

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de**  
**la Recherche Scientifique**  
**Université de Mostaganem**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département d'Agronomie**

**MEMOIRE**  
**Présenté par :**

Elaoufi Manel

**Pour l'obtention du diplôme de Magister**  
**Spécialité : Sciences alimentaires**  
**Option : Hygiène et sécurité alimentaire**

**Intitulé**

*Activité antioxydante des extraits phénoliques  
de caroube*

Soutenu le      Novembre 2013 devant le jury :

Mr A. Riazi	Pr. Président	Univ. Mostaganem
Mr B. Lotmani	Pr. Examineur	Univ. Mostaganem
Mr. D. Krouf	Pr. Examineur	Univ. D'Es Senia d'Oran
Mr M. Benali	Pr. Directeur de mémoire	Univ. Sidi Bel Abbès
Mlle Y. Boufadi	MAA. Co-directrice	Univ. Mostaganem

**Année universitaire 2013- 2014**

## **Avant propos**

*Tout d'abord, je remercie ALLAH le tout puissant et miséricordieux, qui m'a inspiré et comblé de bienfaits, je lui rends grâce.*

*Le présent mémoire a été réalisé au laboratoire de Biotoxicologie, du Professeur M. Benali de l'université Djillali Liabès à Sidi Bel Abbès, le laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé (LMBAFS), du Professeur A. Riazi de l'Université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem et le laboratoire de chimie pharmaceutique de l'Université de Bruxelles.*

*À l'issue de ce travail de recherche, j'adresse mes sincères remerciements à mon directeur de mémoire, Mr. M. Benali, Professeur à l'Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès pour avoir accepté d'encadrer avec beaucoup d'attention et de soin ce mémoire, pour son aide, sa bienveillance et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens dont il dispose.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier ma co-directrice, M<sup>lle</sup>. Y. Boufadi, Maitre Assistante à l'université de Mostaganem pour sa disponibilité, son soutien permanent, et d'avoir prêté un intérêt constant au sujet. Je lui dois beaucoup pour le contenu du travail présenté, pour ses critiques constructives et son aide aux différentes entraves rencontrées et pour sa gentillesse.*

*J'exprime mon estime et mes remerciements à tous ceux qui ont accepté d'associer leurs compétences et leurs savoirs afin de juger ce travail :*

*A Mr. A. Riazi, Professeur à l'université de Mostaganem, qui nous fait l'honneur de présider le jury de cette soutenance. Je lui adresse mes respectueux et profonds remerciements.*

*A Mr. B. Lotmani, Professeur à l'université de Mostaganem, qui a bien voulu juger ce travail et d'avoir très aimablement consenti à prendre part au jury de ce mémoire. Qu'il trouve ici l'expression de ma très haute considération.*

*A Mr D. Krouf, Professeur à l'Université d'Es Senia d'Oran, pour avoir eu l'amabilité de juger sans hésitation ce travail et d'accepter de siéger parmi les membres de jury. Je lui en suis profondément reconnaissante.*

*Enfin, je suis reconnaissant à toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

# DÉDICACE

Je dédie ce modeste travail :

À spécialement mon très cher oncle monsieur Braik Saadane.

À mes très chers parents, Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude pour leur amour, leur soutien, encouragement et leurs sacrifices tout au long de mes études.

À mes frères : Iliès et Anis

À la mémoire de mes deux grands pères.

À mes grandes mères, que dieu prolonge leurs vies.

À l'homme qui m'a tant soutenu, aidé et encouragé, mon mari Karim et à toute la famille Bouterfas, spécialement à la nouvelle venue « widad », et Sohbi.

À tout mes oncles et tantes, cousins et cousines.

À tout le groupe de ma promotion de la post-graduation.

À tous mes ami(e)s.

À toute personne qui me connaît.

## **Sommaire**

Avant-propos

Résumé

Abstract

Listes des tableaux et figures

Liste des abréviations

**Page**

Introduction générale

1

### **Partie bibliographique**

#### **Chapitre I : Présentation du caroubier: *Ceratonia siliqua* L.**

I.1.1. Taxonomie

3

I.1.2. Données botaniques

3

I.1.3. Classification classique et phylogénétique du caroubier

4

I.1.4. Ecologie

5

I.2. Multiplication du caroubier

6

I.3. Origine et répartition géographique

7

I.3.1. Origine du caroubier

7

I.3.2. Répartition géographique

7

I.4. Composition chimique du caroubier

8

I.5. Intérêts et utilisations du caroubier

9

I.5.1. Arbre

10

I.5.2. Fruit

10

I.5.3. Pulpe

11

I.5.4. Graines

11

I.5.5. Feuilles

11

I.5.6. Ecorce	12
---------------	----

## **Chapitre II : Les polyphénols et le système antioxydant**

II.1. Généralités sur les polyphénols	13
II.1.1. Biosynthèse et classification des composés phénoliques	13
II.1.1.1. Classification de quelques extraits phénoliques	14
II.1.1.1.1. Les flavonoïdes	14
II.1.1.1.2. Les tanins	14
II.1.1.1.3. Les coumarines	16
II.1.1.1.4. Les lignanes	16
II.1.2. Propriétés biologiques et effet sante des polyphénols	16
II.2. Stress oxydant et système antioxydant	17
II.2.1. Radicaux libres	17
II.2.1.1. Sources endogènes	17
II.2.1.2. Sources exogènes	18
II.2.2. les antioxydants	18
II.2.3. Système de défense antioxydant	18
II.2.3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques	19
II.2.3.1.1. La superoxyde dismutase	19
II.2.3.1.2. Réaction à la catalase	20
II.2.3.1.3. Réaction à la glutathion peroxydase	20
II.2.3.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques	20
II.2.3.2.1. Composés endogènes	20
II.2.3.2.2. Composés exogènes	21
II.2.4. Stress oxydatif	22
II.2.4.1. Définition	22
II.2.4.2. Origine du stress et ses conséquences biologiques	22
II.2.4.3. Les espèces réactives de l'oxygène	22

II.2.4.4. Les espèces réactives de l'azote	26
II.2.4.5. Les cibles des EROS et des ERAS	26
II.2.4.5.1. Oxydation des composés lipidiques	26
II.2.4.5.2. Oxydation des composés protéiques	27
II.2.4.5.3. Oxydation de l'ADN	27

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre III : Matériels et méthodes**

#### **Partie 1 : Etude *in vitro* de la caroube**

III.1.1. Matériel biologique	29
III.1.1.1. Récolte des gousses de <i>Ceratonia siliqua</i> L.	29
III.1.1.2. Extraction des gousses de <i>Ceratonia siliqua</i> L.	29
III.1.2. Analyse des paramètres physico-chimiques	30
III.1.2.1. Détermination de la matière sèche	30
III.1.2.2. Détermination de la teneur en eau	31
III.1.2.3. Détermination de la teneur en cendre	31
III.1.2.4. Détermination de la teneur en matière grasse	32
III.1.2.5. Dosage des sucres totaux	33
III.1.2.6. Dosage des protéines brutes	34
III.1.3. Quantification de quelques composés principaux	35
III.1.3.1. Dosage des polyphénols totaux	35
III.1.3.2. Dosage des flavonoïdes	35
III.1.3.3. Dosage de la vitamine C	36
III.1.4. Mesure du pouvoir antioxydant des EEC, EWC et EMC par le test DPPH	37
III.1.5. Composition chimique de <i>Ceratonia siliqua</i> L. par LC-MS/MS	38

## **Partie 2 : L'activité antioxydante de l'EEC *in vivo***

III.2.1. Animaux et expérience d'élevage	38
III.2.2. Analyse des paramètres sériques	39
III.2.2.1. Dosage de la glycémie	39
III.2.2.2. Dosage du Cholestérol	40
III.2.2.3. Dosage des triglycérides	41
III.2.2.4. Dosage du HDL	41
III.2.2.5. Evaluation du cholestérol LDL	42
III.2.2.6. Dosage de l'urée	42
III.2.2.7. Dosage de la créatinine	42
III.2.2.8. Evaluation de la l'activité de la TGP	43
III.2.2.9. Evaluation de la l'activité de la TGO	44
III.3. Etude du statut antioxydant	44
III.3.1. Dosage du malondialdehyde par le thiobarbiturique	44
III.3.2. Dosage de l'activité enzymatique du catalase	45
III.3.3. Dosage de l'activité de la Superoxyde dismutase	46
III.3.4. Dosage de l'activité plasmatique de la Glutathion peroxydase	47
III.4. Analyses statistiques	47

## **Chapitre IV : Résultats et Discussion**

### **Partie 1 : Etude *in vitro* de la caroube**

IV.1.1. Analyse des paramètres physico-chimique	48
IV.1.1.1. Teneur en eau	48
IV.1.1.2. Teneur en cendres	48
IV.1.1.3. Teneur en matière grasse	49



IV.1.1.4. Teneur en sucres totaux	50
IV.1.1.5. Teneur en protéines	51
IV.1.2. Détermination de quelques composés principaux	51
IV.1.2.1. Teneur en polyphénols totaux	51
IV.1.2.2. Teneur en flavonoïdes	53
IV.1.2.3. Teneur en acide ascorbique	53
IV.1.3. Evaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH	54
IV.1.4. Composition chimique de <i>Ceratonia siliqua</i> L. par LC-MS/MS	56

## **Partie 2 : L'activité antioxydante de l'EEC *in vivo***

IV.2.1. L'effet de <i>Ceratonia Siliqua</i> L. sur les paramètres sériques des rats traités	58
IV.2.1.1. Effet du traitement sur la glycémie	58
IV.2.1.2. Effet du traitement sur le profil lipidique	59
IV.2.1.3. Effet du traitement sur l'urémie	63
IV.2.1.4. Effet du traitement sur la créatininémie	64
IV.2.1.5. Effet du traitement sur les transaminases hépatiques (TGO et TGP)	65
IV.2.2. Etude du statut antioxydant	68
2.2.1. Effet sur le Malondialdehyde (MDA)	68
IV.2.2.2. Effet sur l'activité de la catalase (CAT)	70
IV.2.2.3. Effet sur l'activité du superoxyde dismutase (SOD)	71
IV.2.2.4. Effet sur l'activité plasmatique de la Glutathion peroxydase	73

<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>75</b>
-----------------------------------	-----------

<b>Références bibliographiques</b>	<b>77</b>
------------------------------------	-----------

## Résumé

La présente étude porte sur la détermination de la composition chimique, l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* (DPPH) et *in vivo*, l'estimation quantitative des polyphénols totaux (par la méthode Folin-Ciocalteu) et des flavonoïdes (par la méthode au  $AlCl_3$ ) de l'extrait éthanolique (EEC), de l'extrait d'eau distillée (EWC) et méthanolique (EMC) 70% (v/v) (1 :10, p/v) de la gousse de caroube (*Ceratonia siliqua* L.) récoltée dans la région d'Ain Témouchent.

Les résultats obtenus montrent que la pulpe de caroube est riche en sucres totaux (48,23%) et contient une faible teneur en protéines (3,68), en lipides (0,77%) et en vitamine C (1,83 %). Elle renferme également 9,69 % de cendres et 12,1% d'humidité. L'EEC s'est révélé avoir le plus d'activité anti-oxydante avec une CE50 (0.28 mg/ml) et, par conséquent, une activité anti-radicalaire significative dose-dépendante. Ces observations préliminaires laissent penser que cette plus forte activité anti-radicalaire de l'EEC pourrait être liée à sa teneur en polyphénols qui est également plus élevée par rapport à celle de l'EWC et l'EMC. La teneur en flavonoïdes est également plus importante dans l'EEC.

Plusieurs fractions de l'EEC obtenues par HPLC ont été identifiées par LC-MS/MS. Cette identification montre la présence de composés polyphénoliques, d'acides Palmitoléique, Isoprenyl coumarique, cinnamique et ses dérivés. Le Prenyl caffeate a été trouvé dans la plupart des fractions, tandis que de nombreux types de flavonoïdes, comme la Chryisine, le Kaempferol, la méthyl quercétine, la quercétine et la tectochryisine, ont été ainsi trouvés.

L'activité antioxydante de l'extrait éthanolique (EEC) est confirmée *in vivo* chez 24 rats Wistar répartis en 04 groupes traités ainsi : contrôle ; (G1) : 80mg/kg/jour d'EEC ; (G2) : 30 mg/kg/jour d' $AlCl_3$  ; (G3) : 80 mg/kg/jour d'EEC 30min avant 30 mg/kg/jour d' $AlCl_3$ . Le prétraitement quotidien par voie orale de l'EEC 30min avant l' $AlCl_3$  pendant 28 jours a entraîné une amélioration significative de la capacité antioxydante totale du sang indiqué par la baisse de la glycémie et le rétablissement du profil lipidique et des marqueurs hépatiques et rénaux. Les paramètres du stress oxydatif ont été rétablis par la réduction de la peroxydation lipidique et stimulation des activités de la SOD, la CAT et la glutathion peroxydase.

Ces données suggèrent que la pulpe de caroube présente des effets antioxydants *in vitro* ainsi qu'*in vivo* et est ainsi susceptible d'être proposée en tant qu'additif alimentaire pour protéger contre les dommages du stress oxydatif.

**Mots clés** : Caroube, polyphénols, activité antioxydante, LC-MS/MS,  $AlCl_3$ .

## **Abstract**

This study focuses on the determination of the chemical composition, the evaluation of the antioxidant activity *in vitro* (DPPH) and *in vivo*, quantitative estimation of total polyphenols (by the Folin- Ciocalteu method) and flavonoïds (the AlCl<sub>3</sub> method) of the ethanol extract (CEE), the extract distilled water (EWC) and methanol (EMC) 70 % (v / v) (1:10 w/v) of the carob pod (*Ceratonia siliqua* L.) harvested in the region of Ain Témouchent.

The results show that the carob pulp is rich in total sugars (48.23%) and contains a low protein (3.68), fat (0.77%) and vitamin C (1.83%). It also contains 9.69% of ash and 12.1% of moisture. The CEE was found to have the highest antioxidant activity with EC<sub>50</sub> (0.28 mg / ml) and therefore, a significant dose-dependent anti- radical activity. These preliminary observations suggest that stronger anti- radical activity of the CEE could be related to its polyphenol content which is also higher compared to the EWC and EMC. The flavonoïd content is also higher in the CEE.

Several fractions of CEE obtained by HPLC were identified by LC-MS/MS. This identification shows the presence of polyphenolic compounds, Palmitoleic acid, isoprenyl coumaric, cinnamic and its derivatives. The caffeate Prenyl was found in most fractions, while many types of flavonoids, such as Chrysin, Kaempferol, the methyl quercetin, quercetin and tectochrysin were found as well.

The antioxidant activity of the ethanol extract (CEE) is confirmed *in vivo* in 24 Wistar rats divided into 04 treatment groups as follows: control, (G1) : 80mg/kg/jour of CEE ; (G2): 30 mg/kg/day of AlCl<sub>3</sub>, (G3): 80 mg/kg/day of CEE 30min before 30 mg/kg/day of AlCl<sub>3</sub>. The daily oral pretreatment CEE 30min before AlCl<sub>3</sub> for 28 days resulted in a significant improvement in the total antioxidant capacity of blood indicated by the drop in glycemia and restoring lipid profile and liver and renal markers. The parameters of oxidative stress were restored by reducing lipid peroxidation and stimulation activities of SOD, CAT and glutathione peroxidase.

These data suggest that the carob pulp has antioxidants effects *in vitro* and *in vivo* and may thus be proposed as a food additive to protect against damage from oxidative stress.

**Keywords:** Carob, polyphenols, antioxidant activity, LC-MS/MS, AlCl<sub>3</sub>.

## ملخص

تركز هذه الدراسة على تحديد التركيب الكيميائي، تقييم النشاط المضاد للأكسدة في المختبر (DPPH) وحيويا ، التقدير الكمي لإجمالي البوليفينول (بطريقة Folin -Ciocalteu) وفلافونيدات (بطريقة  $AlCl_3$ ) من استخراج الإيثانول (EEC) ، واستخراج الماء المقطر (EWC) والميثانول (EMC) 70٪ (ث / ت) (10 : 1) (p/v) من جراب الخروب (سيراتونيا أتبية L). التي حصدت في منطقة عين تموشنت .

النتائج تظهر أن لب الخروب غني بالسكريات (48.23 ٪) و يحتوي على نسبة منخفضة من البروتين (3.68 ٪) ، والدهون (0.77 ٪) و فيتامين س (1.83 ٪). كما أنه يحتوي على 9.69 ٪ من الرماد و 12.1 ٪ من الرطوبة. ثبت أن EEC لديه أعلى نشاط مضاد للأكسدة مع EC50 (0.28 ملغ / مل) ، وبالتالي ، النشاط المضاد للراديكالية كبير يعتمد على الجرعة. وتشير هذه الملاحظات الأولية أن هذا النشاط المضاد للراديكالية العالي لل EEC يمكن أن يكون ذات صلة إلى محتواه البوليفينول الذي هو أيضا أعلى بالمقارنة مع EWC و EMC. محتوى الفلافونويد أعلى أيضا في الEEC.

عدة كسور EEC حصلت عليها من قبل HPLC تم تحديدها ب LC-MS/MS. هذا التحديد يدل على وجود مركبات بوليفينوليك، acide Palmitoléique، Isoprenyl coumarique، السيناميك ومشتقاته. العثور على Prenyl caffeate في معظم الكسور ، في حين تم العثور على العديد من أنواع الفلافونويد، مثل Chrysin ، كايمبريول ، و كيرسيتين الميثيل ، كيرسيتين و كذلك tectochrysin .

تم تأكيد النشاط المضاد للأكسدة لمستخلص الإيثانول (EEC) حيويا في 24 جرذ ويستار مقسمة إلى 04 مجموعات معالجة كما يلي : الشاهد; (ج1) : 80 مغ / كغ / يوم من EEC، (ج2) : 30 مغ / كغ / يوم من  $AlCl_3$ ، (ج3) : 80 ملغ / كغ / يوم من EEC 30 دقيقة قبل 30 ملغ / كغ / يوم من  $AlCl_3$  . المعالجة يوميا عن طريق الفم بال EEC 30 دقيقة قبل  $AlCl_3$  لمدة 28 يوما أدى إلى تحسن كبير في القدرة المضادة لأكسدة الدم. يدل ذلك انخفاض في نسبة السكر في الدم و الدهون و علامات الكبد و الكلوي. أعيدت معلمات الاكسدة عن طريق الحد من تأكسد الدهون وأنشطة التحفيز من SOD, CAT, الجلوتاثيون .

وتشير هذه البيانات إلى أن لب الخروب يحتوي على المواد المضادة في المختبر وحيويا و هكذا يمكن اقتراحها كمادة مضافة للغذاء للحماية ضد الأضرار الناجمة عن الاكسدة .

**كلمات البحث:** الخروب ، البوليفينول ، النشاط المضاد للأكسدة، LC-MS/MS,  $AlCl_3$ .

## ***Liste des tableaux***

<b>Tableau 01</b> : Classification classique et phylogénétique de <i>Ceratonia siliqua</i> L	5
<b>Tableau 02</b> : composition moyenne de la pulpe de caroube	9
<b>Tableau 03</b> : composition de la farine de caroube	49
<b>Tableau 04</b> : Identification des fractions actives de l'EEC par LC-MS / MS	57

### Liste des figures

<b>Figure 01:</b> L'arbre du caroubier ( <i>Ceratonia siliqua L.</i> )	4
<b>Figure 02 :</b> fruits mûres(a) et verts (b) du caroubier	10
<b>Figure 03 :</b> Structure de base des flavonoïdes	14
<b>Figure 04:</b> Structure des tanins hydrolysables	15
<b>Figure 05:</b> Structure des tanins condensés	16
<b>Figure 06:</b> Principales sources cellulaires de radicaux libres	19
<b>Figure 07 :</b> Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les systèmes de défenses antioxydants	21
<b>Figure 08 :</b> Les différentes espèces réactives oxygénées	25
<b>Figure 09 :</b> les gousses de caroube	29
<b>Figure 10:</b> la farine des gousses de caroube	30
<b>Figure 11 :</b> Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhenyle-1-Pikryl-Hydrazyle)	37
<b>Figure 12:</b> taux d'humidité et de la matière sèche des gousses de caroube	48
<b>Figure 13:</b> dosage des polyphénols totaux de trois extraits de caroube	52
<b>Figure 14:</b> dosage en flavonoïdes des trois extraits de caroube	53
<b>Figure 15:</b> Pouvoir antiradicalaire des extraits de caroube par le test de DPPH	56
<b>Figure 16:</b> évaluation de la glycémie des différents lots. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	59
<b>Figure 17:</b> évaluation du cholestérol des différents lots. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	61
<b>Figure 18:</b> évaluation de HDL des différents lots. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	61
<b>Figure 19:</b> évaluation de LDL des différents lots. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	62
<b>Figure 20:</b> évaluation des triglycérides des différents lots. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	62
<b>Figure 21:</b> évaluation de l'urée des différents lots. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	64
<b>Figure 22:</b> évaluation de la créatinémie des différents lots. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	65
<b>Figure 23:</b> évaluation de la transaminase glutamate oxalate (TGO) des différents lots. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	67
<b>Figure 24:</b> évaluation de la transaminase glutamate pyruvate (TGP) des différents lots. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	67
<b>Figure 25:</b> dosage du MDA au niveau du plasma. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	69
<b>Figure 26:</b> dosage de la catalase au niveau du plasma. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	71
<b>Figure 27:</b> dosage de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	73
<b>Figure 28:</b> dosage de l'activité plasmatique de la Glutathion peroxydase. Chaque valeur représente la moyenne $\pm$ SD (n=5)	74

### **Liste des abréviations**

8-OHG:	8-hydroxy-guanine.
ADN :	acide désoxyribonucléique.
ADP :	adénosine diphosphate.
ALAT:	alanine aminotransférase.
AlCl <sub>3</sub> :	trichlorure d'aluminium.
APG:	Angiosperm Phylogeny Group.
ASAT:	aspartate aminotransferase.
CAT :	catalase.
CCl <sub>4</sub> :	trichlorure de carbone.
CE <sub>50</sub> :	Concentration effective à 50%.
CHL-T :	cholestérol total.
Cu-SOD :	superoxyde dismutase à cuivre.
DIP :	Dichlorophénol-indophénol.
DPPH :	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.
EAG :	équivalent d'acide gallique.
EDTA :	acide éthylène-diamine-tétra-acétique.
ERA ou ERN:	espèces réactives de l'azote.
ERAs :	espèces réactives dérivées de l'azote.
ERO :	espèces réactives de l'oxygène.
EROs :	espèces réactives dérivées de l'oxygène.
EQ :	équivalent de quercétine.
Fe-SOD:	superoxyde dismutase ferreux.
G-6-PDH :	glucose-6-phosphate dihydrogénase.
GR :	glutathion réductase.
GSH :	glutathion réduit.
GSH-PX :	glutathion peroxydase.
GSSG :	glutathion oxydé.
LC-MS:	Liquid chromatography–mass spectrometry.
Mn-SOD :	superoxyde dismutase à manganèse.
NIH:	National Institutes of Health.
·NO :	<b>oxyde</b> nitrique ou monoxyde d'azote.
NOS:	<b>oxyde</b> nitrique synthase ou monoxyde d'azote synthase.
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> :	anion superoxyde.
ONOO <sup>-</sup> :	peroxynitrite.
PAR :	pouvoir antiradicalaire.
R·:	radical peroxyde.
RO <sub>2</sub> ·:	radical peroxyde.
ROOR·:	endoperoxyde radicalaire.
ROS:	reactive oxygen species.
Se-GPx:	glutathion peroxydase.
SOD:	superoxyde dismutase.
t-BOOH :	t-butyl-hydroperoxide.
TBA :	acide thiobarbiturique.
TBARS :	thiobarbiturique.
TiOSO <sub>4</sub> :	titanium oxyde sulfate.
TMP :	tétraméthoxypropane.

