bidie et al, 2011**).

8. Test des alcaloïdes

Taste d'alcaloïde ou test de Mayer : l'extrait méthanoïque est repris dans quelque ml d'HCl 50%. La formation d'un précipite jaune, après l'ajout de quelque gouttes du réactifs de Mayer,

témoigne la présence d'alcaloïdes. Ce test est fondé sur la capacité qu'on les alcaloïdes à se combiner avec les métaux lourds (Dohou *et al*, 2003).

9. Test des tanins vrais

Un aliquote d'extrait repris dans un 2 ml d'eau distillée, ajoute quelque gouttes d'HCl concentré le tout est chauffé au bain marie bouillant, la formation d'un précipité rouge indique un test positif (Yves-Alain *et al*, 2007).

II.4. Dosage

II.4.1. Total Flavonoïde

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre trichlorure d'aluminium ($AlCl_3$) et les flavonoïdes. La méthode de Topçu *et al*, 2007 et utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

❖ Procédure

Un volume de 50 μ l de l'extraite diluée est ajouté à 130 μ l de méthanol suivi par 10 μ l potassium d'acétate (CH_3COOK) et 10 μ l nitrate d'aluminium ($Al(NO_3)_2 \cdot 9H_2O$), après 40 min l'absorbance est lue à une longueur d'onde de 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 μ l extrait + 150 μ l méthanol).

La quercétine a été utilisée comme une courbe d'étalonnage des flavonoïdes à une concentration de 0,2 mg/ml.

II.4.2. Total Phénolique

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965) selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller *et al*, 2010.

Le réactif FCR, constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), est réduit, lors de l'oxydation des phénols. La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximum aux environs de 750 -765 nm.

La concentration des polyphénols totaux est estimée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (0,2mg /ml).

❖ Procédure

Un volume de 20 µl d'extrait de plante a été ajouté à 100µl de FCR dilué (1 :10) et 75 µl de carbonate de sodium (7,5%) dans une microplaque 96 puits, mettre le mélange à l'obscurité pendant deux heures puis la lecture est fait à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol).

II.5. Activités anti-oxydantes (*in vitro*)

In vitro les propriétés antioxydants des extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua L* ont été déterminées par plusieurs méthodes différentes : piégeage du radicale libre DPPH, piégeage de l'ABTS, méthode CUPRAC, Pouvoir réducteur, l'activité superoxyde DMSO alcalin, Phénanthroline,

II.5.1. Piégeage des radicaux libres à l'aide du DPPH

Le principe de cette méthode est la réduction du DPPH (2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl) de couleur violette en 2,2 diphényl-1-picrylhydrazine de couleur jaune (**Figure 20**). Le DPPH absorbe à 517 nm, mais lors de la réduction par un antioxydant son absorption diminue (**Bensouici, 2015**).

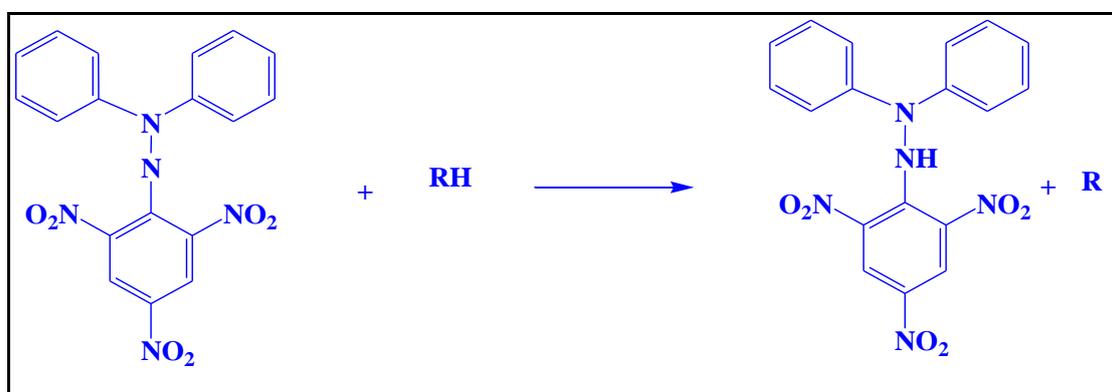


Figure 20 : Transformation de radical DPPH en DPPH.

❖ Préparation de la DPPH

La solution de DPPH a été préparé par la solubilisation de 6 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol et gardé à -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est 517 nm dans le spectrophotomètre.

Le pourcentage d'inhibition de différents extraits a été calculé à partir de la formule suivant :

$$\% \text{ Inhibition} = [(A C - A E) / A C] * 100$$

A C : Absorbance du contrôle.

A E : Absorbance de l'extrait.

A partir d'équations de régression linéaire des graphes représentés :

$$Y = a X + b$$

Nous avons déterminé CI50 qui est définie comme la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour balayer 50 % des radicaux libres. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées.

Donc CI50 de chaque extrait est calculé :

$$CI50 = (Y - b) / a$$

❖ Procédure

Le protocole suivi est celui de **Blois, 1958**, dont un volume de 40 µl de chaque extrait à différente concentration est déposé dans une microplaque de 96 puits et 160 µl de la DPPH. Un contrôle négatif est préparé en ajoutant 40 µl du méthanol à 160 µl de DPPH après incubation à température ambiante à l'obscurité pendant 30 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm.

II.5.2. Activité ABTS

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de **Re et al, 1999**. L'activité totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS^{•+}. Donc en réagissant avec le persulfate de potassium (K₂ S₂ O₈), ABTS forme le radical ABTS^{•+} de couleur bleue à vert. L'ajoute d'un antioxydant va réduire ce radical et provoque la décoloration du mélange (**Beddou, 2015**).

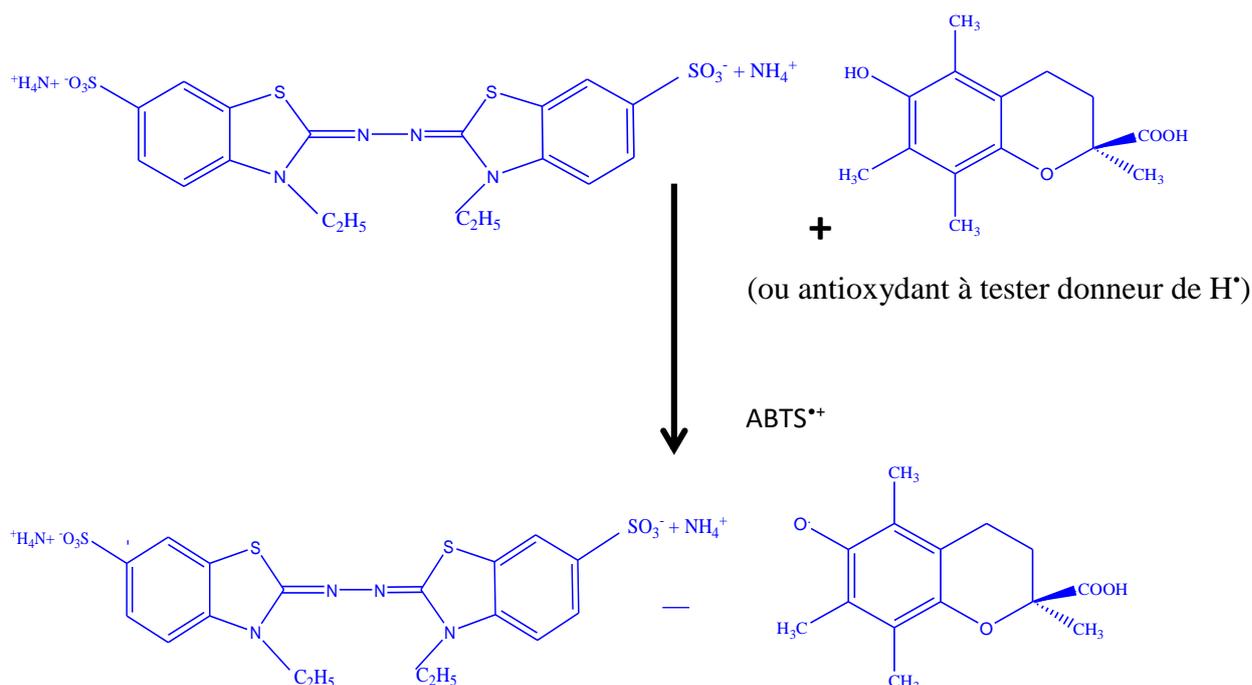


Figure 21 : Formation et piégeage du radical ABTS^{•+} par un antioxydant donneur de H[•].

➤ Préparation de la solution d'ABTS

A partir de l'ABTS (19,2 mg) et du persulfate de potassium K₂S₂O₈ (3,3 mg) : les deux produits en solution aqueuse (10 ml H₂O) sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12- 16H, l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée par (Ethanol ou H₂O) à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage.

❖ Procédure

160 µl de solution d'ABTS^{•+} a été ajouté à 40 µl d'extrait diluée, après 10 min l'absorbance a été fait à 734 nm.

L'activité ABTS^{•+} a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ scavenging effect (\%)} = (A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}} / A_{\text{Control}}) * 100.$$

II.5.3. La réduction du complexe Cuivre-Neocuproéne (CUPRAC méthode)

La méthode CUPRAC (cupric ion reducing antioxydant capacity) est basé sur le suivie de la diminution de l'absorption accrue du complexe Néocuproéne (NC), cuivre (Cu²⁺) Nc₂-Cu⁺²(Figure22).

En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-neocuproène est réduit et cette réduction est quantifiée spectrophotométriquement à une longueur d'onde de 450 nm. (Bensouici, 2015).

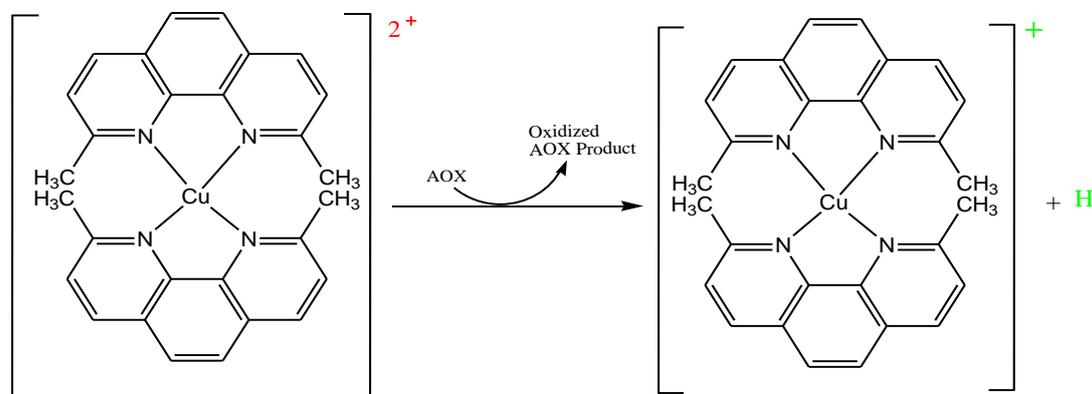


Figure 22 : Réduction du complexe chromogène de Cu^{+2} -Nc.

❖ Procédure

Le protocole suivi est celui d'Apak *et al*, 2004, dont un volume de 40 μl extrait a été ajouté à 60 μl de la solution d'acétate d'ammonium puis 50 μl neocupronin 50 μl CuCl_2 , après 1 heure l'absorbance a été fait à 450nm.

II.5.4. Pouvoir réducteur

La méthode du pouvoir réducteur appelé FRAP est un essai simple, rapide et reproductible est universel, Cette méthode est basée sur l'aptitude des extraits à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}). Le mécanisme est connu comme état un indicateur de l'activité donatrice d'électron l'absorbance est déterminée à 700 nm. L'augmentation de l'absorbance de milieu réactionnelle indique une augmentation du pouvoir réducteur des extraites testés. α -Tocophérol est utilisé comme contrôle positif (Beddou, 2015).

❖ Procédure

Un volume de 10 μl extrait a été ajouté à 40 μl phosphate buffer (pH 6.6) et 50 μl potassium ferricyanide (1%) $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Après 20 min à 50°C , un volume de 50 μl acide trichloroacétique (TCA) (10%) et 40 μl H_2O et 10 μl Chlorure ferrique FeCl_3 (0.1%) a été ajouté au mélange. L'absorbance a été mesurée à 700 nm.

II.5.5. Piégeage de radical superoxyde par la méthode DMSO-alkalin

Cette activité permet de tester par spectrophotométrie la capacité de l'extrait antioxydant à capturer l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), ce qui empêchera la réduction du nitro blue tetrazolium (NBT) en bleu de formazan. Le test est positif si la solution est colorée en jaune. En effet, la génération de ce radical anionique stable est favorisée par l'alcalinisation du DMSO.

Les absorbances obtenues permettent de calculer un pourcentage de réduction du NBT_2^+ par rapport à un témoin constitué d'un milieu réactionnel dépourvu de composé antioxydante (Parejo *et al*, 2002).

❖ Procédure

40 μ l extrait et 130 μ l DMSO alcalin (20 mg de NaOH est dissoute dans 1 ml de H_2O et compléter par le DMSO a 100 ml) ont été ajouté à 30 μ l NBT (10 mg dans 10 ml de l'eau distillé), l'absorbance a été lue à 560 nm.