# *Introduction*



## ***Introduction***

Depuis des années les scientifiques se sont intéressés aux espèces réactives de l'oxygène (ROS: Reactive Oxygen Species), qui sont impliqués dans de nombreuses maladies humaines (Lobo *et al.*, 2010). L'augmentation de ces espèces provoque un stress oxydatif qui se réfère à une perturbation de signalisation dégénérative provoquée par l'oxydation des composants cellulaires vitaux (Farrugia et Balzan, 2012), ce qui implique l'apparition de divers pathologies humaines tel que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives ou le cancer.

La complexité du stress oxydant et son implication dans de nombreuses maladies explique au moins en partie l'accumulation des recherches portant sur ce phénomène et la recherche de nouvelles substances permettant de mettre fin à ses dégâts pathologiques ou leur prévention (Boumaza, 2009). Les plantes médicinales constituent une source inépuisable de substances ayant des activités biologiques et pharmacologiques très variées.

Le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.), appartenant à la grande famille des légumineuses, est une essence presque endémique du pourtour méditerranéen, cultivé depuis longtemps pour ses produits dérivés mais aussi pour sa résistance au manque d'eau (Biner *et al.*, 2007 ; Avallone *et al.*, 1997).

En thérapeutique, cette plante est connue pour son effet anti-diarrhéique, hypocholestérolémiant et hypoglycémiant. Les composés phénoliques qu'elle contient sont à l'origine de ses propriétés antioxydantes (Hariri *et al.*, 2009). Il est prouvé actuellement que ces composés offrent des possibilités chimio-préventives intéressantes contre certains cancers, en particulier ceux de la région gastro-intestinale (El hajaji *et al.*, 2011).

L'une des deux principales composantes du fruit de caroube est sa gousse, qui est plus riche en sucre que la canne à sucre et la betterave sucrière. Par contre elle contient moins de protéines et de lipides, les gousses de caroube sont utilisées en industrie agroalimentaire et pharmacologique, notamment comme anti-diarrhéique. La farine, obtenue en séchant les gousses après les avoir débarrassées de leurs graines, est riche en composés phénoliques qui sont à l'origine de ses propriétés antioxydantes (Makris et Kefalas, 2004).

Les substances naturelles douées d'activité antioxydante présentent un intérêt socioéconomique peut être sans équivoque dans le domaine de la recherche bio

pharmacologique. Plusieurs laboratoires à travers le monde se sont orientés vers la recherche des substances bioactives et leur valorisation. Dans ce contexte s'inscrit ce présent travail dont l'objectif essentiel consiste à évaluer le pouvoir antioxydant des polyphénols de caroube, *in vitro* en dosant les substances phénoliques majeures contenues dans ces extraits. En outre, les effets de l'extrait éthanolique de caroube sur le potentiel global de défense antioxydant de l'organisme sont déterminés *in vivo*, sur des rats Wistar.

Dans la présente étude, nous avons fixé les objectifs suivants :

- Evaluation de paramètres physico-chimiques.
- Etude quantitative des polyphénols totaux et des flavonoïdes de différents extraits de gousses de *Ceratonia siliqua* L.,
  - Etude du pouvoir antioxydant des différents extraits de caroube en utilisant le test du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).
  - Identification chimique de l'extrait éthanolique de caroube par LC-MS/MS.
  - Evaluer, *in vivo*, l'effet de l'extrait éthanolique de caroube en utilisant un modèle animal exposé au trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) provoquant un stress oxydant.

## *Partie bibliographique*

# *CHAPITRE I :*

*Présentation du caroubier: Ceratonia siliqua  
L.*

## **Chapitre I : Présentation du caroubier: *Ceratonia siliqua* L.**

### **I. 1. Taxonomie**

Le nom scientifique du caroubier, *Ceratonia siliqua* L. dérive du grec Keras (=corne) et du latin *siliqua* désignant une siliqua ou gousse et faisant allusion à la dureté et à la forme du fruit, il est connu aussi sous le nom de pain de St. Jean-Baptiste (Battle et tous, 1997).

Par ailleurs, le nom dialectal kharouv, originaire d'hébreu, a donné lieu à plusieurs dérivés tels Kharroub en arabe, algarrobo en espagnol, carroubo en italien, caroubier en français, etc... En outre, les graines de caroube, vu leur uniformité, sont appelées 'carats' et ont servi pendant longtemps aux joailliers comme unité de poids pour peser les diamants, les perles et d'autres pierres précieuses (1 carat = 205,3mg) (Rejeb, 1995).

Le genre *Ceratonia* appartient à la famille des Leguminosae (Fabaceae), de l'ordre des Rosales. Toute fois, cette position taxonomique reste litigieuse. Il est généralement placé dans la tribu des Cassieae, sous famille des Cesalpinoïdae. Cependant, certains auteurs, ont émis des réserves en ce qui concerne la véracité de ce positionnement. Par ailleurs, des études cytologiques ont révélé que le genre *Ceratonia* qui possède un nombre total du chromosome  $2n = 24$  est éloigné des autres membres des Cassieae dont le nombre du chromosome est  $2n = 28$  (Bureș *et al.*, 2004). En plus, certains auteurs ont désigné *Ceratonia* comme étant l'un des genres les plus archaïques des légumineuses et qui serait complètement isolé des autres genres de sa famille (Zohary, 1973).

### **I. 2. Données botaniques**

Le caroubier est un arbre à croissance lente, qui peut atteindre 7 à 20 m de hauteur et une circonférence à la base du tronc de 2 à 3 m (fig. 1). Il a 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. Le caroubier peut vivre jusqu'à 200 ans (Ait Chitt *et al.*, 2007).

Les feuilles persistantes, de 10 à 20 cm de longueur, se caractérisent par un pétiole sillonné sur la face interne et un rachis portant 8 à 15 folioles, opposées, de 3 à 7 cm, elles sont coriaces, entières, ovales à elliptiques, paripennées, légèrement échancrées de couleur verte (Ait Chitt *et al.*, 2007).

L'arbre est dioïque, parfois hermaphrodite et rarement monoïque (Batlle *et al.*, 1988). Les pieds mâles sont stériles et improductifs (Rejeb, 1995).

Les fleurs mâles, femelles et hermaphrodites poussent sur des pieds différents. D'après Tucker (1992), les fleurs sont initialement bi-sexes et au cours de leur développement, l'une des fonctions sexuelle mâle ou femelle est supprimée. Les fleurs sont verdâtres, de petite taille (6 à 16 mm de longueur), spiralées et réunies en un grand nombre pour former des grappes droites et axillaires plus courtes que les feuilles à l'aisselle desquelles sont développées (Batlle *et al.*, 1997).



**Figure 1:** L'arbre du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) (Ait Chitt *et al.*, 2007).

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

### **I.3. Classification classique et phylogénétique du caroubier**

Selon les systèmes de Cronquist (1981) et APG II (2003) la classification classique et phylogénétique de *Ceratonia siliqua* L. a été établie suivant le tableau 1.

**Tableau 01** : Classification classique et phylogénétique de *Ceratonia siliqua* L.

Classification pré- phylogénétique (Cronquist, 1981)		Classification phylogénétique (APGII, 2003)	
Règne	<i>Plantae</i>	Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>	Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>spermaphyte</i>	Embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Sous- embranchement	<i>Magnoliophyta</i> ( <i>Angiosperme</i> )	Sous-embranchement	Eu-Angiospermes
Classe	<i>Magnoliopsida</i>	Classe	Eudicotyledones
Sous-classe	( <i>dicotylédones</i> )	Ordre	Triaperturées
Ordre	<i>Rosidae</i>	Sous-ordre	<i>Rosidés</i>
Famille	Fabales	Famille	<i>Rosidés I</i> (hypogyne dialycarpique)
Sous-famille	<i>Caesalpinaceae</i>	Sous-famille	
Genre	<i>Caesalpinioideae</i>	genre	<i>Fabaceae</i>
Espèce	<i>Ceratonia</i>	espèce	<i>Caesalpinioideae</i>
	<i>Ceratonia siliqua</i> L.		<i>Ceratonia</i>
			<i>Ceratonia siliqua</i> L.

#### I.4. Ecologie

Le caroubier, dont l'aire de répartition s'étend dans les secteurs des plateaux et en moyennes montagnes jusqu'à 1700 m d'altitude, est indifférent à la nature du substrat ; il tolère les sols pauvres, sableux, limoneux lourds, rocaillieux et calcaires, schisteux, gréseux et des pH de 6,2 jusqu'à 8,6 ; mais il craint les sols acides et très humides (Sbay et Abrouch, 2006). Il s'adapte à plusieurs types de sols à l'exception des sols hydromorphes et salés et les croûtes schisteuses. On le rencontre sur sols marneux, sur sols pauvres superficiels et

rocaillieux calcaires, sur des pentes rocheuses, des escarpements peu accessibles et des collines incultes (Nabli, 1989).

C'est une espèce typique de la flore méditerranéenne, bien définie dans l'étage humide, subhumide et semi- aride. Il croît généralement à l'état disséminé dans l'étage du thuya et du genévrier de Phénicie, dans les peuplements de chêne vert et en association avec *Olea europea* et *Pistacia lentiscus* (Rejeb *et al.*, 1991).

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

Les études de Rejeb (1995) confirment que le caroubier se comporte comme une véritable espèce résistante à la sécheresse en s'adaptant morphologiquement et physiologiquement au manque d'eau.

Les principales adaptations peuvent se résumer comme suit :

- Les stomates sont situés sur une seule face,
- Le nombre de stomates est assez élevé et ils sont de petite taille,
- Le système racinaire est développé,
- Un dépôt de cire important,
- L'assimilation et les échanges gazeux dépendent de l'état hydrique général.

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

## **I.2. Multiplication du caroubier**

Elle peut se faire par semis, bouturage, greffage, marcottage, ou par micropropagation. Le semis est la méthode classique la plus utilisée pour la multiplication du caroubier. En effet, la germination par semis est facilement réalisable, mais elle est entravée par l'impossibilité de connaître le sexe de la plante avant la maturation et la production tardive, qui peut prendre plus de 8 ans (Gharnit, 2003).



Le bouturage est moins utilisé, car il demande des soins très minutieux et une température édaphique élevée (Rejeb, 1995).

Le greffage consiste à greffer les pieds mâles par les femelles. En effet il s'agit de transférer les bourgeons prélevés sur les pieds femelles et de les greffer sur les pieds mâles. Les premiers rameaux apparaissent au bout de la 3<sup>ème</sup> semaine. Cette méthode permet aux arbres mâles de donner des fruits à partir de la troisième année, de produire des races garantissant la fructification et la préservation de la conformité des caractères sélectionnés chez la plante mère (Gharnit, 2003 ; Ait Chitt *et al.*, 2007).

La micropropagation ou la culture *in vitro* du caroubier est une technique prometteuse, qui permet d'obtenir une plante conforme à la plante d'origine, elle a été réalisée à partir de plantules et de plantes adultes (Batlle *et al.*, 1997), ainsi que de différents explants : nœuds prélevés des plantules issues de germination (Belaizi *et al.*, 1994), bourgeons axillaires, etc. (Saidi *et al.*, 2007).

### **I.3. Origine et répartition géographique**

#### **I.3.1. Origine du caroubier**

Le lieu d'origine du caroubier demeure douteux. Toutefois, De Candolle (1983) et Vavilov (1951) ont rapporté qu'il serait natif de la région Est-méditerranéenne (Turquie et Syrie).

Par contre, Schweinfurth (1894) a insinué qu'il est originaire des pays montagneux du Sud d'Arabie (Yémen). Tardivement, il a été considéré, par Zohary (1973), comme originaire de la flore d'Indo-Malaisie, groupé avec *Olea*, *Laurus*, *Myrtus* et d'autres plantes. Par ailleurs, *Ceratonia oreoethauma* est la seule espèce connue et originaire du Sud-est d'Arabie (Oumane) et des bordures de la corne africaine (Nord de Somalie) (Hillcast *et al.*, 1980).

#### **I.3.2. Répartition géographique**

Le caroubier est un arbre essentiellement méditerranéen, dont l'aire de répartition s'étend sur l'Asie mineure, l'Afrique du Nord, l'Europe méridionale et la péninsule Ibérique. En effet, on le rencontre en allant de l'Espagne et du Portugal jusqu'en Turquie, en passant

par le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Libye, l'Égypte, mais également en Syrie, en Yougoslavie, en Grèce, à Chypre, en Italie et en France (Gharnit, 2003). Il a été introduit avec réussite dans d'autres pays, notamment en Australie, en Afrique du Sud, aux États-Unis, aux Philippines, ainsi qu'en Iran (Rejeb *et al.*, 1991).

Actuellement on trouve le caroubier dans plusieurs pays, de l'Europe et de l'Afrique du Nord à l'état sauvage en association avec, l'oléastre, le thuya, le pin, le chêne vert, etc. (Batlle *et al.*, 1997).

Au Maroc le caroubier occupe une superficie de 30.000 ha, il est spontané et/ou cultivé. Il a une large répartition géographique: plaines, moyennes montagnes, jusqu'à 1700 m d'altitude, montagnes subdésertiques et ravins. Le caroubier étant un arbre très largement cultivé, il est actuellement difficile de savoir si les différents peuplements sont spontanés ou cultivés (Ait Chitt *et al.*, 2007).

En Tunisie, le Caroubier croît dans les conditions naturelles à l'état sauvage, en association avec l'olivier et le lentisque. Il est bien défini dans les étages humides, subhumides, et semi-arides supérieurs, à variante chaude à tempérée (Rejeb, 1989). Dans les conditions naturelles, on le rencontre à l'état sauvage en association avec l'olivier et le lentisque, et en mélange, avec le callitris, mais le défrichement de ces associations, à la faveur des cultures vivrières et des arbres fruitiers, rend cette végétation de plus en plus rare en Tunisie (Rejeb, 1995).

En Algérie, le Caroubier est fréquemment cultivé dans l'Atlas Saharien et il est commun dans le tell (Que zel et Santa, 1962). On le trouve à l'état naturel en association avec l'amandier, *Olea Europea* et *Pistacia Atlantica* dans les étages semi-arides chauds, subhumides et humides, avec une altitude allant de 100 à 1300 m dans les vallons frais qui le protègent de la gelée ; avec une température de 5° à 20°C et une pluviométrie de 80 à 600 mm/an (Rebour, 1968).

#### **I.4. Composition chimique du caroubier**

La gousse de caroube est riche en carbohydrates et particulièrement en sucres (40-60%) avec le saccharose (27-40%), le fructose (3-8%) et le glucose (3-5%) mais pauvre en lipides (0,4-0,6%) et en protéines (2-6%) (Avallone *et al.*, 1997) (Tableau 02).

**Tableau 02** : composition moyenne de la pulpe de caroube (Avallone *et al.*, 1997).

Composants	%
Sucres	40 - 60
Saccharose	27 - 40
Glucose	3 - 5
Fructose	3 - 8
Protéines	2 - 6
Lipides	0,4 - 0,6
Composées phénoliques	2 - 20
Cendres	2 - 3
Fibres	27 - 50

La gousse du caroubier présente une valeur énergétique importante (17,5 KJ/g de M.S) (Biner *et al.*, 2007).

Le caroubier contient également des composées phénoliques (2 à 20% de M.S) qui lui confèrent différents rôles : antioxydant, facilité de la digestion, baisse du taux cholestérol, ect. Différentes études ont montré que ces polyphénols sont essentiellement des tanins condensés (16 à 20%), des proanthocyanidines, des flavonoïdes, des ellagitanins, etc. (Owen *et al.*, 2003 ; Makris et Kefalas, 2004).

La gousse du caroubier contient d'autres composées comme les éléments minéraux et les vitamines.

### **I.5. Intérêts et utilisations du caroubier**

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

### **I.5.1. Arbre**

En raison de sa rusticité et de son adaptation aux contraintes de l'environnement, le caroubier est souvent utilisé, pour le reboisement et la reforestation des zones affectées par l'érosion et la désertification (Biner *et al.*, 2007). Il est également utilisé comme plante ornementale en bordure des routes et dans les jardins (Batlle *et al.*, 1997).

### **I.5.2. Fruit**

Le fruit du caroubier ou la caroube (fig. 2), se compose d'une pulpe enveloppant des graines régulières. En effet, la pulpe sucrée de la caroube est employé depuis longtemps, comme nourriture de bétail à côté d'autres aliments comme la farine d'orge (Ait Chitt *et al.*, 2007). Elle est utilisée dans l'industrie alimentaire humaine, grâce à sa teneur élevée en sucres et en composés phénoliques. Elle est également employée pour la production d'alcool (éthanol), d'acide citrique et comme substituant du cacao pour la fabrication de chocolat, car elle ne contient ni caféine ni théobromine (alcaloïdes). La farine de la pulpe entre dans la composition de plusieurs aliments comme, les biscuits, les farines lactées, etc. (Dakia *et al.*, 2007).

En pharmacopée traditionnelle, la pulpe est utilisée contre la diarrhée et pour le traitement de certaines maladies comme la gastrite, l'entérite, les angines, les rhumes, le cancer, etc. (Ait Chitt *et al.*, 2007).



**Figure 2 :** fruits mûres(a) et verts (b) du caroubier (Ait Chitt *et al.*, 2007).

Tous les constituants de la graine du caroubier (tégument, endosperme et cotylédon), jouent un rôle industriel et médical important, mais la gomme (endosperme) reste la plus importante, puisqu'elle est utilisée, comme agent stabilisateur, gélifiant, fixateur dans différents domaines comme l'agroalimentaire (fromage, mayonnaise, salades, etc.), le cosmétique (crèmes, dentifrices, etc.), l'industrie pharmaceutique (médicaments, sirops, etc.), la tannerie, le textile, etc. (Biner *et al.*, 2007 ; Dakia *et al.*, 2007).

### **I.5.3. Pulpe**

La farine issue de pulpe peut servir comme ingrédient de certains menus de pâtisseries: gâteau, pain, bonbon, crème glacée, boisson (Vidal, 1985), ou utiliser comme substituant du cacao dans le chocolat, car elle est moins calorifique et ne contient ni caféine ni théobromine. Par ailleurs, la pulpe a été le premier produit d'horticulture utilisé en fermentation, dans plusieurs pays méditerranéens, pour la production d'alcool industriel (Batlle *et al.*, 1997).

### **I.5.4. Graines**

Les graines de caroube sont bien appréciées et recherchées pour leurs qualités et multiples usages industriels. L'utilisation possible, dans l'industrie alimentaire, de polyphénol antioxydant contenu naturellement dans l'enveloppe tégumentaire (Makris et Kafalas, 2004) a soulevé d'énormes intérêts au même titre que la production industrielle de gomme de caroube (Batista *et al.*, 1996). La gomme issue de l'endosperme constitue le 1/3 du poids total de graine (Jones, 1953).

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

### **I.5.5. Feuilles**

Dans les domaines forestiers, les pieds mâles sont souvent taillés pour le fourrage. Plusieurs études ont montré que l'utilisation des feuilles associées avec le polyéthylène glycol (PEG) améliore la digestibilité et la qualité nutritive des tanins contenus dans les feuilles (Priolo *et al.*, 2000). Les extraits des feuilles qui contiennent de tanins ont été, en Turquie, utilisés dans la médecine traditionnelle pour traiter la diarrhée et dans l'alimentation diététique (Baytop, 1984). Ces extraits foliaires ont été également désignés comme étant porteurs des activités cytotoxiques et antimicrobiennes (Kivçak et Mart, 2002).

### **I.5.6. Ecorce**

L'écorce du caroubier a été toujours utilisée en tannerie, particulièrement dans l'achèvement et l'émaillage des peaux ([Batlle, 1997](#)). En Turquie, elle a été également utilisée par la médecine traditionnelle comme remède anti-diarrhée ([Baytop, 1984](#)).

## ***CHAPITRE II :***

### *Les polyphénols et le système antioxydant*

## **Chapitre II : Les polyphénols et le système antioxydant**

### **II.1. Généralités Sur Les Polyphénols**

Avec environ 9000 structures naturelles élucidées à ce jour, les polyphénols constituent une famille importante de métabolites secondaires de faible poids moléculaire du règne végétal (Akowauh *et al.*, 2004), ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la germination des graines ou la maturation des fruits (Lugasi *et al.*, 2003).

Ces corps jouent un rôle fondamental car ils sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux, et participent fortement aux critères de qualité (couleur, astringence, amertume...) qui orientent le choix de l'homme dans la consommation et l'utilisation des végétaux et des produits qui en dérivent par transformation (Macheix *et al.*, 2005).

Deux principaux produits sont tirés de la caroube. La gomme, extraite de l'endosperme de la graine, est utilisée dans les industries agro-alimentaires, pharmaceutiques etc (Sbay, 2008). La farine, obtenue en séchant, torréfiant et moulant les gousses après les avoir débarrassées de leurs graines, est employée pour la production industrielle de bioéthanol et d'acide citrique (Makris et Kefalas, 2004) mais surtout en agroalimentaire comme antioxydant grâce à sa composition riche en polyphénols.

#### **II.1.1. Biosynthèse et Classification des Composés Phénoliques**

Les composés phénoliques regroupent un vaste ensemble de substances chimiques, dont plusieurs milliers ont été identifiés chez les végétaux. Bien qu'étant très diversifiés, ils ont toujours en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles, en plus d'autres composants. Les composés phénoliques sont synthétisés soit par la voie du shikimate (phénols, coumarines, tanins et lignanes), soit par celle de l'acétate (les quinones, les orcinols et les phloroglucinols). Par ailleurs, la voie des polyacétates intervient pour les végétaux supérieurs pour des composés possédant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie des shikimates (Macheix *et al.*, 2005).



### II.1.1.1 Classification de quelques extraits phénoliques

De très nombreux composés phénoliques ont été caractérisés à ce jour. Ils ont tous en commun la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles. Ils peuvent être répartis en plusieurs classes, selon la complexité de leur squelette de base, du degré de modification de ce squelette et des liaisons possibles de ces composés avec d'autres molécules (Macheix *et al.*, 2005).

#### II.1.1.1.1. Les flavonoïdes

Ils constituent le plus large groupe des phénols dans la plante. Ces pigments sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles aussi sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (Hadi, 2004).

Etant de distribution ubiquitaire au sein des végétaux, les flavonoïdes pourraient être à l'origine des vertus préventives et curatives de plusieurs plantes médicinales (Bruneton, 1999).

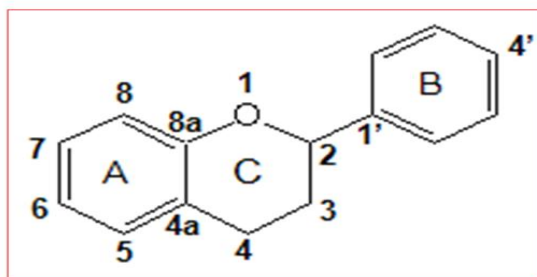


Figure 03 : Structure de base des flavonoïdes (Heim *et al.*, 2002).

#### II.1.1.1.2. Les tanins

Les tanins (ou tannins) sont des substances d'origine végétale, ayant la propriété de « tanner » les peaux c'est-à-dire de les rendre dures et imputrescibles, en se fixant sur les protéines, d'où leur utilisation la plus importante dans le nettoyage du cuir et le rendre stable (Haslam, 1989). Ils sont caractérisés par leurs effets astringents (sensation de dessèchement en bouche), très utiles quand il y a trop de sécrétions (les bronchites, les diarrhées, les plaies saigneuses).

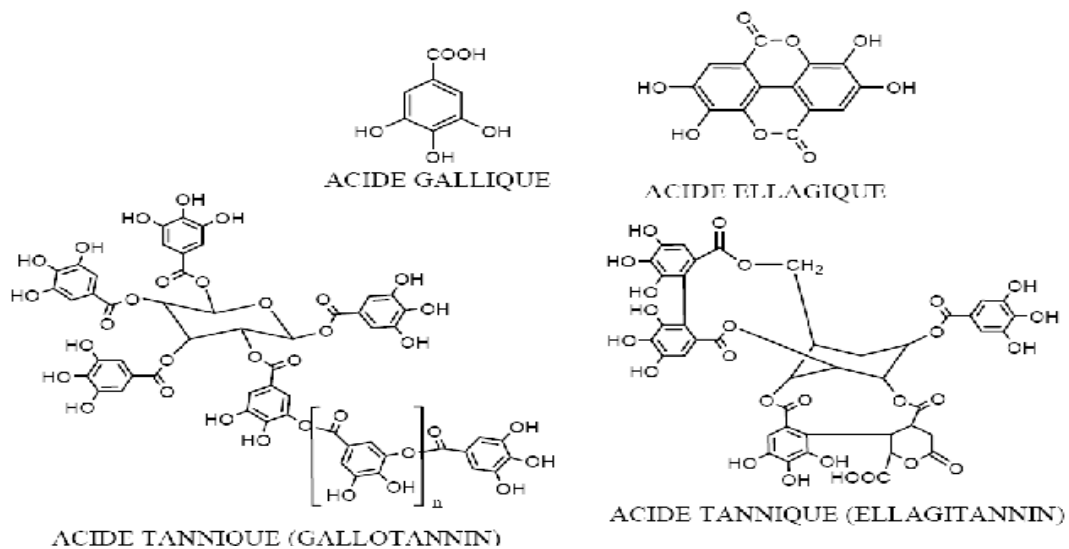
Les tanins peuvent avoir un effet positif sur la réduction de la nourriture consommée (Reese *et al.*, 1982) et un effet toxique causé principalement par les tanins hydrolysables, par contre les tanins condensés sont beaucoup moins toxiques car ils ne traversent pas la barrière intestinale (Biaye, 2002).

On peut distinguer deux grands groupes de tanins :

➤ **Les tanins hydrolysables**

Les tanins hydrolysables sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique. Ce sont des esters d'oses et d'acides phénoliques (acides gallique ou ellagique). Ils incluent les gallotannins et les ellagitannins.

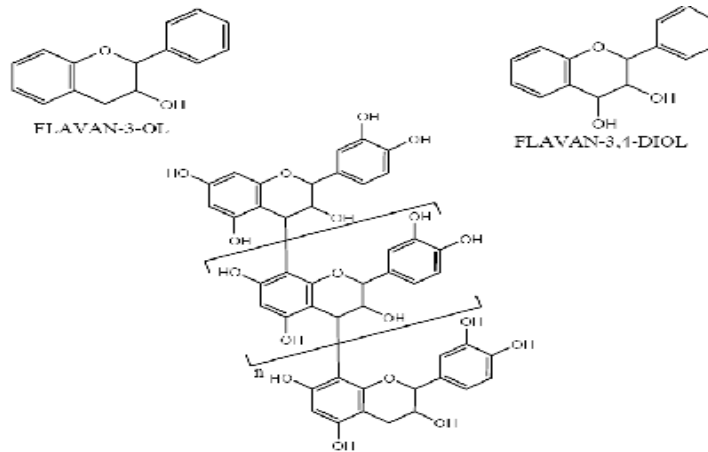
La variation structurelle entre les différentes molécules est causée par la nature du couplage oxydatif entre les unités d'acide gallique ou par l'oxydation des noyaux aromatiques (Mueller Harvey, 2001).



**Figure 04:** Structure des tanins hydrolysables (Bruneton, 1999).

➤ **Les tanins condensés**

Contrairement aux tanins hydrolysables, ils sont résistants à l'hydrolyse et seules des attaques chimiques fortes permettant de les dégrader (Dixon *et al.*, 2005). Par la formation de complexes avec les protéines, les tanins condensés sont responsables du caractère astringent des fruits et des boissons ainsi que de l'amertume du chocolat. Certains effets physiologiques chez l'animal (croissance) sont dus également à ces interactions (Cosme *et al.*, 2008).



**Figure 05:** Structure des tanins condensés (Bruneton, 1999).

#### II.1.1.1.3. Les coumarines

Les coumarines constituent une classe importante des produits naturels répandus dans tout le règne végétal. Ces composés manifestent beaucoup d'activités biologiques, telles que l'activité antifongique, anti-tumorale, antivirale, anti-inflammatoire, diurétique et analgésique (Maged, 2003), ils empêchent d'une manière sélective la croissance des cellules cancéreuses (Reddy *et al.*, 2005).

#### II.1.1.1.4. Les lignanes

Ils constituent une classe importante de métabolites secondaires dans le règne végétal. L'accumulation des lignanes est importante pour la longévité des espèces, ils fonctionnent comme des phytoalexines, devront assurer la protection pour les plantes contre les maladies et les parasites. Les lignanes sont aussi des antioxydants spéciaux qui ont fait preuve de remarquables effets bénéfiques sur la santé, ils ont entre autres une activité antifongique, anti-inflammatoire et bactéricide. En plus, ils agissent contre le diabète et les taux élevés de cholestérol (Raffaëlli *et al.*, 2002).

### II.1.2. Propriétés biologiques et effet santé des polyphénols

Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'années un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs.

En effet, les polyphénols font partie de ce que l'on appelle les phyto-micronutriments. Ce sont les antioxydants les plus abondants dans les aliments puisque l'homme en consomme environ 1 g/jour (Scalbert et Williamson, 2000), soit près de dix fois plus que de vitamine C et 100 fois plus que de vitamine E ou de caroténoïdes (Grolier *et al.*, 2001).

Les polyphénols neutralisent les radicaux libres et contribuent ainsi à prévenir diverses pathologies dégénératives telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, la cataracte, les maladies du système nerveux central ou déficiences immunitaires...

L'effet protecteur des polyphénols contre l'oxydation des LDL est bien établi *in vitro* et pourrait s'expliquer par un effet d'épargne d'autres antioxydants lipophiles tels que la vitamine E intégrée dans la phase lipidique des LDL (Vaheer et Koel, 2003).

## **II.2. Stress oxydant et système antioxydant**

C'est la capacité de capter ou de piéger les radicaux libres produits spontanément et d'une façon continue dans l'organisme vivant.

### **II.2.1. Radicaux libres**

Par définition, sont des entités chimiques possédant un électron non apparié « célibataire » sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Cet électron célibataire a naissance suite à un apport d'énergie susceptible et suffisant pour entraîner la rupture des liaisons entre les électrons (Servais, 2002).

Ils peuvent être des ERO ou des espèces réactives de l'azote (ERA) (Afonso *et al.*, 2007).

Les radicaux libres sont doués d'une forte réactivité, qui peut mener à un désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, protéines cellulaires, les acides nucléiques, et ainsi provoquant la mort cellulaire (Marfak, 2003). Il existe deux sources différentes de ces radicaux libres:

#### **II.2.1.1. Sources endogènes**

Les réactions enzymatiques, dont plusieurs d'entre elles sont considérées comme source principale des ROS ex ; NADPH oxydase, lipoxygénase, xanthine oxydase (enzyme dans le foie).

La mitochondrie est un élément fondamental pour le fonctionnement de la cellule, dans lequel s'effectue la respiration cellulaire. La consommation de l'oxygène et les différentes réactions du transfert des électrons (énergie) produisent en performance les ROS. Les ions métalliques présents dans l'organisme ex ; fer cuivre, peuvent coopérer avec des espèces moins réactives pour produire des radicaux hydroxyles (Servais, 2002).

#### **II.2.1.2. Sources exogènes**

Les ROS sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, la consommation d'alcool ou médicaments (dont leurs structures peuvent jouer le rôle des accepteur et donneurs d'électron), l'exposition prolongée au soleil, l'effort intense et prolongé ainsi que le tabagisme ; Les facteurs interagissant lors des inflammations. Toutes ces situations provoquent une surproduction des ROS dans l'organisme (Fuorocci, 2006).

#### **II.2.2 .Les antioxydants**

Toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat est appelée antioxydant. Le terme de substrat oxydable inclut toutes sortes de molécules *in vivo* (Halliwell, 1999).

L'organisme est capable, dans certaines mesures, de limiter les dommages dus aux radicaux libres, grâce à des mécanismes de défense développés au cours de l'évolution (Hennebelle, 2006).

#### **II.2.3. Système de défense antioxydant**

Les ERO, molécules produites par divers mécanismes physiologiques, sont utiles à l'organisme à une certaine dose, mais leur production peut devenir excessive ou résulter de mécanismes toxiques exogènes (Gueye, 2007). L'organisme est doté d'un ensemble de système de défenses très efficace contre la surproduction d'ERO et d'ERN.

Le terme antioxydant désigne toute substance, qui présente à faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable (protéine, lipide, acide nucléique), retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell, 1995).

La nature du système antioxydant varie en fonction des tissus et des types cellulaires et selon qu'il s'agisse de milieu intracellulaire ou extracellulaire (Chaudiere et Ferrari-iliou,

1999). Dans l'organisme, on distingue des systèmes antioxydants enzymatiques et des systèmes non enzymatiques.

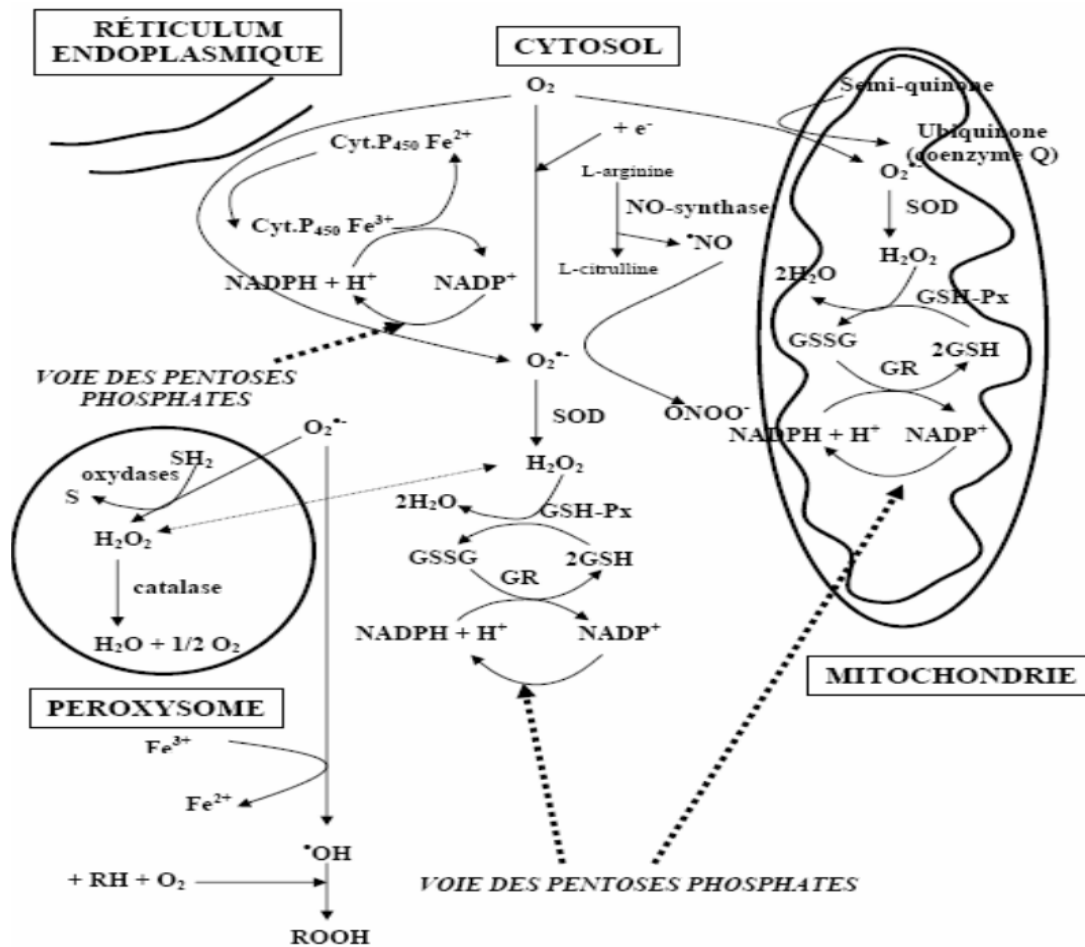


Figure 06: Principales sources cellulaires de radicaux libres (Gueye, 2007).

### II.2.3.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

#### II.2.3.1.1. La superoxyde dismutase

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire (Zelko *et al.*, 2002).

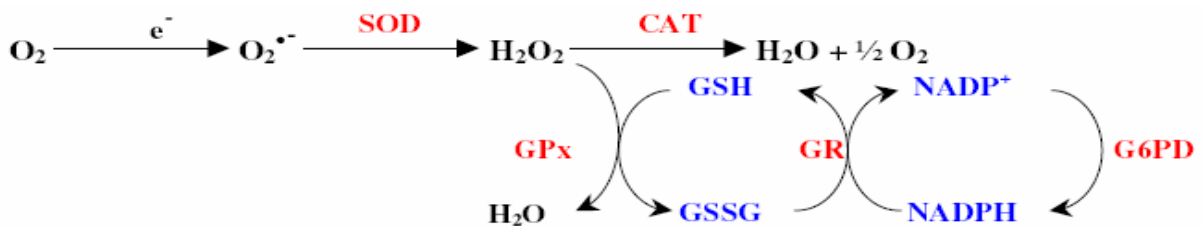
### II.2.3.1.2. Réaction à la catalase

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire (Sorg, 2004), selon la réaction :



### II.2.3.1.3. Réaction à la glutathion peroxydase

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur (Sorg, 2004). Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :



### II.2.3.1. Systèmes antioxydants non enzymatiques

L'action protectrice des enzymes est complétée par des molécules antioxydantes pouvant être d'origine endogène, synthétisées par l'organisme, ou exogène lorsqu'elles sont apportées par l'alimentation (Pincemail *et al.*, 2007).

#### II.2.3.1.1. Composés endogènes :

Ce groupe de systèmes antioxydants renferme de nombreuses substances endogènes parmi lesquelles on peut citer le glutathion, l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque. De tous ces composés endogènes synthétisés par les cellules, le plus important est sans doute le glutathion réduit (thiol majeur au niveau intracellulaire)

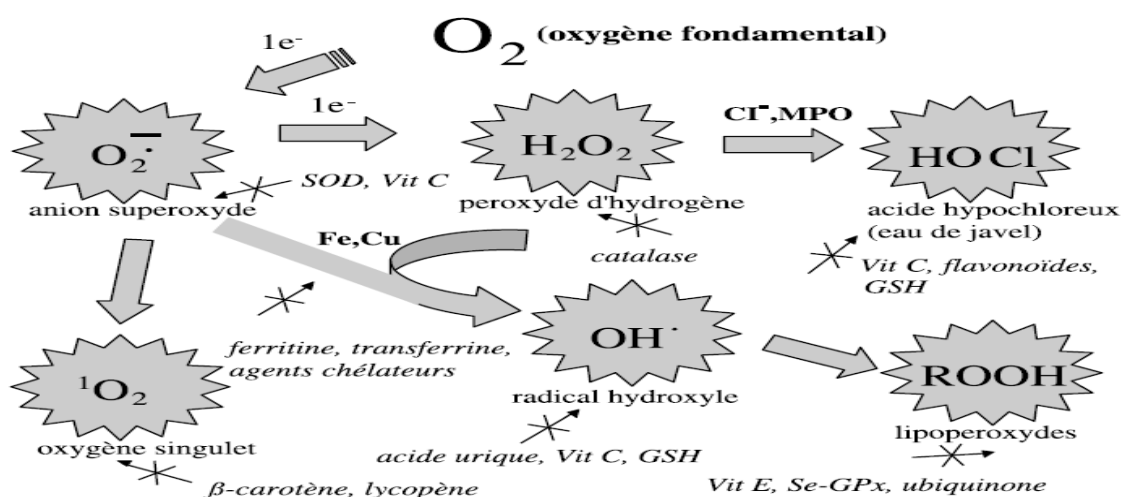
(Favier, 2003). La bilirubine est, quant à elle, capable de piéger les radicaux peroxydes et l’oxygène singulier, protégeant ainsi l’albumine et les acides gras liés à l’albumine des attaques radicalaires (Neuzil et Stocker, 1993).

Les protéines chélatrices de métaux de transitions comme l’haptoglobine, la ferritine, l’albumine et la céruloplasmine agissent en diminuant la disponibilité d’agents pro-oxydants, comme les ions  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  ou  $Cu^{2+}/Cu^{+}$  permettant par ce biais de prévenir la production des radicaux libres par la réaction de Fenton (Martínez-Cayuela, 1995).

### II.2.3.1.1. Composés exogènes

Les substances exogènes sont apportées par l’alimentation, telles que les vitamines E (tocophérol), C (acide ascorbique), Q (ubiquinone), ou les caroténoïdes agissent en piégeant les radicaux et en neutralisant l’électron non apparié, les transformant ainsi en molécules stables (Pincemail *et al.*, 2002). La vitamine piégeuse devient à son tour un radical qui sera détruit ou régénéré par un autre système. A titre d’exemple, la vitamine E est régénérée par la vitamine C, elle-même régénérée par les ascorbates réductases (Pincemail *et al.*, 2002). Des composés comme les alcaloïdes, les polyphénols et les phytates, huiles essentielles (Bruneton, 1999) et les flavonoïdes apportés également par l’alimentation, jouent un rôle similaire de piégeurs de radicaux libres (Koechlin– Ramonatxo, 2006).

La figure 07 illustre la régulation de la production d’espèces réactives de l’oxygène par les systèmes de défense antioxydants.



**Figure 07 :** Régulation de la production d’espèces réactives de l’oxygène par les systèmes de défenses antioxydants (Pincemail *et al.*, 2002).



## **II.2.4. Stress oxydatif**

### **II.2.4.1. Définition**

Le stress oxydatif réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défenses antioxydantes, que ce soit par une augmentation de la production d'oxydants et/ou par une diminution des défenses antioxydantes, ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, métaux toxiques) (Sorg, 2004).

### **II.2.4.2. Origine du stress et ses conséquences biologiques**

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé « stress oxydant » (Favier, 2003).