II.5.6. Phénanthroline

La méthode phénanthroline était basée sur la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} ion par un antioxydant l'ion Fe^{2+} formé a ensuite réagi avec l'ortho-phénanthroline pour forme un complexe rouge-orange. L'ancienne méthode à la phénanthroline a été modifiée en remplaçant le méthanol par de l'eau comme solvant, les conditions optimales ont été déterminées par la variation de longueur d'onde, de l'ortho-phénanthroline et de la concentration de $FeCl_3$ (Yefride *et al*, 2018).

❖ Procédure

Selon le protocole de Szydłowska-Czerniaka *et al*, 2008, un volume 10 μ l extrait a été ajouté à 50 μ l Chlorure ferrique $FeCl_3$ (0.2%) et 30 μ l Phenanthroline (0.5%) puis 110 μ l MeOH, après l'incubation à l'obscurité pendant 20 min à 30°C, l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Le BHT est utilisé comme standard.

II.6. Activité enzymatique *in vitro*

II.6.1. Anti-acétylcholinestérase (Alzheimer *in-vitro*)

L'acétylcholinestérase (AChE) est l'enzyme responsable de la métabolisation de l'acétylcholine, neurotransmetteur du système cholinergique qui est impliqué notamment dans les fonctions cognitives. L'inhibition de cette enzyme va engendrer une diminution du turnover de l'acétylcholine et donc augmenter les effets cholinergiques. Les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase sont utilisés pour diminuer les symptômes de la maladie d'Alzheimer.

Dans la Maladie d'Alzheimer (MA), les cellules nerveuses se détériorent progressivement, surtout celles produisant de l'acétylcholine, substrat important pour la mémoire (**Bensouici, 2015**).

❖ **Procédure**

L'activité Acétylcholinestérase est déterminée par la méthode d'**Ellman et al, 1961**.

150 µL de sodium phosphate buffer (pH 8.0) a été ajouté à 10 µL d'extrait solution dissous dans l'éthanol à différentes concentrations suivi par 20 µL AChE puis incubé à 25°C pendant 15 min, après l'incubation 10 µL de DTNB (0.5 mM) et 10 µL d'acetylthiocholine iodide ont été ajoutés au mélange, l'absorbance a été lue à 412 nm, pour 0 min une fois, 5 min deux lectures, 10 min trois lectures, 15 min quatre lectures.

Chapitre 2

Résultats et discussion

I. Rendement des extraites

Le rendement d'extrait est calculé par la formule suivante (Fellah *et al*, 2018).

$$\text{Rendement d'extraction} = (\text{masse d'extrait} / \text{masse d'échantillon}) * 100.$$

Chaque extrait a été caractérisé par sa couleur, son aspect et son rendement par rapport à la matière sèche.

Tableau 5 : Couleur et aspect et rendement de chaque extrait.

Extrait	Couleur	Aspect	Rendement
EtPe	Vert clair	Pâteux	0,18%
Chf	Vert foncé	Pâteux	0,61%
AcEt	Marron foncé	Liquide	2,67%
BuOH	Jaune	Poudre	2,45%
MeOH	Vert foncé	Pâteux	0,73%
AQ	Couleur miel (marron)	Lyophilisé	4,45%

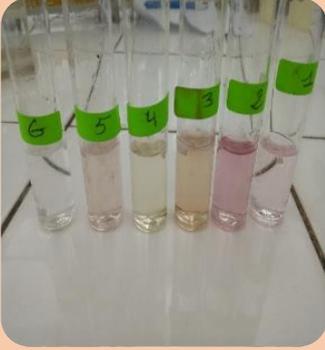
Les résultats obtenus montrent que parmi les six extraits, l'extrait AQ représente le rendement le plus élevé 4,45 %, suivi par l'extrait AcEt 2,67% et BuOH 2,45%, alors que l'extrait MeOH et Chf possèdent presque le même rendement (0,73% et 0,61%), l'extrait EtPe possède le rendement le plus bas 0,18%.

II. Criblage phytochimique

L'objectif du screening phytochimique est la détection des différents métabolites secondaires dans les feuilles de *Ceratonia siliqua* L.

Ces tests sont réalisés sur les différents extraits (Ether de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, butanol, méthanol, aqueuse).

Tableau 6 : Résultats de screening phytochimique de six extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L.

Métabolite secondaire	Coloration	Témoins	Résultats	Présence /Absence
Flavonoïdes	Coloration rose-rouge ou jaune			EtPe : ++ Chf : +++ AcEt : ++ BuOH : ++ MeOH: +++ AQ : -
Alcaloïdes (test de Mayer)	Un précipité jaune			EtPe : +++ Chf : +++ AcEt : +++ BuOH : +++ MeOH: +++ AQ : +++
Sucres réducteurs	un précipité rouge brique			EtPe : +++ AcEt : +++ BuOH : +++ MeOH:+++ AQ : ++
Tanins vrais	Un précipité rouge			EtPe : ++ Chf : + AcEt : + BuOH: + MeOH: + AQ : +

<p>Anthocyanines</p>	<p>Coloration rouge</p>			<p>EtPe : +++ AcEt : +++ BuOH : ++ MeOH : +++ AQ : -</p>
<p>Quinones libre</p>	<p>Coloration jaune, rouge ou violet</p>			<p>EtPe : ++ Chf : ++ AcEt : +++ BuOH : +++ MeOH : +++ AQ : -</p>
<p>Flavonoïdes glycosides</p>	<p>Coloration jaune</p>			<p>EtPe : +++ AcEt : +++ BuOH : +++ MeOH : +++ AQ : -</p>
<p>Saponines</p>	<p>Une mousse d'eau (1cm)</p>			<p>EtPe : +++ AcEt : +++ BuOH : - MeOH : +++ AQ : ++</p>
<p>Stéroïdes</p>	<p>Coloration rouge</p>			<p>EtPe : +++ Chf : ++ AcEt : +++ BuOH : ++ MeOH : +++ AQ : +</p>

(+++) Réaction très positif : Présence confirmée

(++) Réaction positif : Présence modérée.

(+) Réaction plus au moins positive : Présence faible

(-) Réaction négative : Absences

L'analyse phytochimique des différents extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L montre une richesse relative en métabolites secondaires.

- l'extrait EtPe révèle la présence des alcaloïdes, des stéroïdes, sucre réducteurs, anthocyanines, et des saponines.
- L'extrait Chf, a montré la présence des alcaloïdes et des flavonoïdes.
- L'extrait AcEt montré une présence confirmée des tous les métabolites analysés.
- l'analyse d'extrait BuOH a révèle l'absence des saponines et une présence très faible des tanins vrais.
- l'extrait MeOH a révélé une présence très faible des tanins vrais alors qu'une présence importante des autres métabolites analysée.
- l'extrait aqueux révélé l'absence des flavonoïdes, alcaloïdes, flavonoïdes glycosides, anthocyanines.

III. Dosage

III.1. Dosage des polyphénols

La teneur en polyphénols totaux est déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965), selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller *et al*, 2010.

L'acide gallique est utilisée comme un standards, les résultats obtenue est présentée dans une courbe d'étalonnage dont l'équation : ($Y = 0,0034X + 0,1044$) avec $R^2 = 0,99$.

La teneur en polyphénols totaux est exprimée en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait.

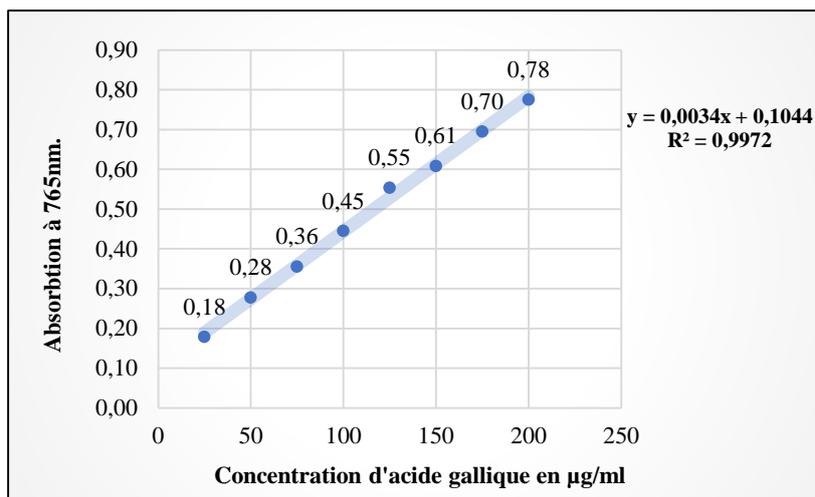


Figure 23 : Courbe d'étalonnage d'acide gallique

Tableau 7 : Teneurs en polyphénols totaux de six extraits.

Extrait	Polyphénols (mg EAG /g d'extrait)
EtPe	162,12 ±0,04
Chf	509,16±0,09
AcEt	56,24±0,04
BuOH	920,94±0,11
MeOH	162,1±0,02
AQ	379,76±0,04

Les valeurs sont les teneurs en polyphénols ± Ecart type.

A partir des résultats obtenues, nous avons observé des teneurs en polyphénols variées dans les différents extraits de notre plante, dont l'extrait BuOH présente la quantité la plus importante avec une teneur de 920,94 mg EAG/g d'extrait, cette teneur est proche à celle de l'extrait Chf 509,16 mg EAG/g, alors que l'extrait EtPe et MeOH présentent la même teneur en polyphénols (162,1 mg EAG/ g).

Une résultats trouvés par **Amessis, 2007** sur l'espèce *Retama sphaerocarpa*, famille de *Fabaceae* ont trouvé une teneurs des polyphénols inférieur a celle de notre résultats pour l'extrait MeOH (138,98±7,21 mgEAG/g d'extrait sec).

Comparativement au travail de **Madoui en 2018** sur l'espèce *Cytisus Triflorus*, (familles de *Fabaceae*) a trouvé des teneurs en polyphénols faibles a celle de nos résultats pour les extraits suivants MeOH (79,85±3,51µgEAG/mg d'extrait), AQ (53,89±0,10 µgEAG/mg d'extrait), Chf

(69,78±2,02µgEAG/mg d'extrait), EtPe (54,36±10,79µgEAG/mg d'extrait), AcEt (98,11± 2,02 µgEAG/mg d'extrait).

III.2. Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre $AlCl_3$ et les flavonoïdes, ayant une absorbance maximale à 430 nm.

La quercétine a été utilisée comme un standard, la courbe d'étalonnage ayant l'équation :

($Y=0,0048X$) avec $R^2= 0,997$.

La teneur en flavonoïdes est exprimée en mg équivalent d'acide quercétine par g d'extrait.

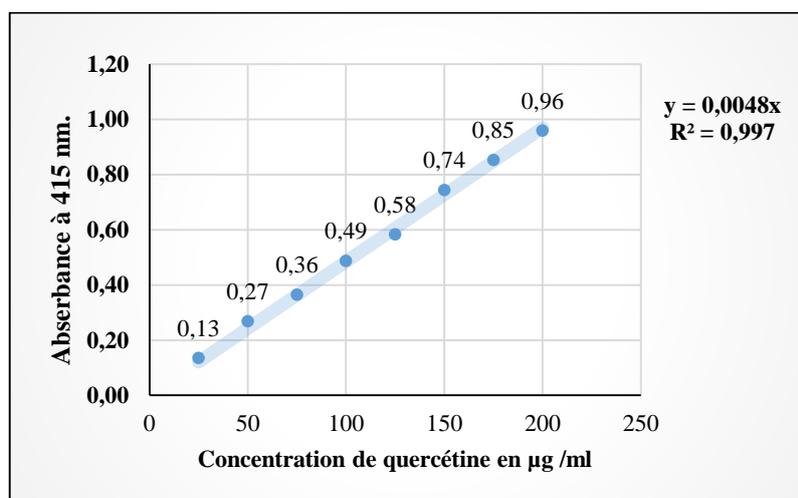


Figure 24 : Courbe d'étalonnage de quercétine.

Tableau 8 : Teneurs en flavonoïdes totaux de six extraits.

Extrait	Flavonoïdes (mg EQ /g d'extrait)
EtPe	37,5 ±0,01
Chf	129,16 ±0,01
AcEt	28 ±0,01
BuOH	387,5 ± 0,04
MeOH	58,32 ±0,01
AQ	41,66 ±0,04

Les valeurs sont les teneurs en flavonoïdes ± Ecart type

La quantification des teneurs en flavonoïdes des feuilles de *Ceratonia siliqua* L révèle que l'extrait BuOH contient la teneur en flavonoïdes la plus élevée égale 387,5mg EQ /g d'extrait suivi par l'extrait Chf a une teneur 129,16 mg EQ /g d'extrait.

Alors que les extraits MeOH, AQ et EtPe montrent des teneurs moyenne (58,32 mg EQ/g, 41,66mg EQ/g, 37,5mg EQ/g), et la teneur la plus bas est constaté par l'extrait AcEt (28 mg EQ/g).

Une autre étude réalisée par **Amessis, 2007** sur l'espèce *Retama sphaerocarpa*, (famille de **Fabaceae**) a trouvé une faible teneur on flavonoïdes de l'extrait méthanolique (11,47±0,55 mg EQ/g d'extrait sec) par rapport au nos extrait méthanolique (58,32 ±0,01 mg EQ /g d'extrait).