Ce déséquilibre peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, herbicides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Pincemail *et al.*, 2002 ; Sorg, 2004). L'accumulation des EOR a pour conséquence l'apparition de dégâts cellulaires et tissulaires souvent irréversibles dont les cibles biologiques les plus vulnérables sont les protéines les lipides et l'acide désoxyribonucléique (Halliwell *et Whiteman*, 2004; Valko *et al.*, 2006).

### **2.4.3. Les espèces réactives de l'oxygène**

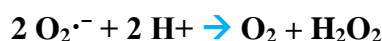
Un radical libre est une espèce chimique possédant un électron célibataire sur sa couche périphérique. Dans les phénomènes de stress oxydant, les radicaux libres qui interviennent ont une propriété caractéristique commune, celle d'avoir un électron célibataire sur un atome d'oxygène (Gardès *et al.*, 2005).

(Le symbole • indique la présence d'un électron célibataire.)

➤ **Le radical superoxyde,  $O_2^{\cdot-}$**

L'anion superoxyde est une ERO primaire, formée par l'acquisition d'un électron par l'oxygène moléculaire. Radical ayant la réactivité la plus faible parmi les radicaux libres du stress oxydant, il est généré à partir de différentes sources dans les conditions physiologiques et physiopathologiques (Gardès *et al.*, 2005). Il est cependant hautement réactif avec certains métaux de transition comme le cuivre, le fer et le manganèse (Abreu *et al.*, 2010).

Le radical superoxyde ne traverse pas rapidement la membrane plasmique et se dismute spontanément au pH physiologique en produisant du peroxyde d'hydrogène :



Bien que le radical superoxyde ne soit pas considéré comme particulièrement réactif, son principal danger vient de sa réaction de neutralisation productrice de peroxyde d'hydrogène ou d'acide hypochloreux nettement plus puissants.

L'anion superoxyde est produit de manière physiologique dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie consommatrice d'oxygène et productrice d'énergie pour la cellule. La mitochondrie est ainsi la source principale d'anion superoxyde dans les cellules en condition physiologique (Lambert *et al.*, 2009). Les peroxyosomes ainsi que le cytochrome p450 constituent également des sources endogènes d' $O_2^{\cdot-}$ . Il existe également des sources exogènes d'anion superoxyde comme la fumée de cigarette ou les radiations ionisantes particulièrement impliquées dans les pathologies pulmonaires (Ames *et al.*, 1993).

Au cours de l'inflammation intestinale, il est généré en grande quantité par les neutrophiles et les macrophages qui colonisent la muqueuse. Ces cellules en contact avec les agents inflammatoires développent une flambée respiratoire riche en anion superoxyde destiné à la destruction des bactéries ou des cellules infectées par les virus (Ames *et al.*, 1993). Ce processus implique l'activation de la NADPH oxydase membranaire induisant le relargage de grandes quantités d'EROs. Bien que l'anion superoxyde ne soit pas l'ERO la plus effective dans la lutte contre les infections, sa production continue au cours de processus inflammatoires peut induire des atteintes tissulaires (Kruidenier *et al.*, 2002).

➤ **Le peroxyde d'hydrogène,  $H_2O_2$**

Bien que le peroxyde d'hydrogène ne puisse être considéré comme un radical au sens propre, cette molécule dérivée de l'oxygène joue un rôle central dans le phénomène du stress

oxydant. Tout système produisant le radical superoxyde génèrera par voie de conséquence du peroxyde d'hydrogène. Ainsi, les cellules phagocytaires produisent et relarguent de grandes quantités d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au cours de l'inflammation. Bien qu'il induise des atteintes aspécifiques et irréversibles des cellules épithéliales (Mulier *et al.*, 1998), le peroxyde d'hydrogène est généralement considéré comme une ERO relativement faible mais hautement réactive, en particulier dans sa capacité à réagir avec les ions partiellement réduits Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>+</sup> formant le radical hydroxyle dans la réaction de Fenton (Wardman *et al.*, 1996) :



➤ **L'acide hypochloreux, HOCl**

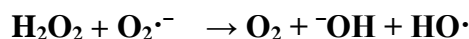
Comme le peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux ne rentre pas dans la définition stricte du radical. Cependant, au cours de l'inflammation, la métabolisation du peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux par l'enzyme MPO est élevée et l'acide hypochloreux est un agent chlorant et oxydant fort.



L'acide hypochloreux est considéré comme 100 à 1000 fois plus toxique que le radical superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène et a des cibles bien marquées : inactivation enzymatique, oxydation des groupements thiols de la membrane plasmique, diminution des propriétés d'adhésion de certains composés de la matrice extracellulaire.

➤ **Le radical hydroxyle, HO·**

Comme indiqué précédemment, le radical hydroxyle est formé à partir du peroxyde d'hydrogène au cours de la réaction de Fenton ou à partir de l'anion superoxyde dans la réaction d'Haber-Weiss :



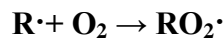
HO· est considéré comme l'ERO la plus réactive (Lubec, 1996), inactivant le pyruvate déshydrogénase de la mitochondrie, dépolymérisant le mucus du tractus gastro-intestinal ou induisant directement des atteintes oxydatives à l'ADN.

Le radical hydroxyle est produit durant l'inflammation en grande quantité lors des interactions entre l'anion superoxyde et l'acide hypochloreux, entre l'acide hypochloreux et

les ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou le peroxyde d'hydrogène et le monoxyde d'azote (Kruidenier *et al.*, 2002).

### ➤ Les radicaux peroxydes

Les radicaux peroxydes sont des radicaux secondaires issus de l'addition de l'oxygène sur les radicaux centres sur le carbone ( $\text{R}\cdot$ ). Les radicaux  $\text{R}\cdot$  sont issus de l'action des radicaux hydroxydes sur les substrats biologiques (par arrachement d'atome d'hydrogène ou addition sur les doubles liaisons).



Plusieurs modes d'actions sont décrits pour les propriétés oxydantes des radicaux peroxydes : transfert de charge (arrachement d'un électron) ou d'un atome d'hydrogène (arrachement d'un atome H), addition sur les doubles liaisons (réactions intramoléculaires ou intermoléculaires) et formation d'endoperoxydes radicalaires  $\text{ROOR}\cdot$ . Les radicaux  $\text{RO}_2\cdot$  peuvent également se décomposer avant d'avoir réagi avec un substrat en donnant des radicaux superoxydes (Gardes *et al.*, 2005).

La figure 08 ci-dessous illustre les différents types d'espèces réactives oxygénées.

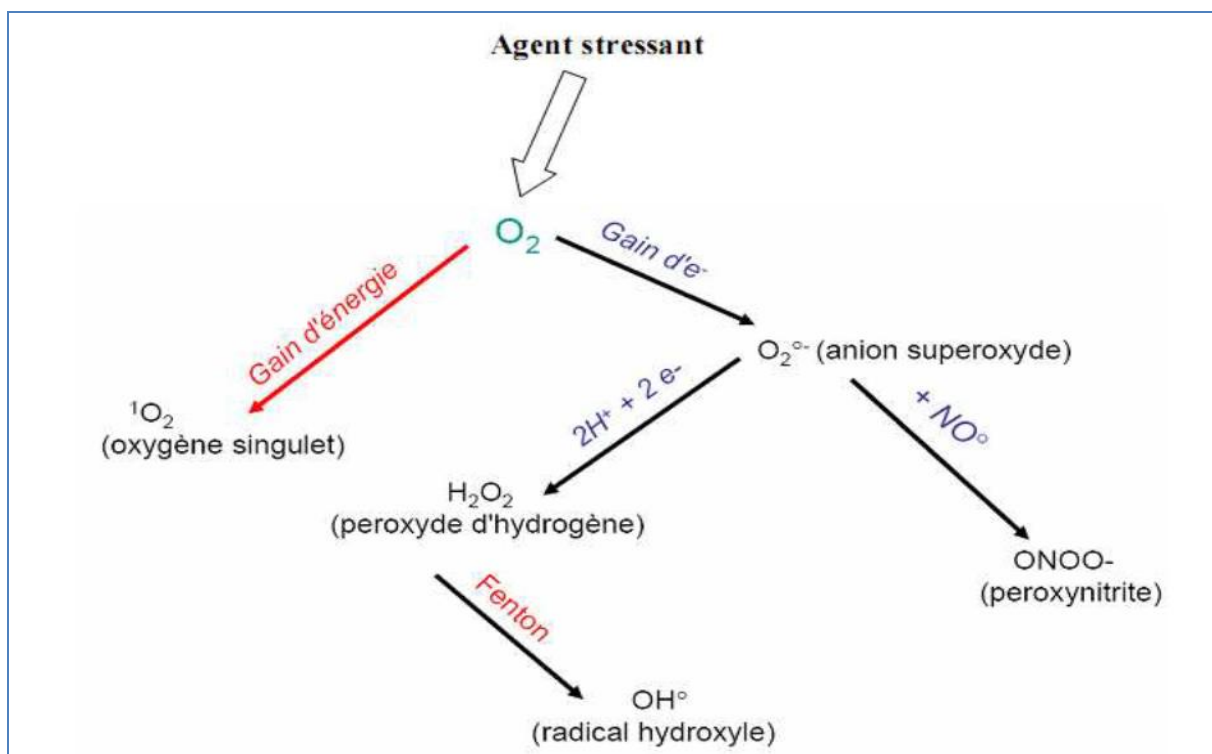


Figure 08 : Les différentes espèces réactives oxygénées (Nzengue, 2008).

#### **2.4.4. Les espèces réactives de l'azote**

Par analogie avec les espèces réactives de l'oxygène, les métabolites dérivés de l'azote sont nommés espèces réactives de l'azote ; il s'agit du monoxyde d'azote ( $\cdot\text{NO}$ ) et du peroxy-nitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). Le monoxyde d'azote est produit de manière endogène lors du métabolisme de l'arginine par les « nitric oxide synthases » (NOS) dans des conditions physiologiques et physiopathologiques. L'isoforme inductible iNOS de l'enzyme peut être exprimée en réponse aux agents pro-inflammatoires, produisant ainsi de grandes quantités de monoxyde d'azote comparativement aux faibles quantités générées par l'isoforme endothéliale eNOS (Rao, 2004). Le monoxyde d'azote lui-même se caractérise par une diffusivité élevée, une réactivité limitée et une demi-vie qui n'excède pas quelques secondes, il n'est donc pas particulièrement délétère pour les structures cellulaires (Blanc *et al.*, 2005). Cependant le  $\cdot\text{NO}$  peut interagir rapidement avec l'anion superoxyde et produire du peroxy-nitrite beaucoup plus réactif et délétère que ses précurseurs (Murphy *et al.*, 1998).



Le peroxy-nitrite a une demi-vie plus longue et traverse facilement les membranes lipidiques. Il oxyde les lipides composant les membranes mitochondriales, altère les canaux sodiques et favorise la perméabilité vasculaire et la formation d'œdème (Kruidenier *et al.*, 2002).

#### **2.4.5. Les cibles des EROs et des ERAs**

Les EROs et ERAs induisent des atteintes oxydatives sur des composés cellulaires et extracellulaires en général proches de leur site de production du fait de leur demi-vie relativement courte.

##### **2.4.5.1. Oxydation des composés lipidiques**

Les acides gras polyinsaturés ainsi que les phospholipides membranaires sont les cibles privilégiées des attaques oxydatives. Les membranes sont plus particulièrement visées par le radical hydroxyle capable d'arracher un atome d'hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxy. Cette réaction de peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxy formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué. Ce processus génère des hydroperoxydes qui peuvent continuer à s'oxyder et

à se fragmenter en aldéhydes et en alcanes (éthane, éthylène, pentane). Le radical peroxyde peut, quant à lui, libérer différents aldéhydes toxiques dont le malondialdéhyde (MDA) ou l'hydroxynonéal (Kruidenier *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006).

Ainsi un unique évènement oxydatif peut altérer de nombreuses molécules lipidiques et induire une accumulation d'hydroperoxydes dans les membranes ce qui réduira leur fluidité ainsi que l'activité des protéines transmembranaires (Kruidenier *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006).

#### **2.4.5.2. Oxydation des composés protéiques**

Les protéines sont les constituants cellulaires les plus abondants et sont par voie de conséquence des cibles importantes du stress oxydant. La modification structurale mineure d'une protéine peut induire une forte variabilité dans le fonctionnement de celle-ci. Comme pour les lipides, c'est le radical hydroxyle qui est le plus réactif pour induire des altérations oxydatives des protéines introduisant de nouveaux groupes fonctionnels comme des fonctions hydroxyles ou carbonyles qui contribuent aux altérations des fonctions des protéines. L'oxydation induit également des modifications de conformation ainsi que des phénomènes de fragmentation (Kruidenier *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006). L'oxydation des protéines peut également induire des modifications structurales plus importantes comme des réticulations intra ou intermoléculaires, ce qui affecte leurs fonctionnements, antigénicités et leurs activités (Martinez-Cayuela, 1995). Le stress oxydant peut avoir un effet sur la fonction propre d'une protéine mais peut également avoir des répercussions sur l'ensemble de la régulation cellulaire (Kruidenier *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006).

De plus, la nitration des protéines par liaison du peroxyde d'azote sur les fonctions tyrosine peut induire de sévères modifications de fonction. En effet, la tyrosine est un acide aminé particulièrement impliqué dans les voies de signalisation, en particulier par les réactions de phosphorylation/déphosphorylation. Ainsi le stress oxydant peut avoir un effet sur la fonction propre d'une protéine mais peut également avoir des répercussions sur l'ensemble de la régulation cellulaire (Kruidenier *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006).

#### **2.4.5.3. Oxydation de l'ADN**

Les ADN nucléaire et mitochondrial sont également des cibles des EROs. Les altérations les plus communes sont l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques et du squelette désoxyribose provoquant le clivage des brins et des mutations génétiques (Valko *et*

*al.*, 2006). Ces altérations de la molécule d'ADN peuvent conduire soit à l'arrêt de l'induction de la transcription ou de la transduction des voies de signalisation, soit à des erreurs de réplication, soit à une instabilité génomique et l'ensemble est associé au phénomène de carcinogénèse (Valko *et al.*, 2006). Une des altérations fréquentes de l'ADN est l'oxydation de la guanine par le radical hydroxyle formant la 8-hydroxy-guanine (8-OHG).

Ce produit de l'oxydation de l'ADN peut être facilement dose dans les urines et est considéré comme un marqueur de carcinogénèse (Valko *et al.*, 2006). Les ERAs peuvent également induire des oxydations de l'ADN et le monoxyde d'azote ou le peroxyde d'azote peuvent oxyder la chromatine. De plus, le peroxyde d'azote peut induire la formation de 8-nitroguanine (Kruidenier *et al.*, 2002; Valko *et al.*, 2006). Comme pour les autres composés, la majorité des altérations oxydatives de l'ADN sont induites par le radical hydroxyle.

Lorsque le peroxyde d'hydrogène échappe aux enzymes de régulation, il gagne le noyau de la cellule et réagit avec les ions Fe<sup>2+</sup> et Cu<sup>+</sup> associés à la chromatine produisant ainsi in situ le radical hydroxyle qui attaque l'ADN proche (Kruidenier *et al.*, 2002).

## *Partie expérimentale*



# ***CHAPITRE III :***

## *Matériels et méthodes*

## **Chapitre III : Matériels et méthodes**

### **Partie 1 : Etude *in vitro* de la caroube**

#### **III.1.1. Matériel biologique :**

##### **III.1.1.1. Récolte des gousses de *Ceratonia siliqua* L.:**

Le matériel végétal, constitué de gousses de caroubier mûres, a été collecté dans la commune d'Ouled Kihal de la wilaya d'Ain Témouchent en Octobre 2011 (fig. 10).

Les fruits ont été essuyés à l'aide d'une compresse stérile, puis laisser séchés à l'ombre à l'abri de la lumière et à température ambiante.



**Figure 09 :** les gousses de caroube.

##### **III.1.1.2. Extraction des gousses de *Ceratonia siliqua* L.:**

L'extraction a été effectuée selon la méthode de [Ben Hsouna \*et al.\* \(2011\)](#).

Après séchage, les graines ont été séparés des gousses, ces derniers ont été décortiqués à la main puis broyés (fig. 11) pour obtenir une poudre fine qui a été extraite avec de l'éthanol 70%, l'eau distillée ou le méthanol 80 % (1 :10, p/v), dans un récipient en verre fermé hermétiquement pendant 24 heures. L'extraction a été réalisée à température ambiante dans l'obscurité (en absence de lumière). Les suspensions sont ensuite filtrées à travers le papier whatman N°1, puis les solvants ont été évaporés à sec sous vide à une température de 60°C. Ces filtrats représentent l'extrait éthanolique de la caroube (EEC), l'extrait d'eau distillée de caroube (EWC) et l'extrait méthanolique de la caroube (EMC).



**Figure 10:** la farine des gousses de caroube.

### III.1.2. Analyse des paramètres physico-chimiques

#### III.1.2.1. Détermination de la matière sèche

La méthode utilisée est la dessiccation par évaporation. Mettre 1 ml de chaque EEC, EWC ou EMC dans une capsule en porcelaine, puis séchée dans une étuve réglée à une température de  $103 \pm 2^\circ\text{C}$ , jusqu'à obtention d'un poids constant (Audigié *et al.*, 1983).

➤ **Mode opératoire :**

- Sécher les capsules vides à l'étuve durant 15 min à  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  ;
- Tarer les capsules après refroidissement dans un dessiccateur ;
- Verser dans chaque capsule 1 ml d'EEC ou d'EMC, ensuite peser les capsules et les placer dans l'étuve réglée à  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 3h ;
- Retirer les capsules de l'étuve, les placer dans un dessiccateur et après refroidissement les peser ;
- L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant (en réduisant la durée de séchage à 30 min) pour éviter la caramélisation.

➤ **Expression des résultats :**

La matière sèche (MS) est obtenue comme suit :

$$(M.S)\% = M2-M1$$

**M1** : La masse(en g) de la capsule et du résidu après dessiccation.

**M2** : La masse (en g) de la capsule et de la prise d'essai.

#### III.1.2.2. Détermination de la teneur en eau

Pour déterminer la teneur en eau, on fait une dessiccation de la matière fraîche à la température de  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  dans une étuve isotherme ventilée à la pression atmosphérique jusqu'à un poids pratiquement constant (Audigie *et al.*, 1978).

La teneur en eau est la différence entre le poids de l'échantillon avant et après la dessiccation lorsque leur poids soit constant.

$$H\% = \frac{M1 - M2}{P} \times 100$$

**H%** : Le taux d'humidité ou la teneur en eau ;

**M1** : La masse (en g) de la capsule avec l'échantillon et avant la déshydratation.

**M2** : La masse (en g) de la capsule avec l'échantillon et après la déshydratation.

**P** : La masse (en g) de la prise d'essai.

### III.1.2.3. Détermination de la teneur en cendre

#### ➤ Principe

Le principe consiste en une incinération du matériel biologique au four à moufle, dans un creuset en porcelaine, à une température de 900°C (Audigie et Dupont, 1982).

L'opération ne sera terminée que lorsque la couleur des résidus deviendra blanche grisâtre, qui se transformera en une couleur blanche après refroidissement.

#### ➤ Mode opératoire

- Régler le four à moufle à 900°C;
- Peser les creusets en porcelaine vides;
- On met 2g de la farine de caroube dans les creusets et on les introduit dans un four à moufle à 900°C jusqu'à ce que le contenu des creusets prenne une couleur blanc grisâtre qui blanchit après refroidissement dans un dessiccateur ;
- Enfin, on pèse les creusets avec les cendres.

#### ➤ Expression des résultats

$$Tc\% = \frac{M1 - M2}{P} \times 100$$

**Tc%** : La teneur en cendres (%).

**M1** : La masse (en g) de la capsule et la matière sèche avant l'incinération.

**M2** : La masse (en g) de la capsule avec les cendres.

**P** : La masse (en g) de la prise d'essai.

### **III.1.2.4. Détermination de la teneur en matière grasse**

#### **➤ Principe**

Les lipides sont solubles à chaud ou à froid dans les solvants organiques tels que l'éther de pétrole, l'exhane, l'acétone, l'éthanol, etc.

La détermination des matières grasses est faite selon la méthode d'extraction par le SOXHLET en utilisant l'éther de pétrole comme solvant.

A la fin de l'extraction, on peut admettre que toute la matière grasse est transférée dans le solvant.

#### **➤ Mode opératoire :**

- Peser 25g de farine de caroube et la mettre dans une cartouche.
- Placer la cartouche dans le siphon de SOXHLET en l'ayant recouvert avec du coton.
- Peser le ballon qui servira à recouvrir le solvant et y introduire 250 ml l'éther de pétrole dans le ballon.
- Alimenter le réfrigérant (0 à 4°C) en le branchant à un robinet.
- Brancher la prise du chauffe ballon en réglant la température à 60°C.
- Effectuer 4 à 6 siphonages. Débrancher le chauffe-ballon. Arrêter le robinet après refroidissement puis démonter l'appareil.
- Chasser la majeure partie du solvant à l'aide du Rotavapor pour éviter l'ébullition de l'huile qui à la longue pourrait modifier les indices d'acidité.
- Placer le ballon contenant les lipides à l'étuve pendant 30 min à 103°C, puis au dessiccateur pendant 30 min.

#### **➤ Expression des résultats**

Le taux de la matière grasse est calculé par la formule suivante :

$$\text{MG \%} = \frac{\text{P1} - \text{P2}}{\text{ME}} \times 100$$

**P1** : Le poids du ballon après évaporation.

**P2** : Le poids du ballon vide.

**ME** : La masse de la prise d'essai.

**MG** : Le taux de la matière grasse.

### **III.1.2.5. Dosage des sucres totaux**

Le dosage des sucres totaux est effectué par la méthode de phénol / acide sulfurique, qui permet de doser les oses et les oligosides (Dubois *et al.*, 1956).

#### ➤ **Principe**

En présence de phénol, ces composés donnent une couleur jaune orange dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides ; la densité optique est déterminée à 488nm.