Madoui en 2018 a trouvé que l'espèce *Cytisus Triflorus*, (familles de **Fabaceae**) présente une faible teneur en flavonoïdes pour les extraits EtPe (3,77± 0,6 µgEQ/mg d'extrait), Chf (17,4 ± 0,466 µgEQ/mg d'extrait), AcEt (1,42±0,0086 µgEQ/mg d'extrait), MeOH (9,84±0,296 µgEQ/mg d'extrait), AQ (9,87±0,336 µgEQ/mg d'extrait) par rapport aux notre teneurs.

La différence en polyphénols peut être due au matériel végétal utilisée et la méthode d'extraction ainsi que l'environnement.

IV. Evaluation des activités antioxydantes

Six méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraites éther de pétrole (EtPe), chloroformique (Chf), acétate d'éthyle (AcEt), buthanolique (BuOH), méthanolique (MeOH), et aqueuse (AQ).

IV.1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire DPPH

Les profils d'activité anti-radicalaire obtenus révèlent que les extraits de notre plante possèdent une activité contre le radicale DPPH dépendant de la concentration de chaque extrait (diminution de la couleur violet et l'apparition de la couleur jaune)

L'activité antioxydante est exprimée en CI50 (la concentration efficace d'extrait qui cause la perte de 50% de l'activité de radical libre, ce dernière est déterminée graphiquement à partir de la courbe réalisée en fonction des concentrations des extraits et leurs pourcentage d'inhibition respectifs (figure 18, tableau 11).

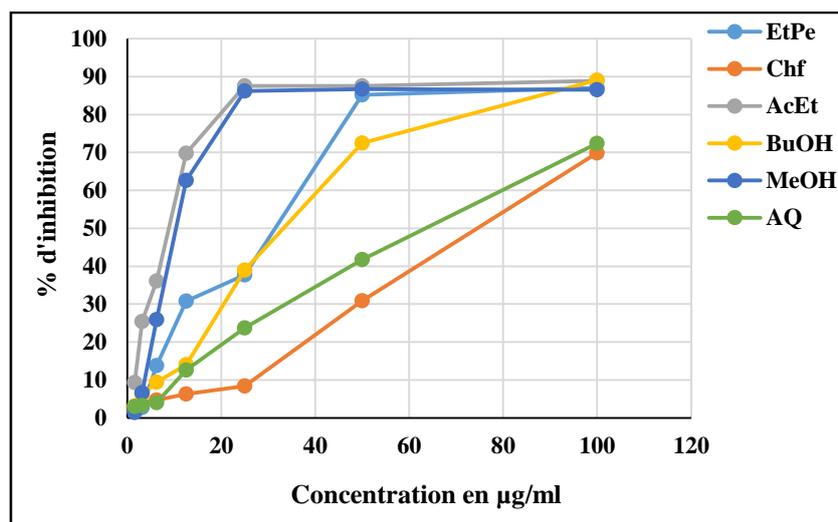


Figure 25 : Activité anti-radicalaire DPPH des extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L.

La comparaison de l'activité scavenger du radical DPPH des différents extraits et des standards (BHT et BHA) montre une activité anti-radicalaire dépendant de la concentration donc à chaque fois que la concentration des extraits augmente le pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH augmente.

L'extrait AcEt ainsi que l'extrait MeOH ont montré les activités les plus élevées avec de faibles concentrations par rapport aux autres extraits, dont pour 25 µg/ml le premier extrait atteint un pourcentage d'inhibition de 87.51% et l'autre atteint un pourcentage d'inhibition de 86.22% avec la même concentration, l'extrait Chf et l'extrait AQ ont présentés les plus faibles pourcentages d'inhibition (8.35% et 23.72% respectivement).

Tableau 9 : CI50 de six extraits et les deux standards BHA et BHT.

Extrait	CI50 en µg/ml
EtPe	29,11 ±0,13
Chf	75,08 ±0,06
AcEt	10,08 ±0,05
BuOH	34,36 ±0,03
MeOH	10,3 ± 0,03
AQ	73,08 ± 0,02
BHT	6,82 ± 0,49
BHA	7,29 ± 0,49

Les valeurs sont CI50 ± Ecart type.

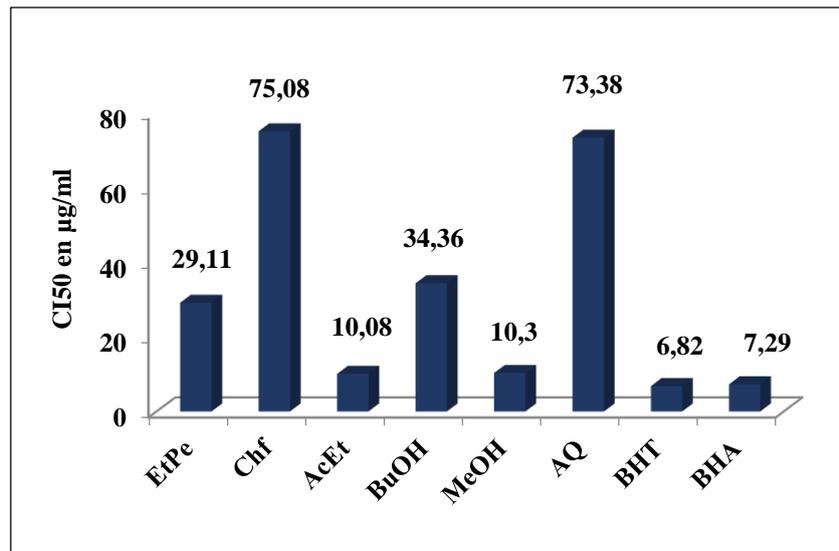


Figure 26 : Histogramme d'activité anti-radicalaire DPPH des extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L et des standards (BHT et BHA).

En, général, toutes les extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L ont provoqué une décoloration plus au moins différente de la solution DPPH, ceci prouve leur capacités antioxydante qui est exprimée par les valeurs CI50.

D'après les résultats obtenus par la figure 18, l'extrait AcEt et l'extrait MeOH présentent la meilleure activité anti-radicalaire avec des CI50 de l'ordre de 10.08 µg/ml et 10.3 µg/ml respectivement, cette activité est comparables aux standards BHT et BHA (6,82 µg/ml et 7,29 µg/ml), suivi par les fractions EtPe et BuOH (CI50 égale 29,11µg/ml, 34,36µg/ml) qui possèdent une activité antiradicalaire moins importante par rapport aux standards BHA et BHT.

Par contre, l'activité antiradicalaire la plus faible a été exprimée par les fractions Chf et AQ avec des valeurs CI50 plus élevées (75,08 µg/ml, 73.8 µg/ml la plus faible).

L'activité antioxydante de BHA et de BHT est significativement supérieure à celle obtenus par ces deux fractions.

L'activité antiradicalaire de notre extrait méthanolique est supérieure à celle obtenu par **Boukaabache et al, 2013** dans leur étude sur la plante *Genista quadriflora* de la même famille (fabaceae) dont CI50 égale 58,97µg/ml.

Cependant une autre étude réalisé par **Ghanmi en 2017** sur les feuilles de la même espèce a trouvé une activité anti radicalaire puissante avec des valeurs inférieure CI50 pour les fractions AcEt (0.6 µg/ml) et BuOH (1.4 µg/ml).

IV.2. Activité ABTS

Les courbes de pourcentage d'inhibition de chaque extrait est tracée en fonction de la concentration, pour ensuite évaluer l'activité antiradicalaire ABTS par la concentration d'inhibition CI50.

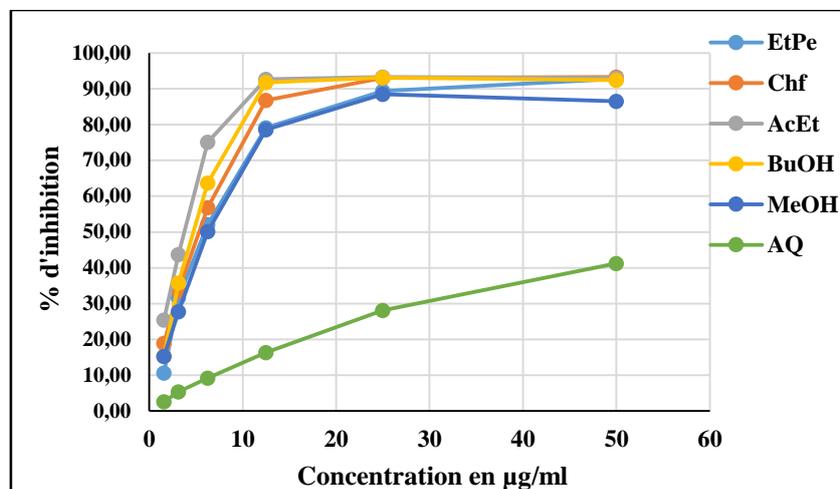


Figure 27 : Activité anti-radicalaire ABTS des extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L.

Tableau 10 : Concentration inhibitrice (CI50) de six extraits et les deux standards BHA et BHT.

Extrait	CI50 en µg /ml
EtPe	6.982 ± 0.01
Chf	6.015 ± 0.01
AcEt	4.303 ± 0.02
BuOH	5.615 ± 0.02
MeOH	7.098 ± 0.93
AQ	45.08 ± 0.93
BHT	1.59 ± 0.03
BHA	1.030 ± 0.01

Les valeurs sont CI50 ± Ecart type.

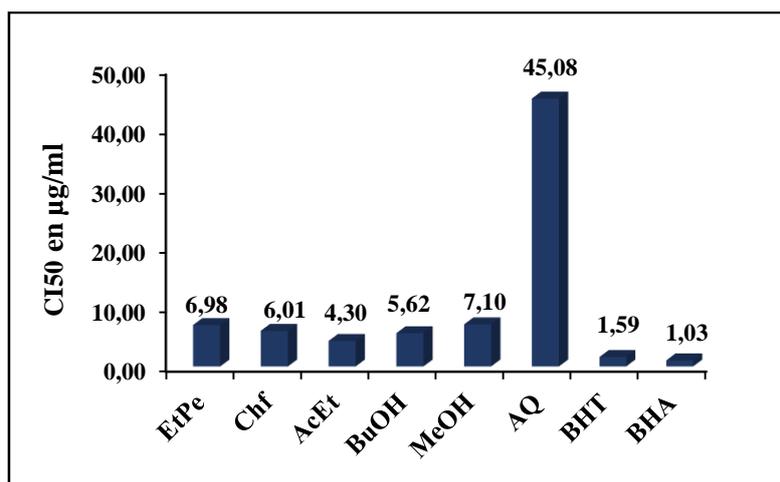


Figure 28 : Histogramme d'activité anti-radicalaire ABTS des extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L et des standards (BHT et BHA).

Les résultats obtenus par le test ABTS⁺ montré clairement que les extraits de notre plante, ont un très bon potentiel du radical ABTS⁺, dont parmi les six extraits l'extrait acétate d'éthyle et n-butanol représentent les valeurs CI50 les plus basses (CI50=4.30ug /ml et 5.61ug/ml respectivement) et donc l'activité anti-radicalaire la plus élevée.

Cependant cette activité est proche à celle des standards (BHT et BHA), suivi par l'extrait chloroformique, éther de pétrole, ainsi que l'extrait méthanolique qui possèdent des CI50 très proches (CI50= 6,036µg/ml, 98µg/ml et 7,09 µg/ml respectivement), donc ces fractions ont des activités antioxydants voisin.

L'extrait aqueuse présente une activité très faible avec un CI50 de l'ordre de 45.8 mg/ml par rapport aux standards BHT et BHA (CI50= 1.59±0.03 µg/ml et 1.03±00 µg/ml).

La fraction acétate d'éthyle et butanolique possèdent une bonne activité inhibitrice de radical ABTS⁺ par rapport aux autres extraits cette activité est due à la richesse de ces fraction en molécules polaires (les flavonoïdes et les polyphénols).

Les recherches bibliographiques effectuées nous ont pas permis de trouver des travaux réalisé sur la même espèce donc on a comparés nos résultats avec d'autre résultats obtenus par **Habibetni** en **2018** sur une espèce faisant partie de la famille des *Fabaceae*. Les extraits de l'espèce *S.juncenum* L, ont révélé pour le teste ABTS des valeurs CI50 de 52,74µg/ml pour l'extraits Chf et 23,49 µg/ml pour le BuOH et 42,02µg/ml pour AcEt. Nos extraits ont présenté la meilleur capacité antiradicalaire vis-à-vis de l'ABTS par rapport aux extrais de *S.junceuml*.