#### ➤ **Mode opératoire**

Dans un tube, mettre 0,5 ml de filtrat de caroube (la farine de caroube est macérée dans l'eau distillée 1 /10 (p/v)), ensuite ajouter 0,5 ml de phénol (5 %) et 2,5 ml d'acide sulfurique H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Le milieu réactionnel est agité, puis laissé reposer à température ambiante avant d'être placé dans un bain marie pendant 15 minutes à 25°C, puis le laisser reposer à l'obscurité pendant 30 min. Enfin, à l'aide d'un spectrophotomètre, lire la densité optique à une longueur d'onde de 488 nm (Dubois *et al.*, 1956).

La courbe d'étalonnage ( $Y = aX + b$ ) est obtenue avec le glucose avec une gamme de concentration allant de 0 à 100 mg/ml.

### **III.1.2.6. Dosage des protéines brutes**

#### ➤ **Principe :**

Le dosage des protéines est effectué par une méthode de dosage colorimétrique (Lowry *et al.*, 1951).

Dans cette technique, les protéines réagissent avec le réactif de Lowry pour donner des complexes colorés. La coloration obtenue est due à la réaction du cuivre alcalin avec les protéines et à la réduction du réactif phosphomolybdique par la tyrosine et le tryptophane. L'intensité de la

coloration est mesurée à 660 nm. Elle dépend de la quantité d'acides aminés aromatiques présents et elle varie selon les protéines.

#### ➤ **Mode opératoire**

- 5 ml de réactif de Lowry est ajouté à 1 ml de filtrat de caroube (la farine de caroube est macérée dans l'eau distillée 1 /10 (P/V)), le filtrat est soumis à une précipitation par du TCA (8%). Après centrifugation et redissolution dans l'eau, une quantité est utilisée pour le dosage. Laisser la solution reposée à température ambiante pendant 10 min.
- Ajouter 0,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu et laisser le mélange reposer à température ambiante pendant 30 min à l'obscurité.
- Lire l'absorbance à 660 nm.

La droite d'étalon s'effectue avec le sérum albumine bovine (SAB) avec une gamme de concentration allant de 0 à 250 µg/ml, opérer de même que le protocole de notre échantillon.

### **III.1.3. Quantification de quelques composés principaux**

#### **III.1.3.1. Dosage des polyphénols totaux**

##### ➤ **Principe**

Le réactif de Folin Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène ([Catalano et al., 1999](#)).

La coloration produite, dont l'absorption maximum à 760 nm, est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

##### ➤ **Mode opératoire**

Le dosage des polyphénols totaux par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrite dans la littérature ([Singleton et al., 1999](#)).

Une prise d'essai de 0,5ml d'EEC, d'EMC ou d'EWC est diluée dans 5 ml d'eau distillée, ajouter 0,5ml de réactif de Folin-Ciocalteu, le mélange est soumis à une agitation au vortex, après 3min

ajouter 0,5 ml de carbonate de sodium à 10 %. Après 1h d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la densité optique est lue au spectrophotomètre UV-VIS (de type TECHCOMP VIS 7200) à une longueur d'onde de 760 nm.

Le blanc est présenté par 5 ml d'eau distillée additionnée de 0,5 ml de folin-ciocalteu et 0,5 ml de carbonate de sodium à 10%.

La quantité des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (0 à 160 mg/ml) et est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de caroube (mg EAG/g de caroube).

### **III.1.3.2. Dosage des flavonoïdes**

#### **➤ Principe**

La méthode du trichlorure d'aluminium décrite par [Woisky et Salatino \(1998\)](#) est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les EEC, EWC et EMC.

La présence d'une case libre dans  $AlCl_3$  forme une liaison dative avec les doublets libres de l'oxygène des groupements OH des flavonoïdes, en produisant un complexe de couleur jaune, dont son absorbance maximale est enregistrée à 430 nm.

#### **➤ Mode opératoire**

Prendre 2 ml d'EEC, d'EWC ou d'EMC, ajouter 2 ml de la solution d' $AlCl_3$  (2%). Après 30 minutes de réaction à l'obscurité, l'absorbance est lue à 430 nm.

La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0 à 40 mg/ml) et est exprimée en milligramme d'équivalent de quercétine par gramme de caroube (mg EQ/g de caroube).

### **III.1.3.3. Dosage de la vitamine C**

#### **➤ Principe**

C'est grâce au pouvoir réducteur de la vitamine C que l'on peut effectuer ce dosage. La vitamine C est une lactone d'un acide hexonique comportant une fonction éne-diol, et synthétisée par tous les animaux sauf les primates. A cause de sa structure chimique, la vitamine C est facilement oxydée en milieu basique mais relativement stable en milieu acide ([Klein et Perry, 1982](#); [Yen \*et al.\*, 2008](#)).



On utilise comme oxydant, le Dichlorophénol-indophénol (DIP) qui possède plusieurs particularités :

- Il permet d'oxyder la vitamine C en milieu acide.
  - Il est coloré sous sa forme oxydé et incolore sous sa forme réduite.
- **Mode opératoire**
- 0,5 g de la farine de caroube est extraite avec 10 ml d'acide oxalique (1%) ;
  - L'extrait est centrifugé à 3000 tours/min pendant 15 minutes ;
  - On mélange 5 ml de surnageant avec 9 ml de DIP à 0,2mM, bien mélangé pendant 15 secondes, puis l'absorbance est mesuré à 515nm.

La courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant l'acide ascorbique comme standard avec une gamme de concentration allant de 0 à 500 µg/ml pratiqué dans les mêmes conditions opératoires que les échantillons.

Les résultats obtenues de la teneur en acide ascorbique sont exprimés µg/g de caroube.

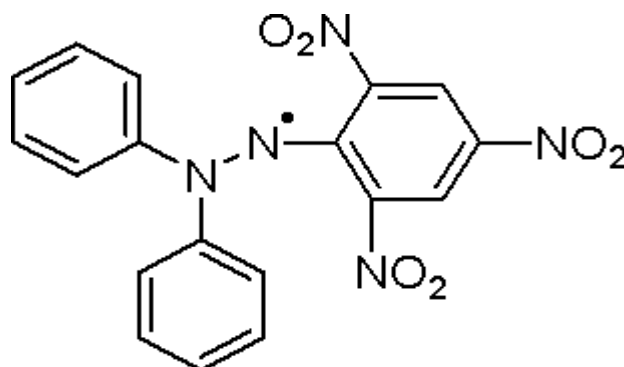
#### **III.1.4. Mesure du pouvoir antioxydant des EEC, EWC et EMC par le test DPPH**

➤ **Principe**

Ce test permet de mettre en évidence le pouvoir antiradicalaire d'un antioxydant pur ou d'un extrait antioxydant.

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudier la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Fig. 11). Du fait de cette délocalisation, les molécules du radical ne forment pas des dimères et restent dans sa forme monomère relativement stable à température ordinaire. La délocalisation provoque aussi la couleur bleue bien caractéristique de la solution de DPPH•. Le DPPH° absorbe à 515 nm. Sous l'action d'un antioxydant AOH qui le réduit en DPPHH, cette absorbance diminue jusqu'à atteindre un plateau, cette cinétique variant selon l'antioxydant utilisé.





**Figure 11 :** Structure chimique du radical libre DPPH• (2,2 DiPhenyle-1-Pikryl-Hydrazyle)

➤ **Mode opératoire**

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits de caroube via le test DPPH est effectuée par la méthode décrite par [Arnous et al. \(2002\)](#).

➤ **Préparation du DPPH**

23,65 g de 2,2-diphényl-1-picryl hydrazyl (DPPH) est dissoute dans 1 litre du méthanol pure pour obtenir une solution de DPPH à 60 µM.

➤ **Préparation des échantillons**

Mélanger 0,025 ml de chaque extrait (EEC, EWC ou EMC) à différentes concentrations (0.125, 0.25, 0.5 et 1 mg/ml) avec 0,975 ml de DPPH (60 µM), incuber pendant 30 min à l'abri de la lumière et lire l'absorbance à 517 nm.

Les résultats d'absorbance obtenus ont été convertis en taux de pouvoir anti-radicalaire (PAR%) de DPPH selon l'équation:

$$[\text{PAR}\% = (\text{Abs}_{\text{contrôle}} - \text{Abs}_E) / \text{Abs}_{\text{contrôle}} \times 100]$$

Les résultats sont souvent apportés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide ascorbique.

L'équation de la courbe effet-dose ainsi obtenue permet de calculer la CE50, concentration nécessaire pour réduire de moitié la quantité de DPPH° initialement présente dans le milieu car cette valeur nous permet d'interpréter les résultats de cette méthode.

### III.1.5. Composition chimique de *Ceratonia siliqua* L. par LC-MS/MS

L'identification chimique de l'EEC (qui a montré une bonne activité antioxydante), a été obtenus avec un système LC-MS/MS QTOF6520 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) en utilisant une colonne C18 (Zorbax Eclipse XDB) résolution rapide (HT 4,6 x 50 mm, 1,8 µm), en mode positif- ESI, avec un débit de 0,4 ml / min, en phase mobile en utilisant de l'acétate d'ammonium 10 mM (solution A)/ CH<sub>3</sub>OH (solution B) en mode dégradé comme suit (% B, le temps): (10%, 0 min), (95%, 10 min), (10 %, 15 min), (VCAP 3500 eV; Source T °, 350 ° C; fragmenteur, 110 V; écumoire, 65 V).

## **Partie 2 :L'activité antioxydante de l'EEC *in vivo***

### **III.2.1. Animaux et expérience d'élevage**

Vingt-quatre rats mâles Wistar albinos pesant entre 110 à 140 g ont été utilisés dans la présente expérimentation. Les rats ont été obtenus à partir de l'institut pasteur (Alger, Algérie). Le protocole est conforme aux lignes directrices du National Institutes of Health (NIH). Dès leur réception, les rats ont été mis aléatoirement dans des cages métaboliques pour une période d'adaptation (2 semaines) au sein de l'animalerie de la faculté des Sciences (Université Djilali Liabes, Sidi bel abbès), à température ambiante avec un cycle naturel de lumière et d'obscurité. Les rats ont un accès libre à la nourriture (Croquettes provenant de la société de production des aliments d'animaux, Bouzaréat, Alger) et à l'eau. Après deux semaines d'acclimatation, les animaux ont été divisés en quatre groupes. Le premier groupe a été utilisé comme témoin : croquettes + eau.

Tandis, que le groupe 1, 2 et 3 ont été traités par voie orale comme suit ([Ben Hsouna et al., 2011](#)):

**Groupe 1:** Ils ont reçu 80 mg/kg d'EEC pendant 28 jours ;

**Groupe 2:** Ils ont reçu 30 mg/kg d'AlCl<sub>3</sub> pendant 28 jours ;

**Groupe 3:** Ils ont reçu 80 mg/kg d'EEC + 30 mg/kg d'AlCl<sub>3</sub> pendant 28 jours.

Au 28<sup>ème</sup> jour de l'expérimentation (la fin de la période du traitement), les animaux sont mis à jeun pendant 12 heures avant la collection du sang. Afin d'éviter tout risque de changement des paramètres biochimiques par administration d'une anesthésie général, les animaux ont été maintenus sous une légère anesthésie de chloroforme, sacrifier juste avant la collection des échantillons de sang. Le sang est prélevé par ponction cardiaque sur des tubes secs et héparines. Les échantillons de plasma ont été obtenus à partir des tubes héparines, et les échantillons de sérum ont été obtenus à partir des tubes secs ; par centrifugation à 860 g pendant 20 minutes.

### **III.2.2. Analyse des paramètres sériques**

L'analyse des paramètres sériques est effectuée suivant des méthodes enzymatiques et/ou colorimétriques par un auto-analyseur de type (Technicon RA, OperasystemsN° de ref. T01-2801-56).

### **III.2.2.1. Dosage de la glycémie**

La glycémie peut être dosée par de très nombreuses méthodes, dont les plus anciennes sont colorimétriques alors que celles pratiquées actuellement sont enzymatiques.

Dans notre étude, la glycémie a été déterminée suivant une méthode enzymatique (Hexokinase /G-6-PDH) en utilisant le Kit de réactif de glucose REF 3L82-20 par un auto analyseur de type (ARCHITECT c Systems).

#### **➤ Principe**

Le glucose est phosphorylé par l'hexokinase (HK) en présence d'adénosine triphosphate (ATP) et d'ion de magnésium, produisant ainsi du glucose-6-phosphate (G-6-P) et d'adénosine diphosphate (ADP). La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH) oxyde en particulier le G-6-P en 6-phosphogluconate avec réduction simultanée du Hexokinase nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) en nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH).

Une micromole de NADH est produite pour chaque micromole de glucose consommée. Le NADH produit absorbe la lumière à 340 nm et cette augmentation de l'absorbance peut être détectée par spectrophotométrie.

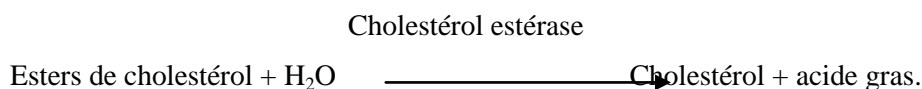
### **III.2.2.2. Dosage du Cholestérol**

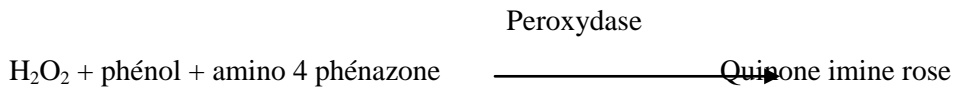
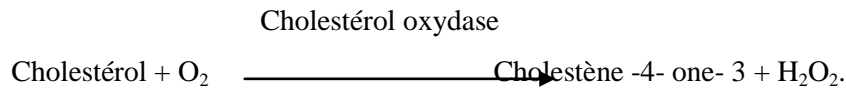
Le cholestérol peut être dosé par de très nombreuses méthodes. Les plus anciennes sont colorimétriques, les plus pratiqués sont enzymatiques. La méthode de référence est chromatographique ([Valdiguié et al., 2000](#)).

Dans notre étude, le cholestérol a été déterminé suivant une méthode enzymatique colorimétrique décrite par [Trinder \(1969\)](#).

#### **➤ Principe**

Cette méthode utilise une cholestérol-estérase et une cholestérol-oxydase, l'indicateur quinone imine formé à partir du peroxyde d'hydrogène et du chromogène (amino 4 phénazone) en présence du phénol et de peroxydase permet la quantification du cholestérol selon la réaction suivante :



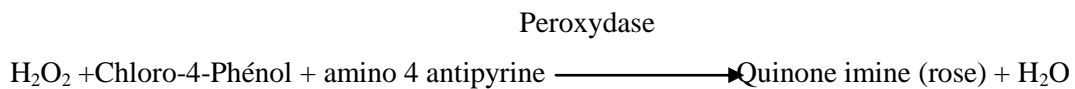
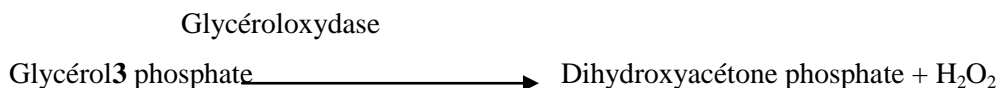
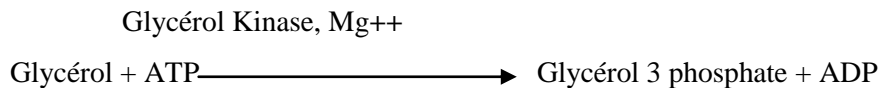
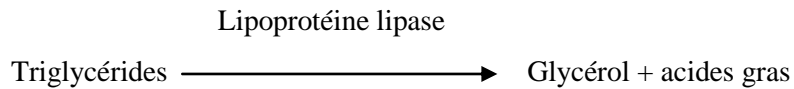


L'intensité de la coloration de la quinone imine mesurée à 540 nm, est directement proportionnelle à la quantité de cholestérol présente dans l'échantillon du sérum.

### III.2.2.3. Dosage des Triglycérides

#### ➤ Principe

Le dosage des triglycérides a été effectué suivant une méthode enzymatique colorimétrique (Young et pestaner, 1975; Fassati et Principe, 1982). Cette méthode repose sur le dosage enzymatique du glycérol libéré après action de la lipase selon les réactions suivante :



L'intensité de la coloration de la quinone imine mesuré à 540 nm est directement proportionnelle à la quantité de triglycérides contenue dans l'échantillon du sérum.

### III.2.2.4. Dosage du HDL

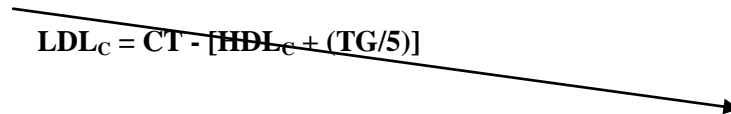
#### ➤ Principe

Il s'effectue après précipitation sélective des LDL et VLDL avec un complexe polyanion-cation ou avec l'acide phosphotungstique en présence de cations bivalente. Le cholestérol HDL est dosé par technique enzymatique sur le surnageant résultant de la centrifugation du précipité par la même technique enzymatique que le cholestérol total (Grove, 1979).

### III.2.5.5. Evaluation du cholestérol LDL

La détermination du cholestérol-LDL permet l'appréciation de la fraction lipoprotéinique assurant le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie (lipoprotéine antiathérogènes) et d'évaluer par calcul le cholestérol des LDL directement impliqué dans le risque athérogène (Legrand *et al.*, 1997).

La formule de FRIEDEWALD permet cette approche à condition que les TG soient inférieures à 3,5 g/l (4mmol/l).

$$\text{LDL}_c = \text{CT} - [\text{HDL}_c + (\text{TG}/5)]$$


### III.2.5.6. Dosage de l'urée

#### ➤ Principe

L'urée est dosée en cinétique par une méthode enzymatique (Berthelot, 1998) selon la réaction suivante :

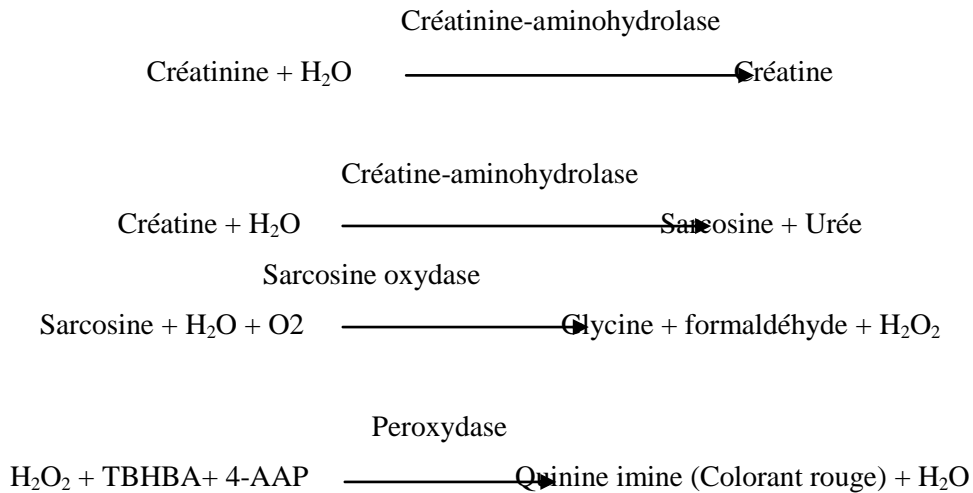


Les ions ammonium, en présence de sallylate et d'hypochlorite de sodium réagissent en formant un composé de couleur verte (Dicarboxylindophenol) dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en urée.

### III.2.5.7. Dosage de la Créatinine

#### ➤ Principe

La créatinine est dosée selon une méthode cinétique colorimétrique décrite par (Whelton *et al.*, 1994) selon les réactions suivantes :



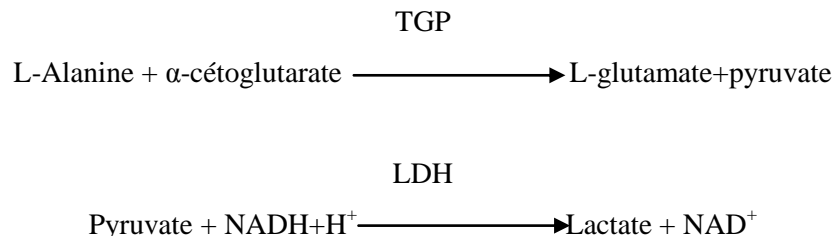
La concentration de la créatinine est proportionnelle à l'intensité de la couleur rouge produite. La réaction au point final est mesurée comme étant la différence d'absorbance entre 550 et 630 nm.

### III.2.5.8. Evaluation de la l'activité de la Transaminase Glutamate Pyruvate (TGP)

La transaminase glutamate pyruvate TGP (ou Aspartate aminotransférase ASAT) est mesurée à l'aide de la méthode enzymatique basée sur l'œuvre de [Wróbleswski et La Due \(1956\)](#), elle est fréquemment utilisée.

#### ➤ Principe

Dans cette réaction, la TGP catalyse le transfert d'un groupe amine de L-alanine en  $\alpha$ -cétoglutarate afin de former du L-glutamate et du pyruvate. Le lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la conversion du pyruvate en lactate. En même temps, la NADH est oxydée en  $\text{NAD}^+$ , tel qu'illustré dans le plan de réaction suivant.



Le taux de variation de la différence d'absorbance entre 340 et 405 nm est causé par la conversion de NADH en  $\text{NAD}^+$  et est directement proportionnel à la quantité de TGP présente dans l'échantillon.