IV.3. La réduction du complexe Cuivre-Neocuproéne (CUPRAC méthode)

Les standards utilisés sont le BHA et le BHT, les résultats obtenus ont permis de tracer la courbe de pourcentage d'inhibition en fonction des différentes concentrations (figure 29)

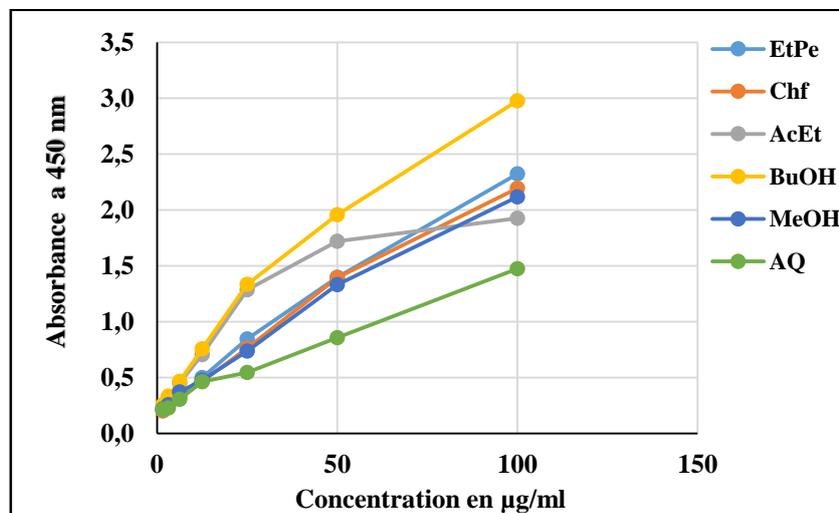


Figure 29 : Absorbance en fonction des différentes concentrations de six extraits.

D'après ces résultats nous observons que l'absorbance augmente en fonction de l'augmentation de la concentration utilisée.

Tableau 11 : Absorbance 0,5 de six extraits et les standards (BHA, BHT).

Extrait	A0,5 en µg/ml
EtPe	13.238 ±0.06
Chf	14.350 ±0.06
AcEt	7.636 ±0.04
BuOH	7.022 ±0.04
MeOH	14 ±0.07
AQ	22.833 ±0.11
BHT	8.33 ±0.87
BHA	2.24 ±0.19

A0, 5 : la concentration à l'absorbance 0,5.

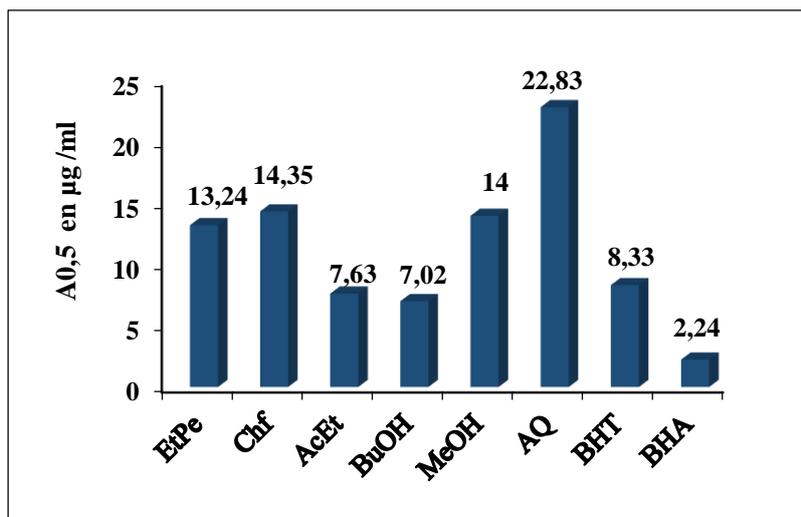


Figure 30 : Histogramme représentant la capacité antioxydante réductrice cuprique, les résultats obtenus sont comparés aux normes BHT et BHA.

L'extrait BuOH et AcEt ont montré une meilleure activité inhibitrice du CUPRAC avec des valeurs similaires et égale 7.63µg/ml et 7,63 µg/ml, en comparaison avec le standard BHT (A0.5=8.33 µg/ ml) ces fractions possèdent presque la même activité de BHT, alors une activité légèrement faible que de BHA avec un A0.5 de 2.24 µg/ ml.

Avec des absorbances égale 13.24 µg/ml, 14 µg/ml et 14.35 µg/ml, les trois extraits EtPe, MeOH et Chf représentent une activité inhibitrice comparable à celle du standard BHT mais 3 fois faible à celle de BHA.

Les fractions éther de pétrole, méthanolique et aqueuse possèdent des valeurs plus élevés d'A0.5 (13.23µg/ml, 14µg/ml et 22.83 µg/ml respectivement) présentent des faibles activités réductrice de cuivre par rapport aux autre extraits (l'activité de ces fraction est loin d'être comparé avec le standard BHA).

La fraction aqueuse a manifesté l'activité la plus faible avec une A 0,5 égale 22.83 µg/ml.

L'extrait BuOH qui présente la forte activité antioxydante possède la meilleur teneur on polyphénol.

Nos recherches bibliographiques ne nous ont pas permis de trouver des travaux réalisé dans la même condition, et sur les feuilles de la même espèce, donc on a comparé nos résultats avec les travaux de **Djehim en 2016** sur une espèce du genre *Genista* de la même famille des *Fabaceae*, cette plante présente pour le teste CUPRAC un A0.5 de 42.50 µg/ml pour l'extraits MeOH et 35.62µg/ml pour l'extraits Chf. Ce sont des valeurs d'A0.5 élevé par rapport à celle de nos extraits, donc les extraits de notre plante présentent la meilleure capacité réductrice du complexe neocupronine que celle des extraits de la plante du genre *Genista*.

IV.4. Phénanthroline

Les résultats de la capacité réductrice de fer mesuré par ce test sont déterminées graphiquement à partir de la courbe réalisé en fonction de l'absorbances des extraites et leur concentration (figure 31, tableau 12),

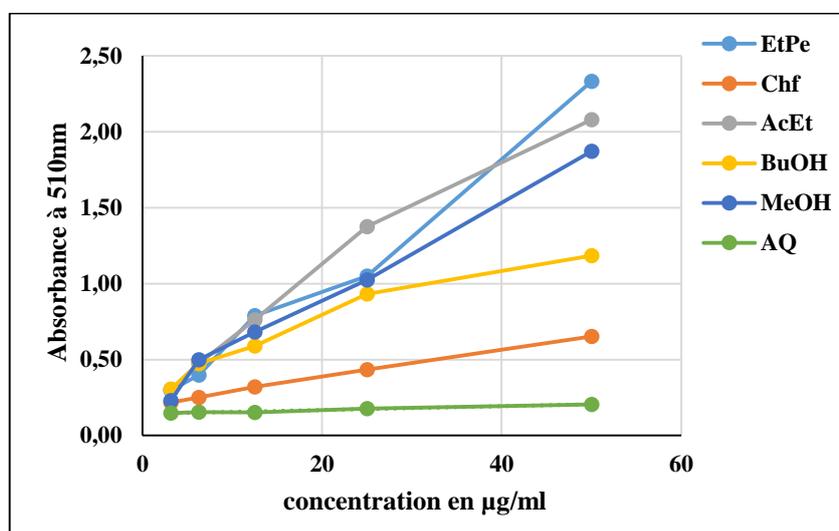


Figure 31 : Absorbances des extraits en fonction de leur concentration.

Tableau 12 : Absorbance 0,5 de six extraits et les standards.

Extrait	A0,5 en µg/ml
EtPe	8,25±0,12
Chf	33,08±0,02
AcEt	6,21±0,44
ButOH	8,50±0,08
MetOH	8,47±0,08
AQ	297±0,02
BHA	0,93±0,07
BHT	2,24±0,17

Les valeurs sont les absorbances $0,5 \pm$ Ecart type.

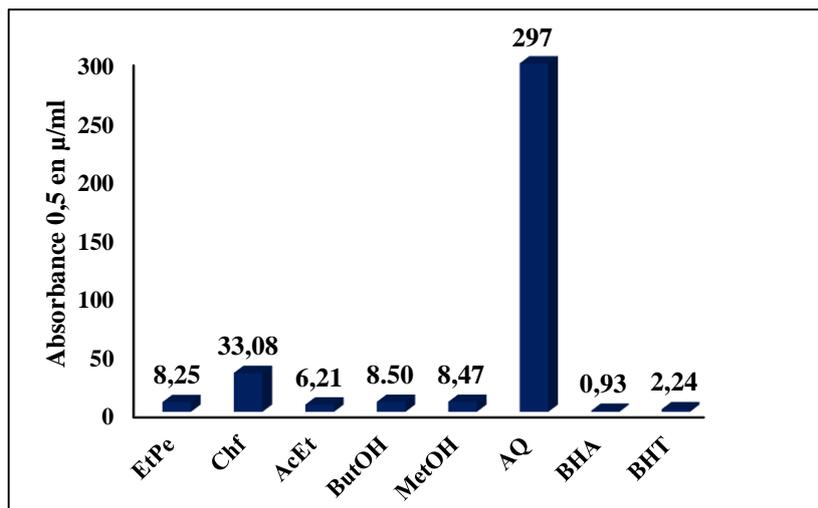


Figure 32 : Histogramme d'absorbance 0,5 de six extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L et des standards (BHA et BHT).

D'après les résultats obtenus on observe que la fraction AcEt possède la meilleure activité antioxydante avec une $A_{0,5}$ égale 6,21 $\mu\text{g/ml}$, elle est supérieure à celui de BHA et BHT ($A_{0,5} = 0,93 \mu\text{g/ml}$ et $2,24 \mu\text{g/ml}$)

Par ailleurs, les extraits MeOH, BuOH et EtPe indique des $A_{0,5}$ similaires et supérieures à celle de standard donc une activité légèrement faible.

L'extrait Chf a montré une $A_{0,5}$ supérieure aux valeurs des standards BHA et BHT donc une activité légèrement faible, alors que l'extrait AQ a une très faible activité réductrice de fer.

IV.5. Pouvoir réducteur

Dans notre travail, nous avons testé les différentes extraits des feuilles, les résultats obtenus nous ont permis de tracer des courbes de variation de l'absorbance en fonction de la concentration de chaque extrait.

D'après ces résultats, nous remarquons que la capacité de réduction du fer est proportionnelle à l'augmentation de la concentration pour tous les échantillons, cette capacité est estimée par la concentration inhibitrice (CI_{50}) qui correspond à une absorbance égale 0,5.

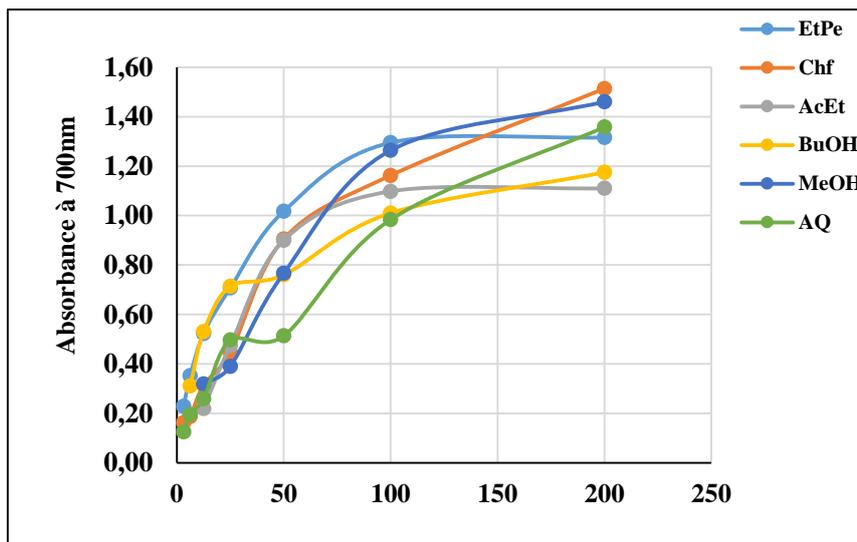


Figure 33 : Absorbances des extraits en fonction des concentrations.

Tableau 13 : Absorbance 0,5 de six extraits et le standard α - Tocophérol

Extrait	A0,5 en $\mu\text{g/ml}$
EtPe	4,01±0,10
Chf	32,11±0,06
AcEt	14,78±0,21
BuOH	0,18±0,31
MeOH	23,12±0,21
AQ	46,37±0,08
α - Tocophérol	34.93±2.38

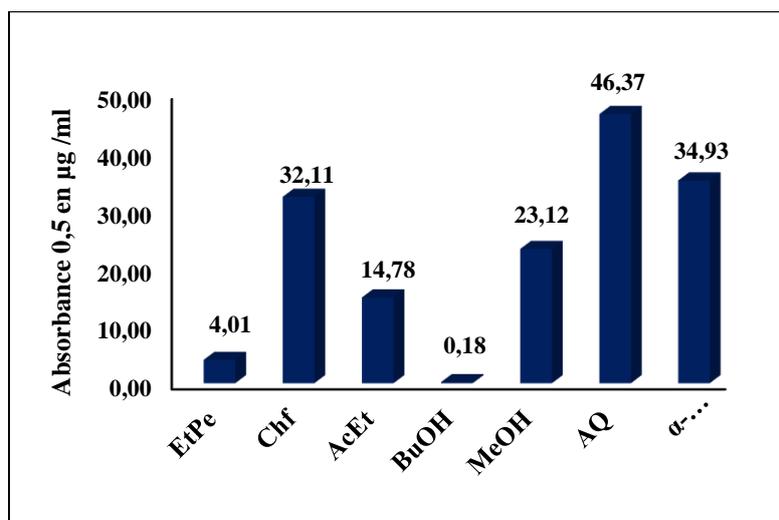


Figure 34 : Le pouvoir réducteur de six extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L et le standard.

D'après les résultats obtenus par la figure 34, l'extrait BuOH possède une excellente activité réductrice de fer avec un $A_{0,5}$ égale 0,18 $\mu\text{g/ml}$, cette valeur est importante plus faible que celles obtenues par tous les extraits et le standard qui à $A_{0,5}$ égale 34,93 $\mu\text{g/ml}$, l'extrait EtPe possède aussi une activité forte avec une $A_{0,5}=4,01 \mu\text{g/ml}$.