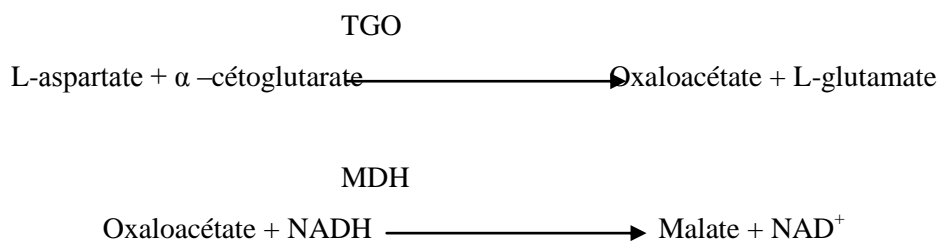
### III.2.5.9. Evaluation de la l'activité de la Transaminase Glutamate Oxalate (TGO)

Le test de la transaminase Glutamate Oxalate TGO (ou Alanine Amino Transférase) se base sur la méthode de dosage de [Karmen \(1955\)](#), telle que modifiée par [Bergmer \*et al.\* \(1977\)](#).

### ➤ Principe

Le lactate déshydrogénase (LDH) est ajouté à la réaction dans le but de réduire l'interférence causée par le pyruvate endogène.

La TGO catalyse la réaction de L-aspartate et  $\alpha$ -cétoglutarate en oxalate et L-glutamate. L'oxaloacétate est converti en malate et NADH est oxydée en  $\text{NAD}^+$  par le catalyste MDH.



Le taux de variation d'absorbance à 340/405 nm causé par la conversion de NADH en  $\text{NAD}^+$  est directement proportionnel à la quantité de l'ASAT présente dans l'échantillon.

## III.3. Etude du statut antioxydant

### III.3.1. Dosage du malondialdéhyde (MDA) par le thiobarbiturique (TBARS)

Le scavenging de la peroxydation lipidique a été réalisée sur le plasma. Selon [Yoshioka \*et al.\* \(1979\)](#), 20  $\mu\text{l}$  de plasma ajouté à 0.8 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Après agitation, 100  $\mu\text{l}$  de solution d'acide phosphotungstique (10%) a été ajouté. La solution résultante a été laissée 5 min dans l'obscurité. Centrifugation à 1600 rpm pendant 10 min a été faite. Le surnageant a été éliminé et le culot a été suspendue dans 0.4 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , puis 60  $\mu\text{l}$  d'acide phosphotungstique a été ajouté. Une nouvelle centrifugation à 1600 rpm a été faite pendant 10 min. Le surnageant a été jeté et le culot résultant a été dissous dans 2 ml d'eau distillée et 0.5 ml de réactif TBA (335 mg d'acide thiobarbiturique dans 50 ml d'eau / 50 ml d'acide acétique 99%). Le mélange résultant a été chauffé au bain-marie à 95 ° C pendant 60 min. La solution a été refroidie et extraite par 2,5 ml de butanol. La fluorescence de la phase butanolique a été mesurée avec une longueur d'onde d'excitation à 515 nm, une longueur d'onde d'émission à 553 nm, 10 nm étaient glissière avec la coupure à 515 nm. La quantité de la peroxydation lipidique a été exprimée en équivalent MDA à partir d'une courbe linéaire dessinée avec plusieurs concentrations de la tétraméthoxypropane (TMP) standard.



### **III.3.2. Dosage de l'activité enzymatique du catalase (CAT ; EC 1.11.1.6)**

L'activité enzymatique du catalase est déterminée dans le plasma selon la méthode de [Lück \(1965\)](#).

#### **➤ Principe**

Cette activité enzymatique est mesurée par analyse spectrophotométrique du taux de la décomposition du peroxyde d'hydrogène ([Aebi, 1974](#)). En présence de la catalase, la décomposition du peroxyde d'hydrogène conduit à une diminution de l'absorption de la solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction du temps.

#### **➤ Mode opératoire**

Le milieu réactionnel contient 1 ml de plasma, 1 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et 1 ml de tampon phosphate (50 mmol/l, pH 7). Après incubation de 5 min, 1 ml du réactif titanium oxyde sulfate (TiOSO<sub>4</sub>) (1,7 g dans 500 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) est ajouté. La lecture se fait à 420 nm. Les concentrations du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restant sont déterminées à partir d'une gamme d'étalon de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec le tampon phosphate et le réactif TiOSO<sub>4</sub> de façon à obtenir dans le milieu réactionnel des concentrations de 0,5 à 2 mmol/l.

Le calcul d'une unité d'activité enzymatique (A) est :

$$A = \log A1 - \log A2$$

A1 : la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de départ.

A2 : la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après incubation (au bout de 5 min).

L'activité spécifique est exprimée en U/mg ou en U/ml.

### **III.3.3. Dosage de l'activité de la Superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1)**

#### **➤ Principe**

L'activité de cette enzyme est mesurée selon la méthode d'[Elstner et al. \(1983\)](#). Le principe est basé sur la réaction chimique qui génère l'ion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) à partir de l'oxygène moléculaire en présence d'EDTA, de MnCl<sub>2</sub> et du mercaptoéthanol.

L'oxydation du NADPH est liée à la disponibilité des ions superoxyde dans le milieu. Dès que la SOD est ajoutée dans le milieu réactionnel, elle entraîne l'inhibition de l'oxydation du NADPH.

### ➤ **Mode opératoire**

**Réactif 1 :** 5 ml de tampon phosphate (0,2 mol/l, pH 7,8), 1 ml d'hydroxylamine chloride (0,69 mg/ml), 1 ml d'antraquinone (0,1332 mg/ml) et 1 ml de diaphorase (1 mg/ml d'une solution de 15 U/ml).

**Réactif 2 :** 6 ml de sulfanilamide à 10 mg/ml d'HCl à 25% et 6 ml de naphylethylène diamine à 0,2 mg/ml.

400 µl de réactif (éthanol/chloroforme ; 62,5/37,5 ; v/v) sont ajoutés à 250 µl de plasma, afin de précipiter les protéines. Après centrifugation à 4000 tours/min pendant 5 min, le surnageant est récupéré.

Le milieu réactionnel contient 5 µl de surnageant, 10 µl de tampon phosphate et 100 µl de réactif 1. Le mélange est ensuite incubé avec 10 µl de NADPH pendant 15 min à température ambiante. Puis 100 µl de réactif 2 sont ajoutés.

La lecture se fait à 540 nm, après incubation de 20 min.

La gamme d'activité est réalisée avec la SOD étalon.

Les résultats sont exprimés en U/cg Hb.

### **III.3.4. Dosage de l'activité plasmatique de la Glutathion peroxydase**

#### ➤ **Principe**

L'activité plasmatique de la glutathion peroxydase (GSH-PX) a été effectuée selon la méthode décrite par [Paglia et Valentine \(1967\)](#). Le principe du test est basé sur la conversion de la NADPH + H<sup>+</sup> en NADP<sup>+</sup> en tant que résultat d'une série de réactions.

#### ➤ **Mode opératoire**

1 ml de PBS, 0.1 ml d'EDTA, 0.1 ml de l'azide de sodium, 0.1 ml de NADPH+ H<sup>+</sup>, 0,1 ml de glutathion réduit et 0,2 ml de glutathion réductase solutions ont été ajoutés à 0,2 ml de plasma. Après incubation à 37 ° C pendant 2 ou 3 min, 0.2 ml de t-BOOH (t-butyl-hydroperoxide) dans l'eau distillée a été ajouté, et la diminution de l'absorbance au sein 1min a été calculé. Les résultats ont été calculés en U/mg Hb.

### **III.4. Analyses statistiques**

Les tests effectués *in vitro* et *in vivo* ont été répétés trois fois dans un dispositif en randomisation totale et les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  une erreur standard, La différence est considérée significative à  $P < 0.05$ .

# *CHAPITRE IV :*

## *Résultats et discussion*

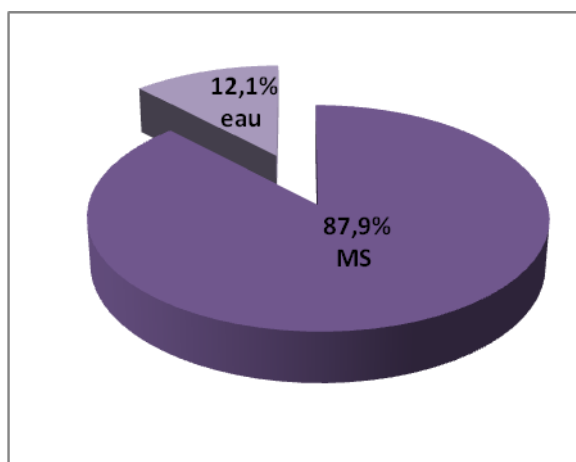
## Chapitre IV : Résultats et Discussion

### Partie 1 : Etude *in vitro* de la caroube

#### IV.1. Analyse des paramètres physico-chimiques

##### IV.1.1.1. La teneur en eau

L'analyse de la détermination de la teneur en eau a été réalisée sur la farine des gousses de caroube qui a renfermée un taux d'humidité de 12,1%, à partir de cette valeur on a pu déterminer le taux de la matière sèche qui est estimé à 87,9% (fig. 12).



**Figure 12: Taux d'humidité et de la matière sèche des gousses de caroube.**

La valeur du taux de la matière sèche obtenue est similaire à celle d'[Albanell et al. \(1991\)](#) qui est de 87,31%.

[Yousif et Alghzawi \(2000\)](#) ont rapporté que le taux d'humidité est de 11,07% et se rapproche de celui des travaux réalisés par [Hussein et al. \(2011\)](#) qui est de 10,1%. Par contre, en les comparant à des travaux effectués sur la caroube de la Turquie par [Ozcan et al. \(2007\)](#) nous avons remarqué que cette dernière contenait beaucoup moins d'eau (6,26%) que celle utilisée dans notre étude.

##### IV.1.1.2. La teneur en cendres

La détermination de la teneur en matière minérale nous éclaire sur la qualité nutritionnelle de l'échantillon à analyser. En effet, la teneur en cendres des aliments doit avoir un seuil à ne pas dépasser pour la consommation humaine et animale.

Le taux de cendres de la farine des gousses de caroube (tableau 03) obtenu dans cette étude est de 9,69%, ce qui est légèrement supérieur au résultat d'Avallone *et al.* (1997) qui ont révélé un taux de 6% pour la pulpe de Rosilini, et inférieur à celui de Bernando-Gil *et al.* (2011) qui est de 14,3%.

Albanell *et al.* (1991) ont montré que le taux de cendres de la farine des gousses de caroube des différentes régions d'Espagne est nettement plus supérieur (32,7%) que celui réalisé dans ce travail. Par contre, les valeurs trouvées par Hussein *et al.* (2011) (3,52%) et par Youssif et Alghzawi (2000) (2,79%) sont inférieures à la nôtre.

D'après Ozcan *et al.*, (2007), les différents minéraux se trouvant dans la pulpe de caroube, et qui sont en quantité dominante, sont le potassium 970mg/100g, suivi du calcium 300mg/100g, 71mg/100g de phosphore et 60mg/100g de magnésium, avec présence de traces d'éléments comme le fer, le manganèse, le zinc et le cuivre.

**Tableau 03 : composition de la farine de caroube.**

<b>Composants</b>	<b>Le taux (%)</b>
matière minérale	9,69 ± 4,17
Matière grasse	0,77 ± 0,2
Sucres totaux	48,23 ± 3,04
protéines	3,68 ± 0,3
Vitamine C	1,83 ± 0,85

#### **IV.1.1.3. La teneur en matière grasse**

De multiples paramètres influent sur le taux de matière grasse comme la granulométrie, l'humidité, la nature du solvant et la méthode d'extraction utilisée.

La pulpe de caroube utilisée dans ce travail contient 0,77 % de lipides (tableau 03). Ce résultat est similaire au résultat de [Yousif et Alghzawi \(2000\)](#) qui est de 0,74% pour la pulpe de caroube de Jordanie.

[Avallone et al. \(1997\)](#) ont montré que la pulpe de Rosilini contient 0,6% de lipides, tandis que [Hussein et al. \(2011\)](#) ont trouvé 5,48% de matière grasse. Dans une étude de [Dakia et al. \(2007\)](#), la pulpe de caroube contient 6,6% de matière grasse, qui est représentée en majeure partie par l'acide oléique (34.4%) et l'acide linoléique (44.5%). L'acide palmitique (16.2%) et l'acide stéarique (3.4%) sont les principaux acides gras saturés. Ces derniers résultats démontrent que la pulpe de caroube contient plus d'acides gras insaturés que d'acides gras saturés ce qui confère à la caroube la propriété de diminuer le risque de maladies cardiovasculaires.

#### **IV.1.1.4. La teneur en sucres totaux**

La caroube est un fruit riche en sucres, ce qui lui vaut sa saveur très sucrée et son utilisation comme aliment de bétail. Selon les résultats de notre étude, la farine de caroube est très riche en sucres totaux avec une valeur de 482,3 mg EG/g MS (tableau 03).

Nos résultats concernant la teneur de la caroube en sucre totaux s'accordent parfaitement avec la littérature. [Ozcan et al. \(2007\)](#) ont montré dans une étude sur les gousses de caroube de la Turquie que la teneur en sucres totaux est de 48,35%. De même, [Albanell et al. \(1991\)](#) ont obtenu 469.5 g/kg de sucres totaux pour la caroube de différentes régions d'Espagne.

Ainsi les études effectuées par [AYAZ et al. \(2007\)](#) sur la caroube d'Anatoli (Turquie) ont montré que les sucres sont représentés majoritairement par le sucrose avec 437.3 mg/g M.S, le glucose avec 395.8 mg/g M.S et le fructose avec 42.3 mg/g M.S.

Les sucres totaux des gousses de caroube obtenues à partir de différentes régions de Maroc ont été de 31,5 à 50,1 g/100 g soit (315 à 501 mg/g), respectivement, pour les régions d'Agadir et Essaouira ([El batal et al., 2011](#)).

[Hussein et al. \(2011\)](#) ont rapporté une valeur significativement inférieure à celle obtenue dans la présente étude avec une teneur en sucres totaux de 9.17% (91,7 mg/g) pour la caroube d'Egypte.

On remarque une différence entre le taux de sucres des différents travaux, cela peut s'expliquer par les variétés de caroube utilisées, sa provenance et l'année de sa collecte.

#### **IV.1.1.5. La teneur en protéines**

La teneur en protéines brutes est l'un des critères utilisés pour évaluer la valeur nutritive d'un aliment.

Le taux des protéines brutes des pulpes de caroube est de 3,68% (tableau 03), ce résultat est similaire à celui présenté par [Bernando-Gil et al. \(2011\)](#) qui est de 3,3 g/100 g (soit 3,3%) pour la gousse de caroube du Portugal. De même, [AYAZ et al. \(2007\)](#) et [Albanell et al. \(1991\)](#) ont montré, respectivement, que la caroube d'Anatoli (Turquie) renferme 4,45 % et la caroube d'Espagne contient 4,32% de protéines brutes.

Par contre, on observe une différence hautement significative entre la teneur en protéines de la caroube obtenue dans notre étude et celle trouvée par [Hussein et al. \(2011\)](#) qui est de 8.95% pour la caroube d'Egypte.

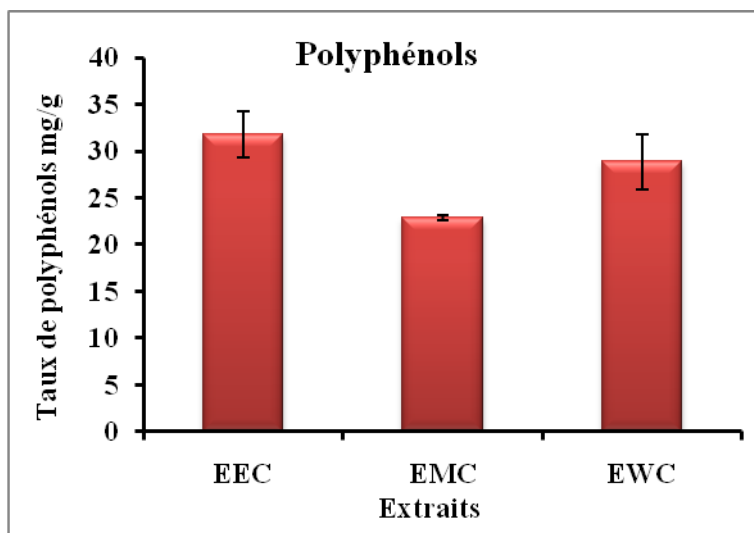
[AYAZ et al. \(2009\)](#) ont comparé leurs résultats sur la composition en acides aminés de la caroube avec le taux standard des protéines selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), afin d'évaluer la qualité nutritionnelle de cette dernière. Il en ressort que le taux d'acides aminés essentiels dans la caroube est bien raisonnable sauf pour la lysine qui est en dessous du taux requis, ce qui nous permet de conclure que la caroube est un fruit ayant une bonne qualité nutritionnelle, ce qui est confirmé par [Flynn et al. \(2002\)](#) qui stipule que la caroube étant riche en acide glutamique et en arginine peut constituer un excellent ingrédient dans la nourriture des sportifs, car ces deux acides aminés augmentent la masse musculaire, la synthèse de collagène ainsi que la production de glycogène.

#### **IV.1.2. Détermination de quelques composés principaux**

##### **IV.1.2.1. La teneur en polyphénols totaux**

Le dosage des composés phénoliques des trois extraits de caroube EEC, EMC et EWC a révélé les valeurs, respectivement de, 31,8 ; 22,86 et 28,85 mg EAG/g (fig. 13). On remarque ainsi que l'EEC contient plus de polyphénols que les deux autres extraits (EMC et EWC).





**Figure 13: dosage des polyphénols totaux des trois extraits de caroube**

Selon une étude effectuée par [AYAZ \*et al.\* \(2007\)](#) sur la caroube d'Anatoli (Turquie), la teneur en polyphénols totaux est de l'ordre de 13,51 mg EAG/g. Cette valeur est inférieure à celle rapportée dans la présente étude.

[El-sherif \*et al.\* \(2011\)](#) ont révélé une teneur en polyphénols de 18,607 mg/g, tandis qu'[El Hajaji \*et al.\* \(2010\)](#) ont montré que la caroube de différentes régions du Maroc contient entre 4,5 et 26,4 mg/g.

[Avallone \*et al.\* \(1997\)](#) ont démontré que la teneur en polyphénols totaux de différentes régions de Sicile (Italie) varie entre 15,8 et 24,4mg/g.

Une étude faite par [Sebai \*et al.\* \(2013\)](#) qui ont travaillé sur la pulpe de la caroube de Tunisie montre des résultats de 8.36 mg/g pour l'EMC et 22.27 mg/g pour l'EEC.

Par ailleurs, [Hussein \*et al.\* \(2011\)](#) ont démontré que la caroube d'Egypte contient une teneur en polyphénols totaux largement supérieure (99,30 mg/g) à celle rapportée dans la présente étude.

Les différences observées pour les résultats des différentes études peuvent s'expliquer par la provenance géographique, le cultivar, la variété et surtout le degré de maturité. Ceci a été confirmé par les travaux de [Joslyn \*et al.\* \(1968\)](#) réalisés sur des gousses de caroube vertes et qui ont montré que ces dernières contenaient 204,3 mg/g de polyphénols totaux.

#### IV.1.2.2. La teneur en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des trois extraits EEC, EMC et EWC est respectivement de 44.74, 36.49 et 39,72 mg/g (fig. 14).

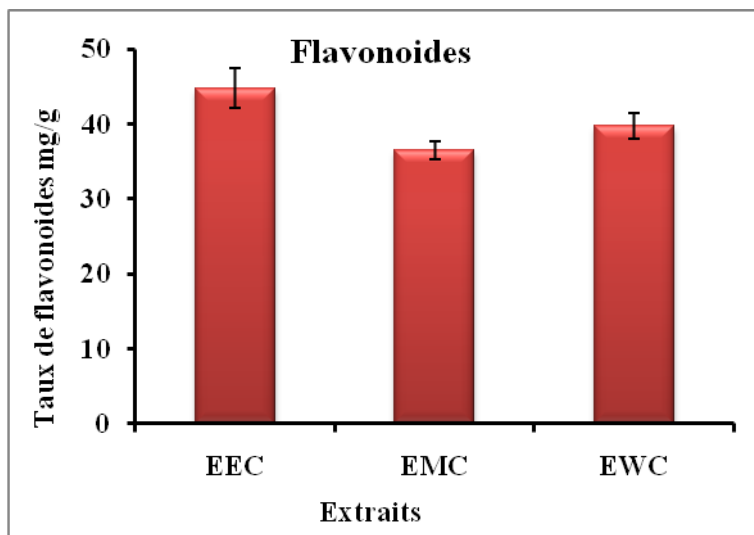


Figure 14: dosage en flavonoïdes des trois extraits de caroube.

La teneur en flavonoïdes d’EEC obtenue dans ce travail est similaire à celle décelée par Kumazawa *et al.* (2002) qui ont indiqué une valeur estimée à 43,7 mg/g.

Sebai *et al.* (2013) qui ont travaillé sur la pulpe de Tunisie et AYAZ *et al.* (2007) sur la caroube de Turquie ont rapporté des taux de flavonoïdes nettement inférieurs à ceux obtenus dans notre étude et qui sont respectivement de 2,49 mg/kg et 0,41 mg /g.

La différence en teneurs de flavonoïdes observées peut être due aux conditions environnementales de chaque localité.

#### IV.1.2.3. La teneur en acide ascorbique

Peu d’études ont été réalisées afin d’évaluer le taux d’acide ascorbique contenu dans la caroube malgré que c’est un puissant réducteur, c’est pour cette raison que nous avons opté pour son évaluation dans la présente étude.

Le taux de vitamine C de la farine des gousses de caroube dans la présente étude est de 18.32 µg/g (tableau 03).

La teneur en acide ascorbique indiquée par [Hussein et al. \(2011\)](#) pour la caroube d'Égypte (9.5 mg/100 ml) est largement supérieure à la nôtre.

[Hussein et al. \(2011\)](#) ont également évalué le taux d'acide ascorbique du palmier Doum d'Égypte. Sa teneur en vitamine C est de l'ordre de 7.8 mg/100 ml, faible par rapport à celle trouvée dans les feuilles de baie estimée à 11.05 mg/100 ml.

[Naskar et al. \(2009\)](#) ont conclu que la teneur en acide ascorbique contenue dans le fruit du *Phoenix dactylifera* est de l'ordre de 0.66 mg/g.

#### **IV.1.3. Evaluation de l'activité antioxydante des trois extraits par le test DPPH**

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

Le radical libre DPPH a permis l'estimation de l'activité antioxydante des composés phénolique de la caroube utilisée dans cette étude. C'est un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration ([Sanchez-Moreno, 2002](#)).

L'activité anti-radicalaire (RSA%) d'EEC est de l'ordre de 96.05, 94.17, 26.88 et 18.48%, respectivement, pour les concentrations 0.125, 0.25, 0.5 et 1 mg/ml ([fig. 15](#)). De même pour l'EMC, PAR% varie de 15.8 à 90,72% ([fig. 15](#)). L'EWC a montré une activité anti-radicalaire inférieure de l'ordre de 81.44, 73.42, 17.36 et 14.83%, respectivement, pour les concentrations cités ci-dessus. En se référant à l'acide ascorbique, son activité anti-radicalaire est de l'ordre 96.73, 96.56, 27.88 et 16.56%, respectivement, pour les mêmes concentrations utilisées pour les extraits de caroube ([fig. 15](#)).

Les profils d'activité antiradicalaire obtenus révèlent que L'EEC a le plus d'activité anti-oxydante que l'EMC et l'EWC.

La comparaison des extraits EEC, EMC et EWC révèle que l'EEC représente l'extrait le plus actif avec une  $CE_{50}$  de 0.28 mg/ml, suivi par l'EMC avec une  $CE_{50}$  de l'ordre de 0.32 mg/ml. La  $CE_{50}$  de l'EWC est de 0.38 mg/ml.

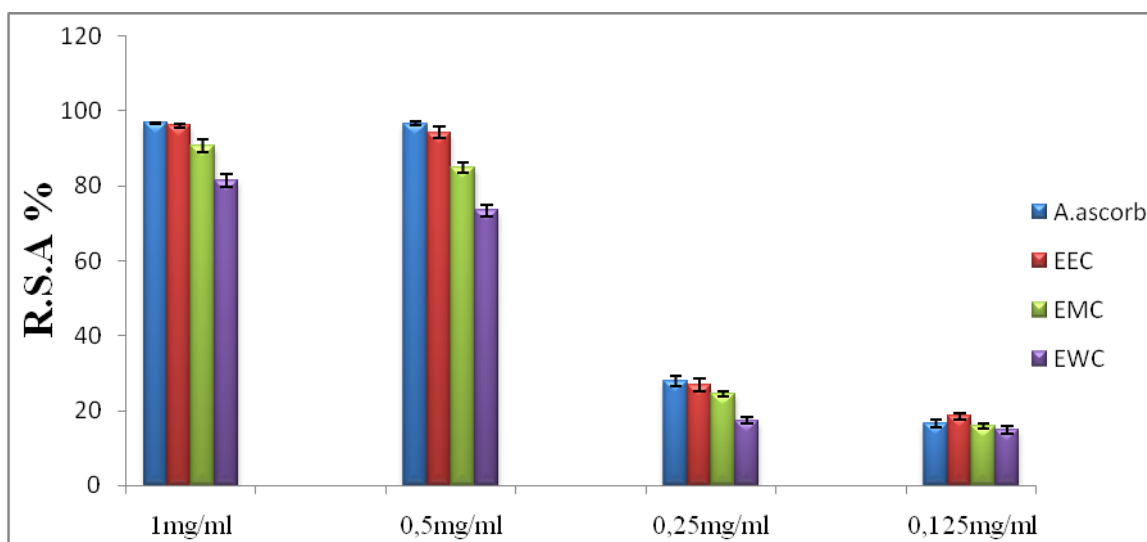
A des fins comparatives, l'acide ascorbique a montré une activité antiradicalaire intéressante avec une  $CE_{50}$  de l'ordre de 0,207 mg/ml. En comparaison avec l'acide ascorbique tous les extraits testés s'avèrent moins actifs.

L'activité antioxydante des polyphénols de caroube des différentes régions d'Algarve (Portugal) obtenus par [Custodio et al. \(2011\)](#) se rapprochent des nôtres avec une valeur estimée entre 45.5 et 89.40%.

Une étude faite par [Hussein et al. \(2011\)](#) sur la caroube d'Egypte démontre des résultats inférieurs par rapport au présent travail avec un pourcentage d'activité antioxydante de l'ordre de 58.29%. En outre, [Kumazawa et al. \(2002\)](#) ont indiqué que l'activité antioxydante des extraits phénoliques de la caroube de la Grèce est de 13%. Le pourcentage rapporté est nettement inférieur au nôtre.

Les résultats obtenus concernant la  $CE_{50}$  des pulpes se rapprochent de ceux de [Ben Hsouna et al. \(1986\)](#) qui a travaillé sur la caroube de Tunisie avec une  $CE_{50}$  de 0,033 mg/ml, par contre [Kumazawa et al. \(2002\)](#) ont montré que la  $CE_{50}$  de l'extrait phénolique de la caroube est de 0,25 mg/ml ce qui reste très faible par rapport à nos résultats. Selon [Makris et Kefalas \(2004\)](#) cette importante activité antioxydante des extraits phénoliques de la caroube est due à leur forte teneur en flavonoïdes particulièrement les pranthocyanidines.

Plusieurs facteurs influent sur le potentiel antioxydant et la cinétique de réduction, notamment les conditions de la réaction (temps, rapport Antioxydant/DPPH, type de solvants, pH) et le profil phénolique en particulier ([Popovici et al., 2010](#)).



**Figure 15: pourcentage de réduction du DPPH en fonction de la concentration des extraits de caroube.**

#### **IV.1.5. Composition chimique de *Ceratonia siliqua* L. par LC-MS/MS**

L'extrait EEC qui a une forte activité anti-radicalaire, et qui contient à la fois des flavonoïdes et polyphénols a été soumis à analyse LC-MS / MS (tableau 04).

L'analyse chimique de l'EEC par LC-MS/MS a identifié la présence de plusieurs composés, notamment des acides phénoliques représentés principalement par l'acide Palmitoléique avec un temps de rétention de 16.80 min, l'Isoprenyl coumarique à 17.38 min, l'acide coumarique à 9.66 min et l'acide cinnamique à 3.6 min. Les dérivés de ce dernier en l'occurrence l'acide benzoïque et l'acide caféique sont apparus respectivement à 11.36 min et 12.09 min. De nombreux types de flavonoïdes, comme la Chrysin, le Kaempferol, la méthyl quercétine, la quercétine et la tectochrysin, ont été identifiés dans cet extrait.

La comparaison de ces résultats avec ceux de la littérature a montré quelques différences au niveau des composés. Sakakibara *et al.* (2003) ont travaillé sur la composition des gousses de caroube en polyphénols et ont montré une richesse en acide gallique avec des contributions mineures de quercétine, de catéchine et d'acide ellagique.

**Tableau 04 : Identification chimique de l'EEC par LC-MS / MS.**

Nom	Ions	Ms	m/z	TR	ppm
Tyrosol	1	138,0682	156,1021	7,738	0,92
acide coumarique	1	164,0479	165,0552	9,667	3,89
Hespéridine	3	302,0791	303,0864	9,844	0,47
Acide 3-Hydroxy-4-methoxycinnamic	1	194,0579	195,0652	10,195	0,25
prenyl caféate	1	248,1043	249,1116	10,598	-2,05
acide benzoïque	1	122,0373	123,0445	11,367	4,58
acide caféique	1	180,0422	181,0495	12,094	-0,3
Acide férulique ester méthylique	3	208,0734	209,0807	12,13	-0,47
Naringénine	3	272,0684	273,0759	12,144	-0,23
chrysin	1	254,0586	255,0659	12,15	2,74
méthyle quercétine	2	316,0586	317,0658	12,282	0,79
Bis-méthylé quercétine	2	330,0744	331,0818	12,331	1,42
Tectochrysin	3	268,0736	269,0809	12,978	0,47
Méthoxy-pinobanksine	10	286,0844	287,0915	12,978	0,91
Acacetin	4	284,0686	285,0758	13,13	0,33
quercétine	3	302,0427	303,0499	13,321	-0,07
Pinobanksine-3-acétate	3	314,0799	315,0871	13,354	2,86
genistéine	2	270,0527	271,06	13,443	-0,44
pinocembrin	1	256,0733	257,0805	13,533	-1,29
acide cinnamique	2	148,0521	149,0593	13,6	-2,26
Kaempferol	1	286,0473	309,0365	13,734	-1,53
Pinostrobin	7	270,0891	271,0966	14,899	-0,2
Pinobanksine-3-propionate	3	328,0949	329,1024	15,327	0,88
Tectochrysin	8	268,0735	269,0807	15,447	0,06
Isopentyl caféate	1	250,1215	273,1108	15,68	4,17
Acide hexadécanoïque (Palmitoléique)	1	256,2402	274,2741	16,801	0,16
Totarol	4	286,2299	287,2371	17,003	0,72
clérodane diterpénoïde	1	320,2347	321,242	17,178	-1,24
acide homovanillique	1	182,0582	183,0655	17,231	1,83
Isoprenyl coumarate	3	232,1095	233,1168	17,387	-1,58
Isoprenyl ferulate	3	262,1208	263,128	17,409	1,15
Thymol	1	150,1042	151,1114	17,416	-2,32
9-Octadecanoic acid	2	282,2561	300,2901	17,43	1,15
Acide pimarique	1	302,2255	325,2147	19,167	3,06

m/z : masse/charge du pic moléculaire

Ms : masse molaire

ppm : particules par million.

TR : temps de rétention (min).

L'identification et la quantification des composés phénoliques des extraits acétoaqueux des pulpes du caroubier (*Ceratonia Siliqua*) de deux localités différentes du sud-ouest marocain (Izouika et Reggada) par HPLC a montré une dominance par l'acide coumarique et l'acide gallique (Fadel *et al.*, 2011).

Cela peut être attribué aux facteurs écologiques, différences génétiques, stade de développement de la plante ou bien la partie de plantes utilisée (Ôzcan et Chalchat, 2008).

## **Partie 2 : L'activité antioxydante de l'EEC *in vivo***

### **IV.2. L'effet de *Ceratonia Siliqua* L. sur les paramètres sériques des rats traités**

#### **IV.2.1.1. La glycémie**

D'après nos résultats (fig. 16), on remarque que le G1 qui n'a reçu que l'EEC pendant 28 jours a montré une augmentation légère du taux de glycémie par rapport au groupe témoin. Le G2 qui a reçu l' $\text{AlCl}_3$  pendant 28 jours a montré une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) du taux de glucose sanguin (2,32 g/l) comparé au témoin (0,78 g/l) (33,62%). L'augmentation du taux de glucose chez ce groupe montre un déséquilibre métabolique typique du syndrome diabétique avec une hyperglycémie.

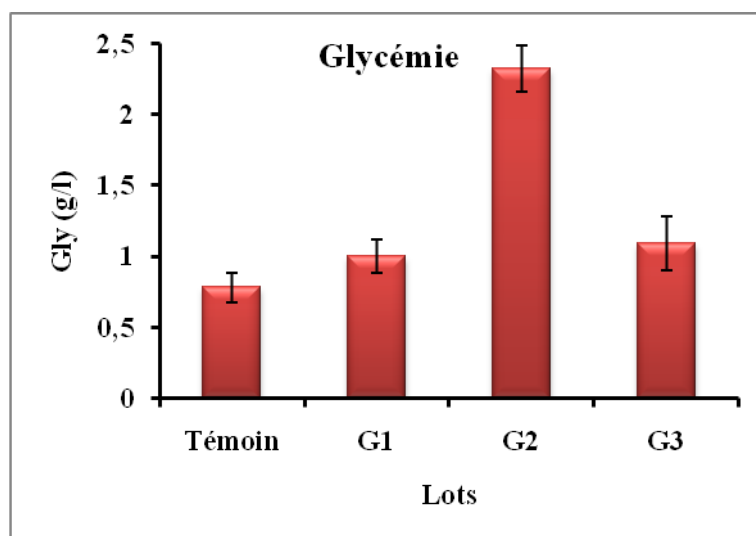
Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par Bhadauria *et al.* (2008) qui ont constaté que la glycémie des rats Wistar intoxiqués par l'aluminium, propétamphos et le tétrachlorure de carbone ( $\text{CCl}_4$ ) a augmenté significativement ( $P < 0.05$ ).

En outre, le traitement des rats avec une dose quotidienne d' $\text{AlCl}_3$  pendant une durée d'un mois a entraîné des hausses importantes du glucose sanguin (Wessam, 2012). De même, Newairy *et al.* (2009) ont constaté que des rats Wistar sont devenus hyper-glycémiques par l'administration orale des doses de  $\text{CCl}_4$  pendant 70 jours.

L'administration d'EEC en association avec l' $\text{AlCl}_3$  chez le groupe (G3) a montré une augmentation légère dans le niveau de la glycémie (1.09 g/l) par rapport au groupe témoin et une diminution hautement significative ( $P < 0.05$ ) par rapport au groupe (G2).

Le même résultat a été obtenu par Newairy *et al.* (2009) qui ont montré que le prétraitement des rats Wistar avec la propolis a diminué le taux de glycémie par rapport au groupe traité uniquement avec l'aluminium.

Uličná *et al.*, (2003) ont démontrés que l'administration du thé Rooibos (*Aspalathus linearis*) avant le CCl<sub>4</sub> empêche l'augmentation du taux de glycémie des rats Wistar males traités pendant 07 jours.



**Figure 16: évaluation de la glycémie des différents lots.**

(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).

#### IV.2.1.2. Effet du traitement sur le profil lipidique

Plusieurs études ont rapporté que les complications cardiovasculaires associées au stress oxydatif sont dues aux perturbations du métabolisme lipidique (Steinberg, 1991), Pour cette raison, quatre paramètres lipidiques ont été évalués, le CHL<sub>T</sub>, TG, HDL et le LDL.

Le G2 montre que les concentrations, du cholestérol (fig. 17), du LDL (fig. 18) et des triglycérides (fig. 19) sont significativement élevées ( $P < 0,05$ ), respectivement, avec des taux de 2.26, 1.71 et 1.33 g/l, alors que la concentration des HDL (fig. 20) est plus basse avec un taux de 0,29 g/l par rapport au groupe témoin.

Les études menées par Yousef (2004) et Bhadauria *et al.* (2008) ont prouvé que l'exposition des rats Wistar à l'aluminium provoque d'une manière significative ( $P < 0.05$ ) une augmentation des taux de cholestérol et des triglycérides sanguins. De même Newairy *et al.* (2009) ont observé une augmentation des taux de cholestérol, des triglycérides et des LDL et une diminution du taux des HDL chez des rats Wistar en raison de l'administration d'AlCl<sub>3</sub> à



ces derniers et ont déduit que l'hyperlipidémie due à l'administration d' $\text{AlCl}_3$  indique une perte d'intégrité des membranes cellulaires.

[Wessam \(2012\)](#) a montré que le traitement des rats mâles par l' $\text{AlCl}_3$  pendant 30 jours a provoqué chez ces derniers des hausses importantes du cholestérol total et des triglycérides.

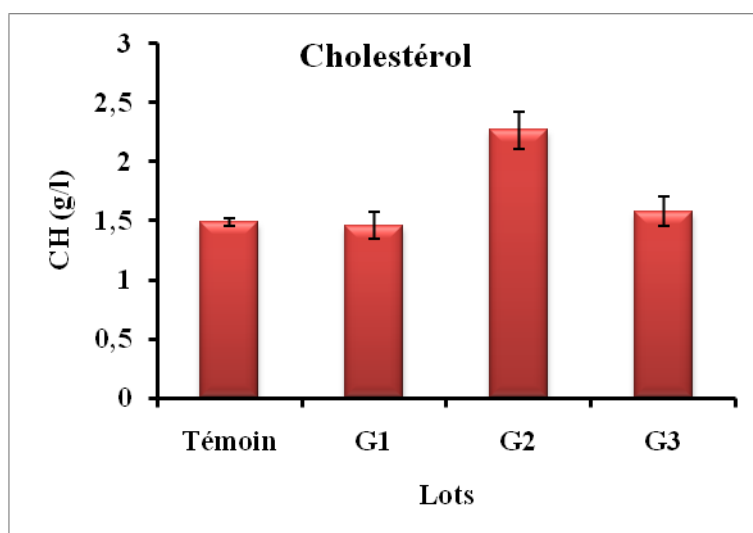
En outre, [Shukla et al. \(2004\)](#) ont conclu que l'augmentation d'une manière significative des taux des paramètres du profil lipidique indique une peroxydation lipidique sévère et des dommages physiologiques dans les organes après administration de  $\text{CCl}_4$ . Le stress oxydatif augmente l'approvisionnement des acides gras non essentiels, qui à leur tour augmente le taux de cholestérol et des triglycérides dans le sérum et les tissus ([Bhadauria et al., 2008](#)).

Le groupe G1 qui a reçu l'extrait de caroube pendant 28 jours, a révélé une légère diminution du taux de cholestérol qui est de 1.45 g/l, un taux de LDL de 0.64 g/l, tandis que les valeurs de HDL (0.718 g/l) et triglycérides (0.466 g/l) sont similaires aux valeurs du groupe contrôle.

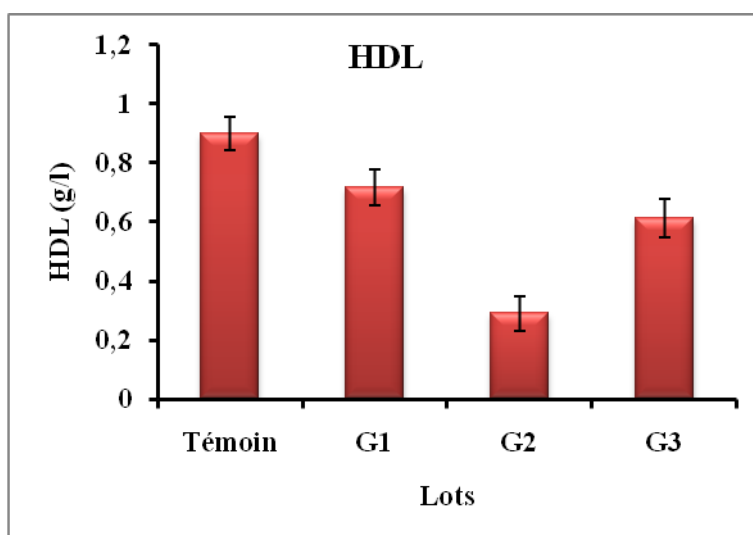
[Sebai et al. \(2013\)](#) ont montré que l'extrait de caroube a provoqué une diminution de la peroxydation des lipides chez des rats sains traités par l'extrait de caroube et ont conclu que ce dernier présente des propriétés antioxydantes.

Les taux de cholestérol, de triglycérides, de LDL et de HDL rencontrés chez les rats du G3 traités par l'extrait de caroube suivi par l' $\text{AlCl}_3$  sont, respectivement de 1.57, 0.68, 0.83 et 0.61 g/l. Ces résultats sont significativement différents ( $P < 0.05$ ) de ceux du G2. Ce ci explique que la caroube diminue le taux de cholestérol, de triglycérides et de LDL et augmente le taux des HDL.

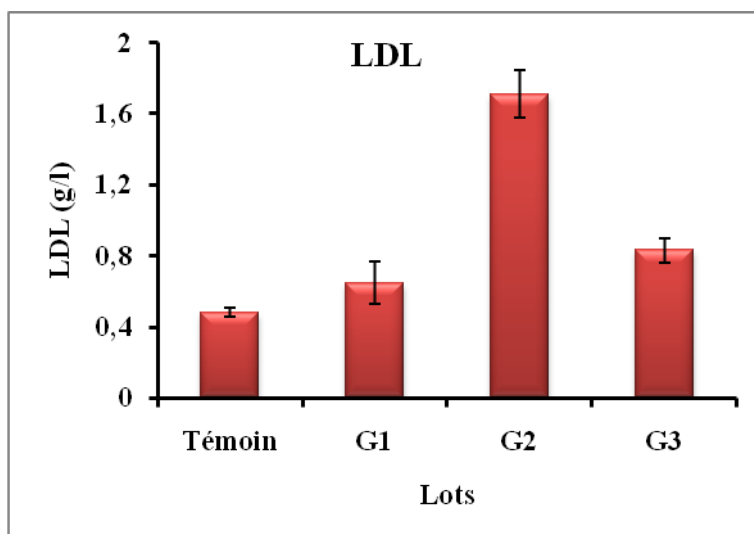
Le lien entre dyslipidémies et maladies cardio-vasculaires est particulièrement bien établi. L'élévation du Cholestérol Total et du LDL Cholestérol est associée à une augmentation du risque cardio-vasculaire de façon curvilinéaire. Une faible concentration de HDL peut être considérée comme un facteur de risque supplémentaire, alors qu'une concentration élevée de HDL est un facteur de protection ([HAS, 2005](#)).



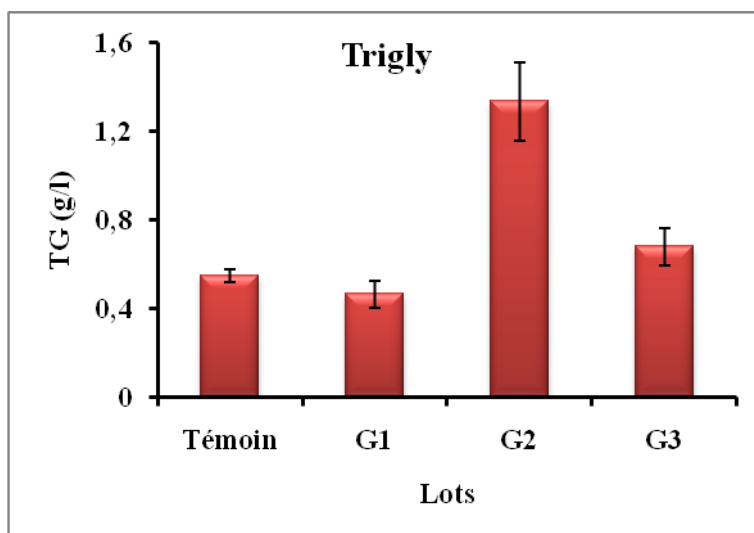
**Figure 17: Evaluation du cholestérol des différents lots.**  
(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).