Les résultats des extraits MeOH, AcEt et Chf présentent des valeurs inférieures à celle de standard c'est-à-dire une activité réductrice de fer largement supérieur à celle de α - Tocophérol

Une étude réalisée par **Madoui, 2018** sur *Cytisus Triflorus*, (familles de *Fabaceae*) trouvé des valeurs d' $A_{0,5}$ supérieure à celle de nos résultats pour les extraits MeOH ($A_{0,5}= 460 \mu\text{g/ml}$), Chf ($A_{0,5}= 510 \mu\text{g/ml}$) et l'extrait AcEt ($A_{0,5}= 960 \mu\text{g/ml}$), donc possède une faible activité réductrice de fer.

IV.6. Piégeage de radical superoxyde par la méthode DMSO-alkalin

Les différents extraits de *Ceratonia siliqua* L'ont montré une bonne activité de piégeage du radical superoxyde (figure 35, tableau 14), cette activité est estimé par la concentration inhibitrice (CI_{50}), déterminée partir des graphes tracée par % d'inhibition en fonction de la concentration de différents extraits.

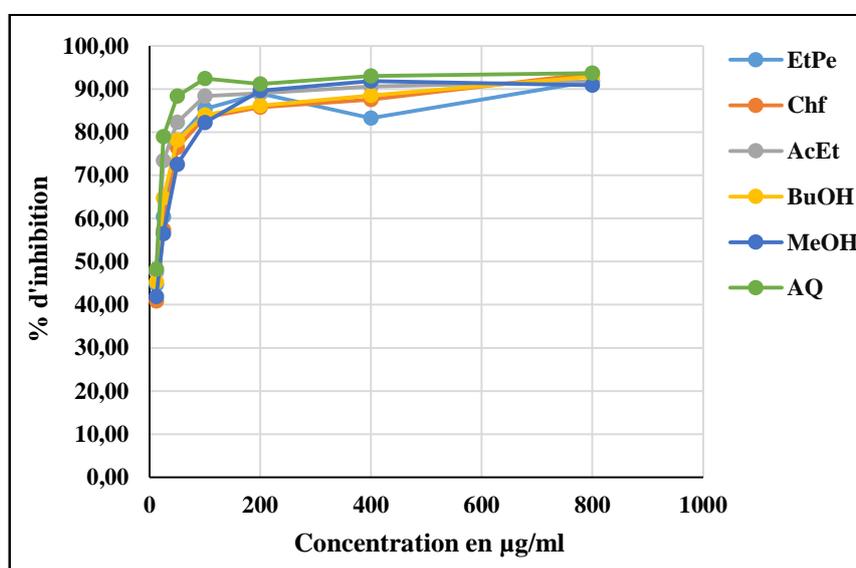


Figure 35 : Les % d'inhibition en fonction des concentrations pour les différents extraits.

Tableau 14 : CI50 de six extraits et les standards (acide tannique et α -Tocopherol).

Extrait	CI50 en $\mu\text{g/ml}$
EtPe	6.84 \pm 0.2
Chf	14.54 \pm 0.08
AcEt	8.11 \pm 0.12
BuOH	13.79 \pm 0.15
MeOH	15.85 \pm 0.05
AQ	NA
Acide tannique	<3.125
α -Tocopherol	<3.125

Les valeurs sont CI50 \pm Ecart type.

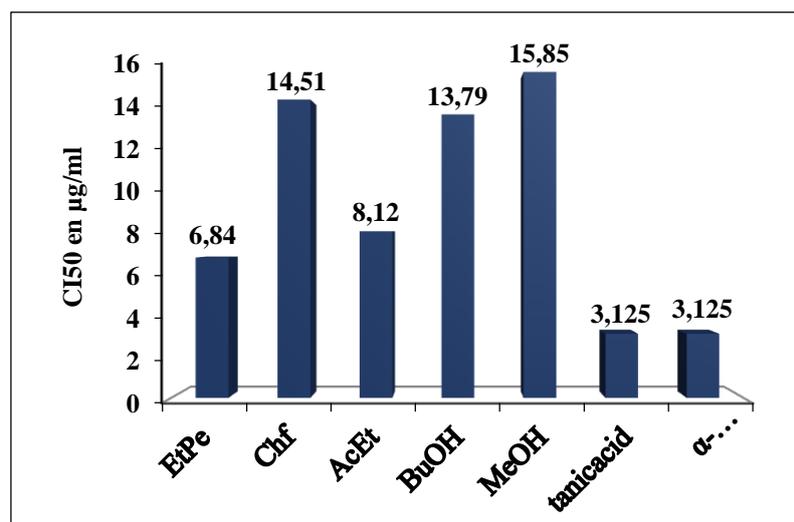


Figure 36 : Histogramme représente les CI50 pour l'activité superoxyde DMSO alcalin exprimé en $\mu\text{g/ml}$.

Les valeurs CI50 des extraits EtPe, AcEt, BuOH, Chf, MeOH étaient respectivement de 6,84 $\mu\text{g/ml}$, 8,12 $\mu\text{g/ml}$, 13,79 $\mu\text{g/ml}$, 14,51 $\mu\text{g/m}$, 15, 85 $\mu\text{g/ml}$. L'extrait EtPe et AcEt possèdent un effet de piègeur très important du superoxyde, il est comparable à l'activité antioxydante des standards acide tannique et α - tocophérol (CI50 égale 3,125 $\mu\text{g/ml}$), suivi par les fractions BuOH, Chf, MeOH qui ont presque la même activité anti radicalaire avec des valeurs CI50 très proches, cette activité est légèrement faible vis-à-vis les standards.

Dans ce teste en remarque que l'extrait aqueuse ne représente aucune activité contre ce radical.

Par comparaison, l'activité de notre extrait MeOH, AcEt, Chf, EtPe est la meilleure par rapport aux autres résultats obtenus par **Madoui en 2018** sur une plante de la même famille de *Fabaceae* (*Cytisus Triflorus*) qui représente des CI50 plus élevés (MeOH 36,35µg/ml, AcEt 38,15 µg/ml, Chf 182,17µg/ml et EtPe 432,76 µg/ml).

V. Evaluation d'activité enzymatique

L'activité anti-enzymatique a été évaluée par une seule méthode.

V.1. anti-acétylcholinestérase (anti-Alzheimer)

Les résultats d'inhibition d'acétylcholinestérase sont déterminés graphiquement à partir de la courbe réalisée en fonction des % d'inhibition des extraits et leur concentration selon la figure 37. Cette activité est estimée par la concentration inhibitrice (CI50).

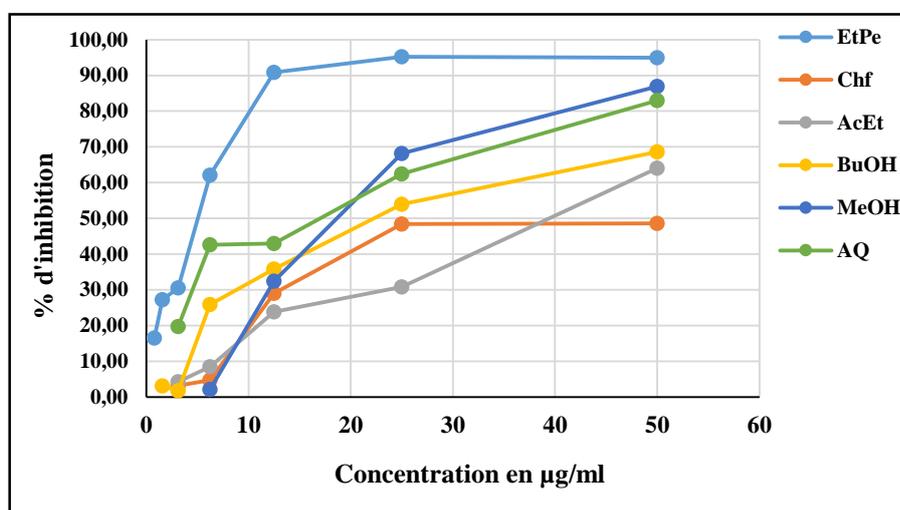


Figure 37 : L'activité anti-acétylcholinestérase de six extraits des feuilles de *Ceratonia siliqua* L.

Tableau 15 : CI50 de six extraits et le standard (Galantamine).

Extrait	CI50 en µg/ml
EtPe	7,75±0,12
Chf	42,69±0,16
AcEt	38,61±0,16
BuOH	30,22±0,12
MeOH	24,87±0,07
AQ	19,24±0,11
Galanthamine	6,27±1,15

Les valeurs sont CI50 ± Ecart type.

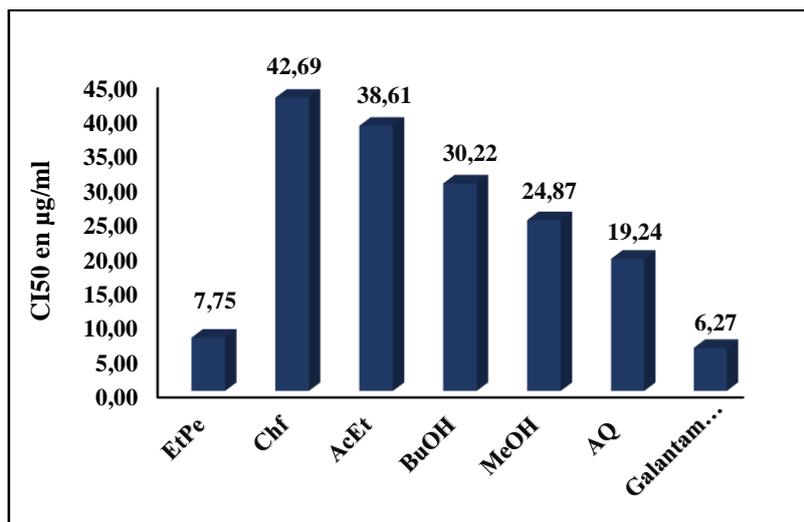


Figure 38 :CI50 pour l'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase de *Ceratonia siliqua* L exprimé en µg/ml.

Dans ce test, nous avons testé les six extraits de *Ceratonia siliqua* L, mais seul l'extrait EtPe à montre une excellente activité contre l'acétylcholinestérase avec CI50 égale 7,75µg/ml, cette activité est presque la même au standard galanthamine (CI50= 6,27 µg/ml).

L'extraits MeOH et AQ ont une activité inhibitrice légèrement faible avec une CI50 moyennement élève à celle de standard.

Les extraits BuOH, AcEt, Chf ont des CI50 proche et donc une faible activité anti acétylcholinestérase, cette activité est 5 fois inférieure à la capacité de galantanine.

Bien que nos extraits présentes une teneur en polyphénols plus élevée mais ils n'ont pas présente une activité inhibitrice d'AChE.

Conclusion

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche des molécules actives d'origine naturelle. Dans le présent travail, nous nous sommes intéressées au screening phytochimique, l'activité antioxydante ainsi que l'activité enzymatique (anti Alzheimer) des différents extraits des feuilles de la plante *Ceratonia siliqua L.*

De point de vue phytochimique, nous avons réalisé deux types d'extraction (liquide solide, pour obtenir l'extrait brute (extrait méthanolique), la deuxième extraction est de type liquide liquide) pour l'obtention de différentes fractions (EtPe, Chf, AcEt, BuOH, MeOH).

Le screening phytochimique réalisé a montré la richesse de notre plante en métabolites secondaires (la présence des Alcaloïdes, des stéroïdes, quinone libre, flavonoïdes glucosides, sucres réducteurs, saponines).

L'analyse quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux dans les six extraits de notre plante a révélé des teneurs considérables en métabolite dosés chez les fractions butanolique et chloroformique.

L'évaluation d'activité antioxydante par la méthode anti-radicalaire (DPPH) montre que l'extrait acétate d'éthyle et l'extrait méthanolique présentent la meilleure activité avec des valeurs CI50 identiques 10.08 et 10.3 µg/ml respectivement.

L'activité ABTS montre que l'extrait acétate d'éthyle et butanolique représentent une très bonne activité contre ce radical avec des valeurs CI50 faibles (4.30 µg /ml et 5.61 µg/ml respectivement).

L'extrait AcEt et butanolique des feuilles de *Ceratonia siliqua L* présentent également une meilleure activité réductrice de fer, qui est confirmée par le test pouvoir réducteur et phénanthroline.

L'activité réductrice de cuivre, est constatée chez l'extrait acétate d'éthyle et butanolique qui ont une CI50 similaire et inférieure à celle de BHT.

Parmi les six extraits on constate que l'extrait butanolique et éther de pétrole possèdent une bonne activité antioxydante due à sa richesse en composés phénoliques, et on constate aussi que pour la plus part des tests l'extrait méthanolique a révélé une activité antioxydante très faible peut être dû à des interférences entre les molécules.

Concernant l'activité anticholinestérase, l'extrait éther de pétrole représente une bonne capacité d'inhibition de cette enzyme.

Perspective

Du fait que les différents extraits des feuilles de notre plante *Ceratonia siliqua* L ont un potentiel antioxydant très important, d'autres recherches complémentaires sont nécessaires pour isolée et identifier les composés phénoliques responsables de l'activité antioxydant de notre espèce, et évaluer leur mode d'action.

L'ensemble de nos résultats obtenus *in vitro* constitue un point de départ pour passer aux études *in vivo* sur des modèles animaux.

Annexes

I. Criblage phytochimique

1. Préparation de la solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 1% :

1% C'est –à–dire dissoudre 1g d'hydroxyde de potassium dans 100ml d'eau distillée.

2. Préparation de liqueur de Fehling :

Solution A :

Dans un erlenmeyer de 250 ml : dissoudre 7g de sulfate de cuivre penta hydraté dans 100ml d'eau distillée

Solution B :

Dans un erlenmeyer de 250 ml : Dissoudre 34,6g de tetraté double de sodium et de potassium, 10 g d'hydroxyde de sodium dans 100mlk d'eau.

3. Préparation de Chlorure ferrique (FeCl₃) à 1% :

1g chlorure ferrique est dissoudre dans 100 ml d'eau distillée.

4. Préparation de réactif de Mayer :

Dissoudre 2,70 g de chlorure de Mercure (HgCl₂) +10 g d'iodure de potassium (KI) dans 20 ml d'eau distillée.

5. Préparation d'hydroxyle d'ammoniac (NH₄OH) à 30% :

Dissoudre 30 g d'hydroxyle d'ammoniac dans 100ml d'eau distillée.

II. Dosage

II.1. Dosage des flavonoïdes

1. Préparation des solutions :

Solution 1 :

Dissoudre 9,80 g de potassium d'acétate (CH₃COOK) dans 100 ml d'eau distillée.

Solution 2 :

Dissoudre 10 g de nitrate d'aluminium (Al(NO₃)₃, 9H₂O) dans 100ml d'eau distillée.

2. Préparation de l'extrait de plante :

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de l'eau distillée (ou Méthanol).

3. Préparation de la gamme d'étalon de la Quercetin :

Dissoudre 1 mg de la Quercetin dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution 0,2mg/ml S_m.

II.2. Dosage des polyphénols totaux

1. Préparation de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5% :

Dissoudre 7,5 g de Carbonate de sodium (Na_2CO_3) dans 100 ml d'eau distillé.

2. Préparation de Folin Ciocalteu (FCR) dilué 10 fois :

1ml de la solution FCR concentré (2M) est complété à 10ml avec l'eau distillée (9ml).

3. Préparation de la gamme d'étalon de l'acide gallique :

Dissoudre 0,5 mg de l'acide gallique dans 5 ml de méthanol pour obtenir la solution S_1 (0,2mg/ml).

4. Préparation de l'extrait de plante :

Une masse de 1 mg d'extrait est dissoute dans un volume de 1 ml de l'eau distillée (ou Méthanol).

III. La réduction du complexe cuivre-neocuproéne (CUPRAC méthode)

Préparation des solutions

Dissoudre 1,927 g Acétate d'ammonium (ACNH_4) dans 25 ml (H_2O) → S_1 transparent (PH=7.0)

Dissoudre 0,042625 g ($\text{Cu Cl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) dans 25 ml (H_2O) → S_2 bleu

Dissoudre 0,039 g (Neocupronin) + 25 ml (MeOH) → S_3

IV. Pouvoir réducteur

Dissoudre 1 g de potassium ferricyanide ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) dans 100 ml H_2O .

Dissoudre 1 g d'acide trichlorur acétique (TCA) dans 10 ml H_2O .

Dissoudre 0,1 g de chlorure ferrique (FeCl_3) dans 100 ml H_2O .

V. Super oxyde dismutase DMSO

Dissoudre 20 mg de NaOH dans 1 ml de H_2O et compléter par le DMSO à 100 ml.

Dissoudre 10 mg NBT dans 10 ml de l'eau distillé.

IV. Anti- cholinestérase (Alzheimer in-vitro)

Solution tampon :

Dissoudre 8,890 g de ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$) dans 500 ml de H_2O → V1

Dissoudrs 1,56 g de (NaH₂PO₄, 2H₂O) dans 100 ml de H₂O → V2

V1 +V2 → Solution Tampon .On ajoute du NaOH pour augmenter la valeur du PH.

1. DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)) Solution:

16 mg DTNB + 1 ml (PH=7) + 7, 5 mg NaHCO₃ + 1 ml (PH=7) + 2 ml (PH=7) + 4 ml (PH=8) →
volume total 8 ml

2. ACĪ (Acetylthiocholine iodide) substrate Solution:

Dissoudre 16 mg ACĪ et 4 ml H₂O et 4 ml de tampon (PH =8)

Préparation d'enzymes :

3. AChE Solution :

Dissoudre 0,2 mg AChE et 4 ml de tampon (PH=8) pour donner la solution A.

Mettre 20 µl de la solution A dans 20 eppendorf.

On prend un seul eppendorf qui contient 20 µl de la solution A et on ajoute 3 ml de PH = 8, contrôlé
l'absorbance à 412 nm

Tableau : % d'inhibition pour le test DPPH.

[µg/ml]	EtPe	Chf	AcEt	BuOH	MeOH	AQ
100	87,01	69,81	88,93	89,02	86,50	72,35
50	85,17	30,89	87,51	72,46	86,68	41,75
25	37,72	8,36	87,53	38,91	86,22	23,73
12,5	30,81	6,25	69,74	13,99	62,61	12,57
6,25	13,76	4,66	36,06	9,41	25,89	3,99
3,125	2,73	3,60	25,40	6,12	6,65	3,27
1,5625	1,76	2,12	9,32	3,09	1,42	2,99

Tableau : % d'inhibition pour le test ABTS.

[µg/ml]	EtPe	Chf	AcEt	BuOH	MeOH	AQ
50	92,48	93,04	93,26	93,30	90,34	56,52
25	92,80	93,29	93,05	92,43	86,51	41,25
12,5	89,40	93,09	93,31	93,15	88,45	28,07
6,25	79,10	86,83	92,70	91,81	78,62	16,30
3,125	52,11	56,84	75,11	63,74	50,12	9,16
1,5625	31,70	33,63	43,75	35,81	27,78	5,36
0,78125	10,66	18,94	25,39	15,23	15,25	2,62

Tableau : % d'inhibition pour le test DMSO.

[µg/ml]	EtPe	Chf	AcEt	BuOH	MeOH	AQ
800	91,83	93,58	91,74	92,89	90,88	93,64
400	83,25	87,54	90,57	88,53	91,85	92,98
200	88,94	85,73	89,01	86,13	89,65	91,17
100	85,41	83,41	88,38	84,01	82,18	92,39
50	78,13	76,42	82,28	78,13	72,49	88,37
25	60,35	57,33	73,38	64,78	56,44	78,98
12,5	44,72	40,84	47,61	45,27	41,88	48,24

Tableau : Les absorbance des extraits et les concentrations de test phénanthroline.

[µg/ml]	EtPe	Chf	AcEt	BuOH	MeOH	AQ
50	2,33	0,65	3,09	1,19	1,87	0,21
25	1,05	0,43	2,08	0,93	1,02	0,18
12,5	0,79	0,32	1,38	0,59	0,68	0,15
6,25	0,40	0,25	0,76	0,47	0,50	0,15
3,125	0,30	0,22	0,47	0,31	0,23	0,15
1.5625	0,24	0,18	0,30	0,23	0,22	0,16
0,7812	0,21	0,18	0,25	0,22	0,23	0,31

Tableau : Les absorbance des extraits et les concentrations de test pouvoir réducteur.

[µg/ml]	EtPe	Chf	AcEt	BuOH	MeOH	AQ
200	1,32	1,51	1,86	1,24	1,60	1,36
100	1,29	1,16	1,22	1,17	1,46	0,98
50	1,02	0,91	1,11	1,01	1,55	0,51
25	0,71	0,45	1,10	0,76	1,26	0,50
12,5	0,52	0,32	0,90	0,71	0,77	0,26
6,25	0,35	0,19	0,47	0,53	0,39	0,20
3,125	0,23	0,16	0,22	0,31	0,32	0,13

Tableau : % d'inhibition pour le test AChE

[µg/ml]	EtPe	Chf	AcEt	BuOH	MeOH	AQ
50	94,96	48,56	64,06	68,60	86,90	82,99
25	95,21	48,44	30,79	53,98	68,20	62,47
12,5	90,82	29,05	23,79	35,83	32,43	42,97
6,25	62,07	4,71	8,45	25,84	2,08	42,63
3,125	30,54	3,16	4,25	1,76	-50,85	19,73
1,5625	27,21	-3,53	-4,62	3,07	-75,68	-13,78
0,78125	16,48	-1,32	-5,52	-11,35	-34,64	-6,69

Référence

Bibliographiques

Abdullatif Azab, (2017). CAROB (*Ceratonia siliqua*): health, medicine and chemistry, *Vol (6)*, 456-469.

Aboura Ikram, (2018). Effet anti inflammatoire et anti obésité des extraits de feuilles de caroube (*ceratonia siliqua*) et cladode de figuier de barbarie (*opuntia ficus indica*) .thèse doctorat, université de Telemcen, p79.

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

Akroum Souâd, (2011). Etude analytique et biologique des flavonoïdes naturels, Thèse pour l'obtention du diplôme de Doctorat en science à Université Mentouri Constantine 1, p14-34.

Alain Favier, (2003). Le stress oxydant (l'intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique), *L'actualité Chimique*, 108-115.

Amrouche Aïcha et Yaya Koko, (2017). Teneur en composés phénolique et activité antioxydante d'extrait aqueux de feuilles de *Moringa Oleifera*, Mémoire de fin de cycle pour obtenir le diplôme de Master, Université de Bejaïa, p9-10.

Anísio Francisco Soares, (2005). Effets du stress oxydant sur le fonctionnement des adipocytes et prostaglandine, Thèse doctorat. Ecole doctorale interdisciplinaire sciences-santé.

Anne-Sophie Limonier, (2018). La phytothérapie de demain : les plantes médicinales au cœur de la pharmacie, Thèse pour l'obtention le diplôme du Doctorat en pharmacie, p 20.

Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., Karademir, S.E, (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.* Vol (52), 7970–7981.

Ayoub Bensakhria, (2018). Toxicologie général-Le Stress Oxydatif, *ReserchGate*, 70-86.

Battle I. et Tous J., (1997). « Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops». 17. Institut of plant Genetic and crops Plant Research. Gatersleben/ International Plant Ressources Institut. Rome.Italy. p97.

Beddou Fawzia, (2015). Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes médicinales sahariennes *Rumex Vesicarius L.* et *Anvilea radiata Coss.* et Dur, Thèse de doctorat en Biologie cellulaire et biochimie.

Belaidi Nada, Boubendir kenza, (2018). Evaluation de l'activité antioxydant de l'espèce *Artemisia absinthium*, Mémoire présenté pour l'obtenir le diplôme de Master Université Frère Mentouri constantine 1 p13.

Belyagoubi Née Benhammo Nabila, (2011). Activité antioxydant des extraits des composés phénolique de dix plantes médicinales de l'ouest et du sud-ouest Algérien, Thèse pour l'obtention d'un doctorat en Biologie, p10.

Benaissa Bouguerne, (2012). Conception et synthèse de dérivés phénolique hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologique vis-à-vis des maladies cardiovasculaires (athérosclérose), Thèse pour l'obtention le garde de Doctorat de l'université de Toulouse, p15.

Benamar benmahioul, Meriem k, Harch et Florence D, (2011). Une espèce à usage multiple, *forêt méditerranéenne*.51-58.

Bennamara Fatima Zohra, (2017). Stress oxydant Et pathologies humaines, Thèse de doctorat, Université Mohammed V-rabat.

Bengurba Adlen, (2008). Etude physiologique et de la phase botanique de l'espèce *Inula crithmoides L*, Mémoire pour l'obtenir le garde de magister Université Frère Mentouri Constantine 1, p 5-8-14.

Benkhaldi Hasiba, (2013). Détermination de l'activité antioxydante des polyphénols du Caroubier (*Cératonia siliqua*) de la région de Tlemcen, En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie, Université Abou Bekr Belkaid, p 12.

Benmansourn abahat ep Djoudi, (2016). Etude des activités antioxydants et antibactériennes de *l'Artemisia judaïca L*. par les composés du métabolisme secondaire, Thèse pour l'obtention le Diplôme de Doctorat En science à Université Abou-Bakr-Belkaid Tlemcen, p45.

Bensouici Chawki., (2015). Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes du genre *Ssdum (Crassulaceae)*, Thèse pour l'obtention le diplôme du Doctorat en Sciences en Chimie organique, p77-108.

Bidié A, N'Guessan BB, Yapo AF, Guessan JD et Djaman AJ, (2011). Activités antioxydantes de dix plantes médicinales de la pharmacopée ivoirienne. *Science et nature*, Vol (8) :1-11.

Biner. B. Gubbuk. H; Karhan. M. ; Aksu. M. ; Pekmezci. M, (2007). Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua L.*) in Turkey, *Food Chemistry*. P1453-1455.

Blandine Garait, (2006). Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeux (hyperoxie) et effet de la GliSODin, Thèse pour l'obtenir le garde de Docteur de l'Université Joseph Fourier, p 24.

Blois M.S, (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. *Nature*, Vol (4617): 1119-1200.

Boubekri Chérifa, (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques Thèse pour l'obtention du Doctorat en science, Université Mohamad Khider Biskra, p19-45.

Boudjouref Mourad, (2011). Etude de l'activité antioxydant et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris.L*, p36.

- Boukaabache R, Boubekri N, Boumaza O, Mekkiou R, Seghiri R, Sarri D, Zama D, Benayache F, Benayache S, (2013).** Phytochemical study of ethyl acetate extract and antioxidant activity of *Genistaquadriflora* Munby (Fabaceae), *Der Pharmacia Lettre*, Vol (5) :56-59.
- Carole Barus, (2008).** Etude électrophorétique de molécules antioxydants et leur association en milieu homogène et biphasique- Application aux produits dermocosmetiques, Thèse pour l'obtention du Doctorat de l'Université de Toulouse, P19.
- Chistelle, Koechlin-Ramonatxo, (2006).** Oxygène stress oxydant et supplémentation antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires, *Nutrition clinique et métabolisme* Vol (20) :165-77.
- Clementine Poisson, (2013).** Rôle de stress oxydant au niveau hépatique et rénal dans la toxicité de l'uranium après exposition chronique, Thèse de Doctorat Université Paris-Sud 11, P123.
- Cowan M.M, (1999).** Plant Product des antimicrobial agents, *Clinical microbiology reviews*, Vol (4) : 564-570.
- Cronquist. A, (1981).** An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press p42.
- Custódio, L, Escapa, A. L., Fernandes, E., Fajardo, A., Aligué, R., Alberício, F., Romano, A, (2011).** In vitro cytotoxic effects and apoptosis induction by a methanol leaf extract of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol (5), 1987–1996.
- Djefjel Hana Latifa, (2017).** Contribution à l'étude phytochimique de quelques métabolites secondaires (tanins, flavonoïdes, alcaloïdes) du calice de *Carlina acaulis* de la région de Tlemcen, Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie, Université Aboubekr BelKaid de Tlemcen, p13.
- Djehim Hanène, (2016).** Etude phytochimique et biologique d'une plante médicinale Algérienne du Genre *Genista* (Fabaceae), mémoire de master, Université des Frères Mentouri Constantine 1. p68.
- Dllali S, Aloui F, Selmi H, Sebei H, (2018).** Comparison of the chemical composition and the antioxidant activity of the leaves of Carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) collected in three sites of Djebel Zaghouan (Tunisia). *Journal of new science Agriculture and Biotechnology* , Vol (21), 3429-3438.
- Dohou. N, Yamni. K , Gmira. N, Idrissi Hassani. L.M, (2003).** Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine Thymelaealdehydoïdes, *Bull. Soc. Bordauy*, p142, 61-78.
- Duyckaerts, C., Colle, M. A., Delatour, B. & Hauw, J.-J. (2002).** Neuropathologie de la maladie d'Alzheimer. In C. Duyckaerts & F. Pasquier (Eds.), *Démences* (pp. 127-144). Paris.

Ekkiou Ratiba, (2015). Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires d'espèce du Genre *Genista Fabaceae* : G.Saharae, G.Forex, Thèse pour l'obtention le diplôme du Doctorat d'Etat en Chimie organique Université Frère Mentouri Constantine 1, p34.

El Bouzdoudi B, Saïdi R, Embarch K, El Mzibri M, Nejjar El Ansari Z, El Kbiach M, Badoc A, Patrick M, Lamarti A, (2017). Mineral composition of mature carob (*Ceratonia siliqua L.*), *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, Vol (7): 91-103.

Elizabeth. K and M.N.A. Rao, (1990). Oxygen radical scavenging activity of curcumin, *Int. J. Pharm.* Vol (58), 237–240.

El kahkahir M, Moustaine M, Bachir S, Lemrharia A, Zouhir R, Aitchitt M, Errkhi R, (2016). Technical sheet on the culture carob tree (*ceratonia siliqua L.*) in morocco.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherston, R.M., (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* Vol (7), 88–95.

Emiline Lapre, (2010). Maladie d'alzheimer et thérapie non médicamenteuse : évaluation de la stimulation cognitive et de l'activité physique sur le fonctionnement exécutif. Thèse doctorat, Université Victor Segalen Bordeaux 2, p25.

Fadel, F., Fattouch, S., Tahrouch, S., Lahmar, R., Benddou, A., Hatimi, A., (2011). The phenolic compounds of *Ceratonia siliqua* pulps and seeds. *J. Mater. Environ. Sci.*, Vol (2), 285-292.

François Nsemi muanda, (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques, Thèse doctorat, Université Paul Verlaine-metz.

Gaouar Naila épouse Borsali, (2011). Etude de la valeur nutritive de la caroube de différentes variétés Algériennes, thèse en vue de l'obtention du diplôme de Magister en agronomie, université abou bekr belkaid- Tlemcen.

Gisèle Etame-loe, charles christian ngoule, berthe mbome1, catherine kidik pouka, jean pierre ngene, jacques yinyang, cécile okalla ebongue, guy pascal ngaba, siegfried didier dibong, (2018), Contribution à l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans le département du Lom et Djerem (Est, Cameroun). *Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol.(35), 5560-5578.

Gérard Debuigne et Francois Couplan, (1852). Petit Larousse des plantes Médicinales, p6-7.

Ghanemi Fatima zohra, (2017). Activités apoptotique et chimio-préventive des polyphénols de feuilles de caroube (*Ceratonia siliqua L.*) sur les cellules cancéreuses du côlon, Thèse doctorat, université Tlemcen.

Gisèle Etame-loe, Charles Christian Ngoule, Berthe Mbome, Catherine Kidik Pouka, Jean Pierre Ngene, Jacques Yinyang, Cécile Okalla Ebongue, Guy Pascal Ngaba, Siegfried Didier Dibong, (2018). Contribution à l'étude des plantes médicinales et leurs utilisations traditionnelles dans le département du Lom et Djerem (Est, Cameroun). *Journal of Animal & Plant Sciences*, Vol (35), 5560-5578.

Gseyra Nadia, (2006). Etude photochimique de deux espèces pastorales : *Artemisia herba alba* Asso et *Peganum harmala*, et l'évaluation de la toxicité de *Peganum harmala* pendant son cycle phénologique, Thèse pour l'obtention du Doctorat en science Université Mohamed Premier, p31.

Guillouty Amandine, (2016). Plantes médicinales et antioxydants, Thèse pour l'obtention le diplôme de docteur en pharmacie, Université de Toulouse III Paul Sabatier.

Habibatni Sofiane, (2018). Etude phytochimique et pharmacologique de deux plantes appartenant à la famille des Astéraceae et Fabaceae, thèse de doctorat, université des Frères Mentouri – Constantine 1. p60.

Haddarah Amira, (2013). L'influence des cultivars sur les propriétés fonctionnelles de la caroube libanaise (thèse en cotutelle université libanaise et l'université lorraine France). p 13, 12, 30.

Haleng, J. Pincemail, J.O. Defraigne, C. Charlier, J.P. Chapelle, (2007). Le stress oxydant, *Rev Med Liege*; Vol (62) 628-638.

Hopkins William G, (2003). Physiologie végétale, 2ème édition. Editeur De Boeck P267-276.

Iqbal Hassain, Moneeb. Ur Rehman Khattak : Riazullah, Zia Muhammad, Nacem Khala, Farhat Ali Khan, Zahoor Ullah and Sajjad Haider, (2011). phytochimical screening and antimicrobial activities of selected medicinal plants of Khyberpakhtunkhwa Pakistan. *African Journal of pharmacy and Pharmacology* Vol. (5), p746-750.

Irfan Hamid and Khalid Hussain Janbaz, (2017). Ethnopharmacological basis for antispasmodic, antidiarrheal and antiemetic activities of *Ceratonia siliqua* pods, Bangladesh. *J Pharmacol*, Vol (12): 384-392.

Jean-François Mort-Gaudry et al, (2017). Biologie Végétale Nutrition et métabolisme, p224.

Kaderi M., Ben Hamouda G., Zaeir H., Hanana M. et Hamrouni L, (2014). Notes Ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Ceratonia siliqua* (L.). *Phytothérapie*, p5.

Kaïs R, Slimen Selmi, Dhekra G, Mohamed A, Bruno Etod, j, Hichem Sa, Lamjed M, (2017). Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonia siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 522–528.

Karumi, Y., Onyeyili, P.A., Oyugbuaja, V.O, (2004). Identification Of active principals of M.Balsamia (Balsam Apple) leaf extract. *Journal of Medicinal Science*, Vol (4), 179-182.

Kessoum Samia, (2014). Activité antioxydant des polyphénols d'*Artemisia herbalba*, Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie Université Abderrahmane Mira de Bejaia, p13-14.

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

Koffi N, Beugré K, Guédé N.Z, Dossahoua T, Laurent A, (2009). Screening phytochimique de quelque plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Kroubou (Agboville, Côté-d'Ivoire), *Sciences et Nature*, P1-15.

Lachkar N, Al-Sobarry M, El Hajaji H, Lamkinsi T, Lachkar M, Yahia Cherrah Y, and Alaoui K, (2016). Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Ceratonia siliqua L.* methanol Barks extract, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. Vol (8) 202-210.

Laghari, A.Q., Memon, S., Nelofar, A., et Laghari, A.H, (2013). Tecomella undulata G. Don: ariche source of flavonoids. *Industrial crop and products*, Vol (43), 213-217.

Lopez G V, Batthyany C, Blanco F, Botti H, Trostchansky A, Migliaro E, Radi R, Gonzalez M, Cerecetto H, and Rubbo H, (2005). Design, synthesis and biological characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs. *Bioorg. Med. Chem.* Vol (13): 5787–5796.

Madi Aicha, (2018). Caractérisation photochimique et évaluation des activités biologique de *Cleome arabica*, Thèse de Doctorat en Science, Université Frère Mentouri Constantine 1, p21.

Madoui Soraya, (2018). Activités Biologiques Des Extraits De *Cytisus Triflorus*, Université Ferhat Abbas Sétif 1, p53.

Mansour Sadia, (2015). Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales : *Artemisia absinthium L, Artemisia herba alba Asso et Hypericum scarboides* –Etude in vivo-, Thèse pour l'obtention du Doctorat en science Université d'Oran Mohamed Boudiaf, p19.

Marfek A, (2003). Radiolyse gamma des flavonoides. Etude de leur réactivité avec les radicaux libres issus des alcools : formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges.

Merghem Rachid, (2009). Eléments de biochimie vegetale Vol (16) ,107-95.

Messai Laid, (2011). Etude phytochimique d'une plante médicinale l'est algérien (*artemisia herba alba*), (thèse doctorat, université Mentouri Constantine).

- Mutero A, fournier D, (1992).**Poste- translational modification of Drosophila acetylcholinesterase. In vitro mutagenesis and expression in Xenopus oocytes.*J.Biol Chem.* Vol (267), 1695-1700.
- Metrouh hassiba épouse Amir, (2009).** Etude du pouvoir antioxydant de *Ceratonia siliqua* : Effets de la température et du solvant d'extraction, Mémoire En vue de l'obtention du Diplôme de magiste ren Biologie, universite abderrahmane mira bejaia.
- Mohammed Saleem Ali, Shtayeh Rana, Majed Jamous, SalamYoucef Abu Zaitoun and Iman Basem Qasem, (2014).** In-vitro screening of acetylcholinestrse inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the traitement of Alzheimer's disease, *Functional Foods in Heath and Disease*, 4(9) :381-400.
- Mohammed Yahya Hadi, Imad Hadi Hameed, Israa Adnan Ibraheam. (2017).** *Ceratonia siliqua*: Characterization, *Pharmaceutical Products and Analysis of Bioactive Compounds*, 1827-1831.
- Mokhtari M Ph.D, Sharifi E MSc, Azadian Sh , MSc, (2012).** The effects of hydro alcoholic extract of *Ceratonia siliqua L.* seeds on pituitary – testis Hormones and spermatogenesis in rat, *Advances in Environmental Biology*, Vol (6): 2778-2783.
- Makkiou ratiba, (2015).** Recherche et determination structural des metabolites secondaires d'espèces de genre *Genista Fabaceae* : *G.Saharae*, *G.Ferox*, Thèse pour l'obtention de diplome de Doctorat, p34.
- Mladinka P, Zatloukalova L, Filipsky T, and Hrdina R, (2010).** Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxydant activity, *Free Radical Biology and Medicine*, Vol (49): 963-975.
- Monique Gardés-Albert, D Bonnefont-Rousselot, Z Abedinzadeh, and D Jore, (2003).** Espèce réactive de l'oxygène. Comment l'oxygène Peut-IL Devenir Toxique ? *L'actualité chimique* Vol (269) : 91-96.
- Mousa A. Qasem, Mohamed Ibrahim Noordin, Aditya Arya,Abdulsamad Alsalahi and Soher Nagi Jayash(2018).** Evaluation of the glyceic effect of *Ceratonia siliqua* pods (Carob) on astreptozotocin-nicotinamide induced diabetic rat model.
- Mpondo, E., Dibong, S.D, (2012).** Traditional knowledge on medicinal plants use by ethnic communities in Douala, Cameroon. *European Journal of Medicinal Plants*, vol. 2, pp. 159-176.

Ronald.M ST-Louis, (2011). Implication des espèces réactives de l'oxygène dans le contrôle central de l'osmorégulation, Thèse de Doctorat de L'université Paris VI Pierre et Marie Curie, p 35-36.

Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., V. Böhm V, (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, Vol (43): 992–999.

Nadia Y.A. Attia. Ibrahim M. Abd El - Aleem¹; Kareem M.K. El Tobgy² and Hala F. Mohamed,(2014). Biochemical Studies on Carob, Vol (52), 469–480.

Najjaa Hanen, Sami Zouari, Ingrid Arnault, Jacques Auger, EmnaAmmar et Mohamed Neffati, (2011), Différences et similitudes des métabolites secondaires Chez deux espèces du genre *Allium*, *Allium roseum* L. et *Allium ampeloprasuml*. Vol (158), 111-123.

Park, Y.S., Jung, S.T., Kang, S.G., Delgado-Licon, E., Katrich, E., Tashma, Z., Trakhtenberg, S., Gorinstein, S., (2006). Effect of ethylene treatment on kiwifruit bioactivity.*Plant Foods Hum. Nutr.* Vol (61), 151–156.

Parejo I., Viladomat F .,Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlarge N., Burillo J., Codina C, (2002). Comparaison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non distilled Mediterranean herb and aromatic plante.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationde colorization assay. *Free Radical Bio. Med.* Vol (26), 1231–1237.

René Heller, Robert Esnault, Claude Lance, (2011), Physiologie végétale, 288.

Rezaire, (2012). Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien *Oenocarpus bataua* (patawa), Thèse pour le doctorat en phytochimie, Université des Antilles et de la Guyane, p 51-52.

Saffidine karima, (2015). Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L et de *Plantage major* L, Thèse pout l'obtention du diplôme de Doctorat en Science, Université Farhat Abbas Sétif, p9-15.

Sahabi bakasso, (2009). Etude phytochimique et potentialités biologique de cinq espèces d'indigofera (fabaceae) utilises en médecine traductionnelles au Burkina Faso, Thèse unique, université Ouagadougou, p1.

Sarni-Manchado et Cheynier, (2006). Les polyphénols en agroalimentaire, Editions TEC et DOC, Paris, P 2-9.

Sebail Hichem, Souli Abdelaziz, Chehimi1 Latifa, Rtibi Kais, Amri Mohamed, El-Benna Jamel and Sakly Mohsen, (2013). In vitro and in vivo antioxidant properties of Tunisian carobe (*Ceratonia siliqua* L), *Journal of Medicinal Plants Research* Vol (7) pp. 85-90.

Sébastien Gillet, (2018). Etude des relations entre la structure des galactomannane de caroube et leurs propriétés fonctionnelles (communauté française de Belgique, université de liege. Gembloux agro bio tech), p 28,30.

Simon M, (2010). Production enzymatique d'oligosaccharides à partir de gomme de caroube. Mémoire : Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Belgique).

Singleton V.L and Rossi J.A.J, (1965), Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* Vol (16):144-58.

Sylvie Morel, (2011). Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae), (thèse doctorat, université d'Angers), p25.

Szydłowska-Czerniaka A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E,(2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*; Vol (76):899-905.

Talbi Mohammed, (2015). Dosage des polyphénols de la plante d'*Artemisia Campestris* L, par chromatographie HPLC, mise en évidence de l'activité biologique, Mémoire de Magister en Chimie moléculaire et biomoléculaire, Université d'Oran 1 Ahmed Benbella, p 17-18.

Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., and Ulubelen A, (2007). a new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chemistry* Vol (103): 816–822.

Trease, E.G., et Evans,W.C, (1978). Pharmacology. 11 th Edition, Balliere Tindall. London, 115-222.

Vertuani S, Angusti A, and Manfredini S. (2004). The Antioxidants and ProAntioxidants Network:An Overview. *Curr. Pharm* Vol (10): 1677-1694.

Wimonrat Tongpoothorn, Saksit Chanthai, Manop Sriuttha, Kanda Saosang, Chalerm Ruangviriyachai, (2011). Bioactive properties and chemical constituents of methanolic extract and itsfractions from *Jatropha curcas* oil.

Xavier Leverage, (2009). Stress oxydant et antioxydants ?, *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, Vol (44), 219-224.

Yassine Nassar, (2013). Etude des paramètres qui influencent la viscosité de farine de caroube pendant le circuit mouture, Mémoire pour l'obtention le grade de Master, Université Sidi Mouhamed Ben Abdallah.

Yefrida, Hamzar Suyani, Admin Alif, Mai Efdi and Hermansyah Aziz, (2018). Modification of Phenanthroline Method to determine Antioxidant Content in Tropical Fruits Methanolic Extract, *Research Journal of Chemistry and Environment*. Vol (22) 28-35.

Yver Alain.B, Janat.A, Mamyrbekowa.B, Boua.B, Fézan.H.Trabli, F.houan.F, (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caerlpiniabenthiana* (Baill),Harend, and Zarucchi (*Caesalpinaceae*). *Science et nature* Vol. (4): 217-225.).

Zouhir djerrou, (2011). Etude des effets pharmaco toxicologiques de plantes médicinales d'Algérie : Activité cicatrisante et innocuité de l'huile végétale de *Pistacia lentiscus* L. Thèse pour l'obetenir le diplôme en Sciences, Université frère Mentouri Constantine 1.

Zunft, H.J., Luder, W., Harde, A., Haber, B., Graubaum, H.J, Koebnick C, and Grunwald, J, (2003). Carob pulp preparation rich in insoluble fibre lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemia patients. *Eur. J. Nutr.* Vol (42) 235–242.

Résumé

Résumé

Ceratonia siliqua L est une plante médicinale appartient à la famille de Fabaceae, elle possède des multiples effets thérapeutiques et une variété des activités biologiques.

Dans le présent travail l'objectif ultime est l'étude phytochimique des différentes fractions issues des feuilles de *Ceratonia siliqua* L, l'estimation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et les flavonoïdes totaux par la méthode au trichlorure d'ammonium, l'évaluation de l'activité antioxydante et anti-enzymatique *in vitro*.

Les résultats de criblage phytochimique ont montré la richesse des extraits de notre plante en métabolites secondaires principalement la présence les alcaloïdes, les stéroïdes, les quinones libre, les flavonoïdes glycosides, les sucres réducteurs, les anthocyanidines avec des proportions différentes. L'analyse quantitative des polyphénols totaux a révélé des teneurs considérables chez la fraction butanolique $920,94 \pm 0,11$ mgEAG/g, et chloroformique $509,16 \pm 0,09$ mgEAG/g, de même la teneur la plus élevée des flavonoïdes totaux est constatée dans la fraction butanolique $387,5 \pm 0,04$ mg EAG/g.

L'évaluation du potentiel antioxydante par plusieurs tests *in vitro* (le piégeage du radical libre DPPH, le CUPRAC, l'ABTS, Phénantroline, pouvoir réducteur, et le superoxyde DMSO alcalin) a mis en évidence un pouvoir antioxydant très important.

L'évaluation de l'activité anti-enzymatique par le test anti-acétylcholinestérase a montré la capacité des extraits de notre plantes à inhiber l'acétylcholinestérase.

Ces résultats révèlent que les feuilles du *Ceratonia siliqua* L présentent une richesse considérable par différents métabolites secondaires et que la plus part des extraits testé ont une bonne activité antioxydante et anti-enzymatique.

Mots clés : *Ceratonia siliqua* L, Polyphénols, flavonoïdes, Activité antioxydante, Activité anti-enzymatique.

Abstract

Ceratonia siliqua L is a medicinal plant belonging to the Fabaceae family, it has multiple therapeutic effects and a variety of biological activities.

In this work the ultimate objective is the phytochemical study of deferents extracted from *Ceratonia siliqua* L leaves, the quantitative estimation of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method and total flavonoids by the ammonium trichloride method, the evaluation of antioxidant and anti-enzymatic activity *in vitro*.

The results of phytochemical screening showed the richness of extracts of our plant in secondary metabolite by presence of alkaloids, steroids, free quinones, flavonoids glycosides, reducing sugars, anthocyanidins. Quantitative analysis of total polyphenols and total flavonoids revealed significant levels of metabolite in botanical and chlorofirmic fractions.

The evaluation of antioxidant potential by several *in vitro* tests (trapping of the free radical DPPH, CUPRAC, ABTS, Phenantroline, reducing power, and alkaline DMSO superoxide) showed a high antioxidant power.

The evaluation of the enzyme activity by the acetylcholinesterase test showed the ability of our plant extracts to inhibit acetylcholinesterase.

These results revealed that leaves of *Ceratonia siliqua* L have a very imporant richness in secondary metabolite and most of the extracts tested have good antioxidant and anti-enzymatic activity.

Key words: *Ceratonia siliqua* L, Polyphénols, flavonoïdes, antioxydant activity. enzymatic activity.

ملخص

Ceratonia siliqua L هو نبات طبي ينتمي إلى عائلة Fabaceae ، ولها آثار علاجية متعددة ومجموعة متنوعة من الأنشطة البيولوجية.

في هذا العمل الهدف الأساسي هو دراسة فيتو كيميائية من المستخلصات المستخرجة من أوراق *Ceratonia siliqua L* ، والتقدير الكمي للبوليفينول الكلي بطريقة Folin-ciocalteu ومجموع الفلافونويدات بطريقة ثلاثي كلوريد الأمونيوم، وكذلك تقييم النشاط المضاد للأكسدة والمضادة للإنزيمية.

وأظهرت نتائج الفحص فيتو كيميائية ثراء هذه المستخلصات بالمواد الايضية وذلك بوجود وجود قلويدات, المنشطات, كينون غليكوزيدات الفلافونويدات, الحد من السكريات, الأنثوسيانيندين . وكشف التحليل الكمي للبوليفينول الكلي مستويات كبيرة في الكسور البوتانولية 0.11 ± 920.94 mgEAG / جم، والكلوروفورم 0.09 ± 509.16 ملغم / غرام، وهو نفس أعلى محتوى فلافونويد إجمالي وجدت في جزء البوتانول 0.04 ± 387.5 ملغم EAG / جم.

تقييم النشاط المضاد للأكسدة باستعمال العديد من الاختبارات في المختبر مثل محاصرة DPPH الجذور الحرة، CUPRAC، ABTS، Phenanthroline، Pouvoir reducteur، DMSO اثبت وجود قدرة عالية مضادة للأكسدة

تقييم نشاط الإنزيم من قبل اختبار أستيلكولينستراز أظهرت قدرة مستخلصات نا النباتية لمنع أستيلكولينستراز.

هذه النتائج تكشف أن أوراق *Ceratonia siliqua* غنية بمختلف المواد الايضية الثانوية وأن معظم المستخلصات لها قدرة جيدة مضادة للأكسدة ومكافحة للنشاط الأنزيمي .

الكلمات المفتاحية: *Ceratonia siliqua L* , DPPH, ABTS, CUPRAC, Phénanthroline, DMSO نشاط مضاد للإنزيم.

Année universitaire : 2018-2019.

Date de soutenance : 16/07/2019.

Présenté par : ABID CHAREF LINDA & BOUSSAOUI WAHIBA.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Appliquée.
Option : Biochimie appliquée.

Thème : Etude phytochimique et l'évaluation des activités antioxydante et anti-enzymatique des feuilles de *Ceratonia siliqua L*

Résumé :

Ceratonia siliqua L est une plante médicinale appartient à la famille de Fabaceae, elle possède des multiples effets thérapeutiques et une variété des activités biologiques.

Dans le présent travail l'objectif ultime est l'étude phytochimique des différentes fractions issues des feuilles de *Ceratonia siliqua L*, l'estimation quantitative des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et les flavonoïdes totaux par la méthode au trichlorure d'ammonium, l'évaluation de l'activité antioxydante et anti-enzymatique *in vitro*.

Les résultats de criblage phytochimique ont montré la richesse des extraits de notre plante en métabolites secondaires principalement la présence les alcaloïdes, les stéroïdes, les quinones libre, les flavonoïdes glycosides, les sucres réducteurs, les anthocyanidines avec des proportions différentes. L'analyse quantitative des polyphénols totaux a révélé des teneurs considérables chez la fraction butanolique $920,94 \pm 0,11$ mgEAG/g, et chloroformique $509,16 \pm 0,09$ mgEAG/g, de même la teneur la plus élevée des flavonoïdes totaux est constatée dans la fraction butanolique $387,5 \pm 0,04$ mg EAG/g.

L'évaluation du potentiel antioxydant par plusieurs tests *in vitro* (le piégeage du radical libre DPPH, le CUPRAC, l'ABTS, Phénantroline, pouvoir réducteur, et le superoxyde DMSO alcalin) a mis en évidence un pouvoir antioxydant très important.

L'évaluation de l'activité anti-enzymatique par le test anti-acétylcholinestérase a montré la capacité des extraits de notre plantes à inhiber l'acétylcholinestérase.

Ces résultats révèlent que les feuilles du *Ceratonia siliqua L* présentent une richesse considérable par différents métabolites secondaires et que la plus part des extraits testé ont une bonne activité antioxydante et anti-enzymatique.

Mots clés : *Ceratonia siliqua L*, Polyphénols, flavonoïdes, Activité antioxydante, Activité anti-enzymatique.

Jury de l'évaluation :

Encadreur : MADI Aicha

(MCB) Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Président de jury : MAAMRI-Habibatni Zeineb (MCA) Université des Frères Mentouri Constantine1.

Examineurs : Bensouici Chawki

(MRB) Centre de Recherche en Biotechnologie Constantine.