**Figure 18: Evaluation des HDL des différents lots.**  
(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).



**Figure 19: Evaluation des LDL des différents lots.**  
(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).



**Figure 20: Evaluation des triglycérides des différents lots.**  
(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).

#### **IV.2.1.3. Effet du traitement sur l'urémie**

Le dosage de l'urée est l'un des dosages les plus fréquemment effectués. Il permet en une première approximation de rechercher une insuffisance rénale avec le dosage de la créatinine (Siby, 2008).

Les taux de l'urée des différents groupes sont représentés dans la (fig. 21). On remarque une différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les quatre groupes. La concentration en urée des rats traités par l' $\text{AlCl}_3$  (G2) est de 0,84 g/l ce qui est largement supérieure (42,85% par rapport au témoin) au taux d'urémie chez le groupe témoin (0,36 g/l).

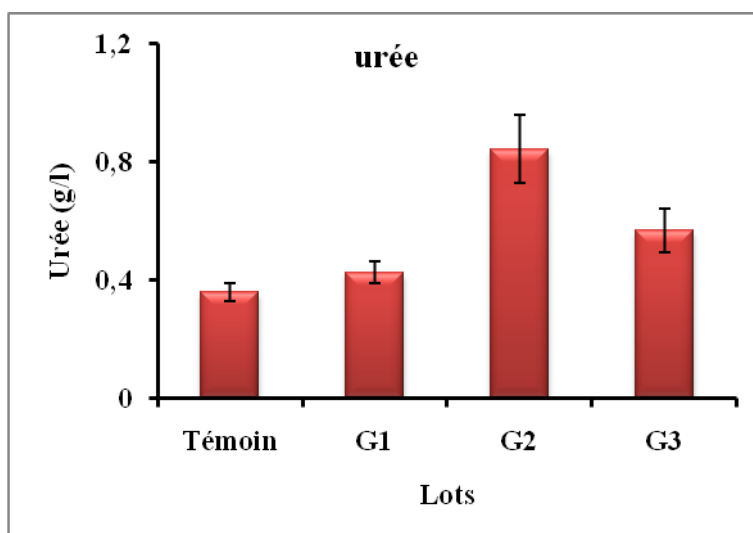
Nos résultats sont conformes à ceux rapportés par Hsouna *et al.* (2011) qui ont montré que l'administration du  $\text{CCl}_4$  par voie orale augmente le taux d'urée dans le sérum des rats expérimentés. Ainsi, Newairy *et al.* (2009) ont conclu que l'administration d' $\text{AlCl}_3$  par voie orale à des rats Wistar provoque une augmentation du taux d'urée.

Mahieu *et al.* (2005) ont démontrés que les altérations en urée peuvent être dues aux perturbations métaboliques (exemple : fonctionnement rénal). De même, Newairy *et al.* (2009) ont conclus que l'accumulation des concentrations de l'urée dans le plasma des rats traités avec l'aluminium peut être due à son effet indésirable sur la fonction du foie, ceci est confirmé par l'augmentation des activités enzymatiques des transaminases (ASAT et ALAT).

Le G1 qui a reçu que l'EEC, a montré une légère augmentation du taux d'urée qui est de 0.426 g/l par rapport au témoin, et une diminution significative ( $P < 0,05$ ) par rapport au G2. En outre, Sebai *et al.* (2013) ont rapportés que le traitement des rats avec l'extrait de caroube pendant 7 jours à différentes doses n'a pas d'incidence au niveau rénal.

L'administration de l'extrait de caroube suivi par l' $\text{AlCl}_3$  (G3) a provoqué une baisse importante de l'urémie (0.56 g/l) en comparaison avec le G2 qui n'a reçu que l' $\text{AlCl}_3$ . Ces résultats montrent que la caroube empêche l'augmentation du taux de l'urée dans le sang, ce qui nous permet de suggérer qu'elle a un rôle prophylactique sur le métabolisme des protéines et un effet préventif.

Selon Hsouna *et al.* (2011), la caroube empêche l'insuffisance rénale provoquée par l'administration du  $\text{CCl}_4$  chez des rats traités pendant une période de 08 jours.



**Figure 21: Evaluation de l'urée des différents lots.**

(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).

#### IV.2.1.4. Effet du traitement sur la créatininémie

La créatinine est un dérivé de la dégradation de la créatine et du phosphocréatine qui sont considérées comme des composés de stockage de l'énergie dans les muscles. La concentration de la créatinine dans le sérum peut se varier selon un certain nombre de facteurs incluant le régime alimentaire, la masse musculaire et le sexe (Boubchir, 2002). Elle est exclusivement éliminée par les reins, ce qui en fait un très bon marqueur de la fonction rénale (Siby, 2008).

La concentration de la créatinine est considérée souvent comme un paramètre clinique pour détecter les effets toxiques liés au traitement par des composées sur les reins chez les animaux expérimentaux (Travlos *et al.*, 1996). Ces données peuvent expliquer l'augmentation de la créatinine chez les rats du G2 (fig. 22), à qui on a administré uniquement l' $\text{AlCl}_3$ , par rapport aux témoins.

Nos résultats sont similaires à ceux de Newairy *et al.* (2009) qui ont révélé une augmentation de la créatinine suite à l'administration orale d' $\text{AlCl}_3$  à des rats Wistar.

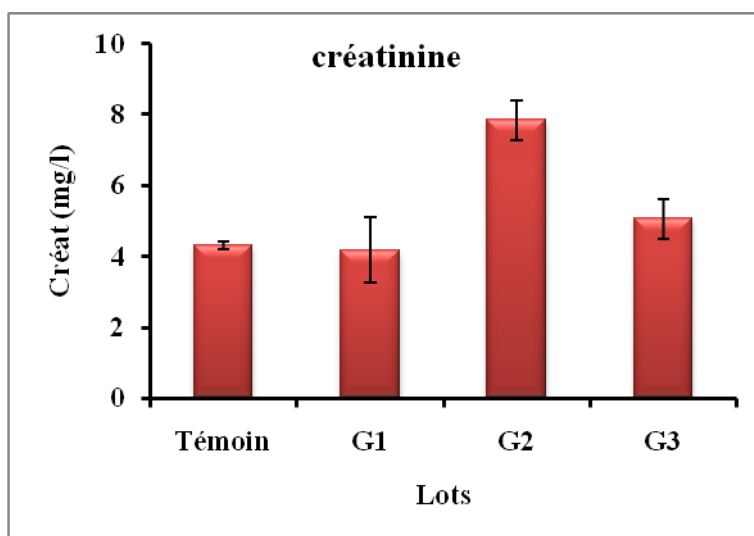
Le traitement des rats par injection intrapéritonéale d'une dose de  $\text{CCl}_4$  pendant 8 jours a augmenté le taux de créatinine dans le sérum (Hsouna *et al.*, 2011).

Une légère diminution de la créatinine sanguine est observée chez les rats du G1 traités par l'extrait de caroube qui est de 4.18 g/l (fig. 22) par rapport au groupe contrôle, ce

résultat affirme celui trouvé dans la présente étude concernant le dosage de l'urée chez le même groupe. De plus, la caroube n'induit pas des dommages au niveau rénal indiqué par la détermination de l'urée et de la créatinine (Sebai *et al.*, 2013).

Par ailleurs, une augmentation de la créatinine est signalée chez les rats du G3 (qui ont reçu l'extrait de caroube suivi d'AlCl<sub>3</sub>, avec un taux de 5.06 g/l par rapport aux témoins, et une baisse significative (P<0.05) par rapport au groupe G2 traité uniquement par l'AlCl<sub>3</sub>, ce qui nous a conduit à penser soit à l'amélioration des changements rénaux chez les rats intoxiqués, soit à la diminution du catabolisme de la créatine et la phosphocréatine au niveau des muscles par le biais des substances actives de la caroube. Notre résultat est en accord avec celui de Hsouna *et al.* (2011) qui ont conclu que le prétraitement des rats avec la caroube a empêché les troubles causés par l'administration de CCl<sub>4</sub> au niveau des marqueurs rénaux.

La présence de caroube avec l'AlCl<sub>3</sub> empêche les effets toxiques chez les rats traités avec ce dernier. De cela, on peut dire que la caroube a des influences bénéfiques et pourrait être en mesure de contrecarrer la toxicité d'AlCl<sub>3</sub>.



**Figure 22: Evaluation de la créatinémie des différents lots.**

(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).

#### IV.2.1.5. Effet du traitement sur les transaminases hépatiques (TGO et TGP)

La présence d'une grande quantité de TGO dans le foie indique l'existence des affections hépatiques. Son augmentation dans le sérum se produit lorsqu'il y'a une destruction des cellules hépatiques (Hassoun et Stohs, 1995).

Dans la présente étude, les activités des TGO (fig. 23) et TGP (fig. 24) sont significativement élevées ( $P < 0,05$ ) dans le plasma du groupe G2 (traité par l' $\text{AlCl}_3$ ) par rapport au groupe contrôle, qui sont, respectivement, 319,2 UI/l et 156,6 UI/l.

L'extrait de caroube administré par voie orale au groupe G1, contrairement à l' $\text{AlCl}_3$  a provoqué une diminution hautement significative ( $P < 0,05$ ) des taux de la TGO et la TGP qui sont respectivement les suivants 122,2 UI/l et 43,16 UI/l par rapport au groupe contrôle.

Nos résultats sont conformes à ceux rapportés par [Newairy et al. \(2009\)](#) qui ont montrés que le traitement des rats par administration orale d'une dose d' $\text{AlCl}_3$  pendant 70 jours a provoqué une augmentation du taux de la TGO et de la TGP et ont déduit que ce taux élevé peut être dû à un échappement de ces enzymes dans le sang et/ou un dysfonctionnement et une perturbation du foie dans la biosynthèse de ces enzymes avec un changement de la perméabilité des membranes des cellules hépatiques.

En outre, [Hsouna et al. \(2011\)](#) ont prouvé que l'administration de  $\text{CCl}_4$  par injection intrapéritonéale pendant 8 jours à des rats Wistar a augmenté les taux des transaminases plasmatiques (TGO et TGP). De même, [Bhadauria et al. \(2008\)](#) ont rapportés que le traitement des rats Wistar par le  $\text{CCl}_4$  pendant trois jours a significativement augmenté les valeurs des TGO et TGP dans le sérum, ce qui indique une détérioration dans le fonctionnement hépatique dû au dommage parenchymique après l'administration de  $\text{CCl}_4$ .

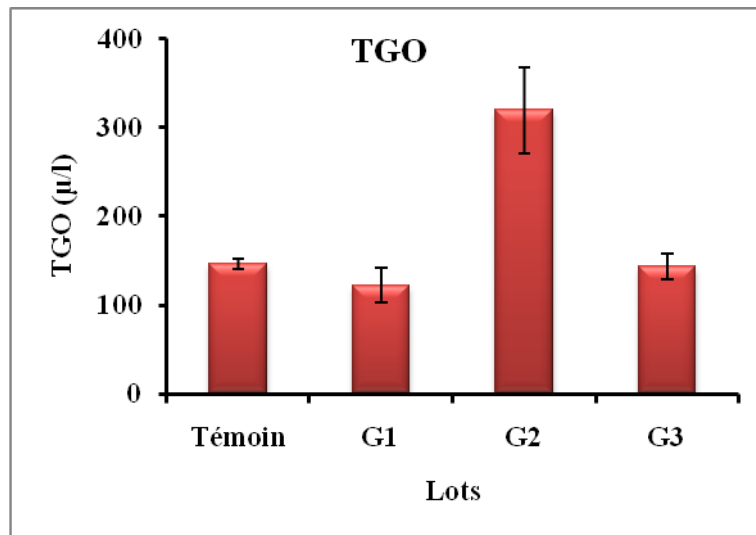
[Wessam \(2012\)](#) a aussi conclu que l'administration orale d'une dose de 20 mg / kg d' $\text{AlCl}_3$  pendant 30 jours a induit une augmentation significative ( $P < 0,05$ ) au niveau des concentrations plasmatiques de TGO et TGP, qui peut être un signe d'insuffisance hépatique chez des rats mâles.

Par contre, les rats du G3 traités par l'extrait de caroube suivi d' $\text{AlCl}_3$  ont montré une diminution hautement significative ( $P < 0,05$ ) de TGO et TGP par rapport au G2, qui n'a reçu que l' $\text{AlCl}_3$  avec des taux respectifs qui sont de 143,4 UI/l et 72 UI/l. Une augmentation importante est constatée par rapport au 1<sup>er</sup> groupe qui a reçu uniquement l'extrait de caroube. En comparant les résultats du groupe 03 avec ceux du groupe contrôle on remarque que l'administration de l'extrait de caroube et d' $\text{AlCl}_3$  a légèrement baissé le taux de TGO et a provoqué une augmentation de la TGP par rapport aux témoins.

Ces résultats confirment que le pré traitement des rats avec l'extrait de caroube intoxiqués par l' $\text{AlCl}_3$  a entraîné l'amélioration de TGO et TGP indiquant l'amélioration de la

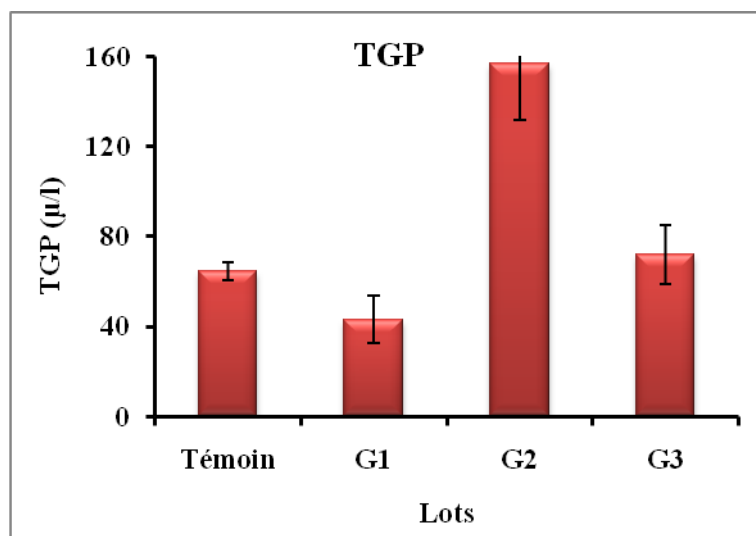
protection contre la toxicité d' $\text{AlCl}_3$ . Ce qui nous mène à conclure que l'effet hépatoprotecteur de la caroube peut être attribué à son effet antioxydant.

Hsouna *et al.* (2011) ont également montré que l'administration de l'extrait de caroube suivi par le  $\text{CCl}_4$  à des rats a atténué les troubles hépatiques provoqués par le  $\text{CCl}_4$  en diminuant les taux de TGO et TGP.



**Figure 23: Evaluation de la transaminase glutamate oxaloacétate (TGO).**

(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).



**Figure 24: Evaluation de la transaminase glutamate pyruvate (TGP) des différents lots.**

(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).



#### **IV.2.2. Etude du statut antioxydant**

La caroube constitue une source importante d'antioxydants naturels. Dans la présente étude elle a été évaluée pour son effet sur la peroxydation lipidique et le statut antioxydant (l'activité enzymatique du superoxyde dimustase et de la catalase ainsi que l'activité plasmatique de la glutathion peroxydase) affectées par le stress oxydant sur des rats traités par l' $\text{AlCl}_3$ .

##### **IV.2.2.1. Effet sur le Malondialdéhyde (MDA)**

La détermination du taux du malondialdéhyde plasmatique (fig. 25) a révélé une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) du taux de MDA chez les rats du G2 qui ont reçu une dose journalière d' $\text{AlCl}_3$  pendant 28 jours par rapport aux témoins. Cette augmentation est de 43,61% avec un taux de 6,57 nmol/ml.

Notre résultat est similaire à celui de [Wessam \(2012\)](#) qui a indiqué que le taux de MDA a significativement augmenté ( $P < 0.05$ ) chez les rats mâles traités par l' $\text{AlCl}_3$  pendant 28 jours par rapport au groupe contrôle. De même, [Newairy et al. \(2009\)](#) ont montré dans une étude faite sur des rats Wistar que le niveau de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) a significativement augmenté au niveau du foie, des reins et du cerveau des rats traités avec l' $\text{AlCl}_3$  par rapport au témoin.

Ainsi, [Eraslan et al. \(2007\)](#) ont obtenus des résultats identiques chez des rats souffrant d'un stress oxydatif provoqué par le fluorure de sodium. [Bhadauria \(2012\)](#) a observé une hausse significative des taux de MDA dans le foie, le rein et le cerveau des rats Wistar traités par l'aluminium.

En outre, les résultats de [Hsouna et al. \(2011\)](#) ont montré que l'administration orale d' $\text{AlCl}_3$  pendant 08 jours a augmenté les marqueurs de stress oxydatif entraînant une augmentation des niveaux de la peroxydation lipidique (MDA) au niveau du foie et des reins des rats de laboratoire.

L'administration orale de l'extrait de caroube EEC pendant 28 jours (G1) a entraîné une légère diminution du taux de MDA plasmatique chez les rats Wistar par rapport au groupe témoins, et qui est de 2,61 nmol/ml.

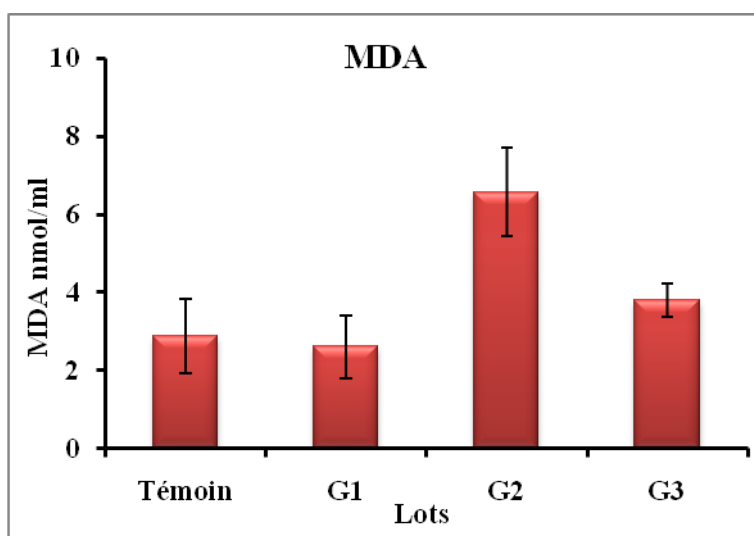
Le résultat ci-dessus corrobore pleinement les différentes études menées par [Hsouna et al. \(2011\)](#) et [Ahmed \(2010\)](#) sur des rats Wistar et qui ont démontré que la caroube réduit le taux de MDA au niveau de différents organes.

De même, [Sebai et al. \(2013\)](#) qui ont montré qu'un traitement subaigu (7 jours) des rats Wistar avec la caroube à différentes doses est en mesure d'atténuer la peroxydation des lipides indiqué par la diminution des taux de MDA dans le cerveau et le cœur.

On remarque que le prétraitement des rats (G3) par voie orale avec l'extrait de caroube a empêché la peroxydation lipidique provoqué par l' $\text{AlCl}_3$  en diminuant significativement le taux de MDA plasmatique jusqu'à 3,8 nmol/ml par rapport au groupe qui n'a reçu que l' $\text{AlCl}_3$ . D'autre part, en comparant la valeur obtenue pour ce groupe avec celle du groupe contrôle, on observe une légère augmentation du taux de MDA chez les rats traité par l'extrait de caroube suivi par l' $\text{AlCl}_3$ .

Le résultat de cette étude est compatible avec celui d'[Ahmed \(2010\)](#) qui a montré que les polyphénols de caroube empêchent la peroxydation des lipides par la réduction du taux de MDA des rats intoxiqués par le cisplatine.

D'autre part, il a été récemment montré par [Hsouna et al. \(2011\)](#) que la fraction d'acétate d'éthyle de caroube a empêché la lipopéroxydation des rats Wistar en tant qu'un antioxydant efficace et a contribué à la prévention des dommages peroxydatifs engendrés par l'administration de  $\text{CCl}_4$  par injection intrapéritonéale pendant 8 jours.



**Figure 25: Dosage du MDA au niveau du plasma.**  
(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).

#### **IV.2.2.2. Effet sur l'activité de la catalase (CAT)**

La (fig. 26) montre l'activité enzymatique de la catalase, en tant qu'enzyme antioxydante plasmatique chez les rats des différents lots.

L'activité de la catalase est significativement réduite ( $P < 0.05$ ) chez les rats du G2 traités uniquement par l' $\text{AlCl}_3$  avec un taux de 19,04 U/mg Hb par rapport aux rats du groupe témoin qui est de 57,09 U/mg Hb.

Cette réduction de l'activité de la catalase indique un stress oxydatif provoqué par l'administration orale du trichlorure d'aluminium aux rats du G2.

Il existe une corrélation entre le résultat de la présente étude et celui obtenu par [Wessam \(2012\)](#) qui a montré que l'administration orale d' $\text{AlCl}_3$  a contribué à la diminution significative ( $P < 0.05$ ) de l'activité enzymatique de la catalase dans le foie des rats traités par rapport aux témoins. Cela est confirmé par l'étude menée par [Newairy et al. \(2009\)](#) qui ont observé une baisse significative de l'activité de la catalase dans le cerveau, le foie et les reins des rats exposés à l'aluminium. La même diminution de l'activité de la catalase tissulaire a été observée dans une étude menée par [Bhadauria \(2012\)](#) chez des rats traités par l'aluminium.

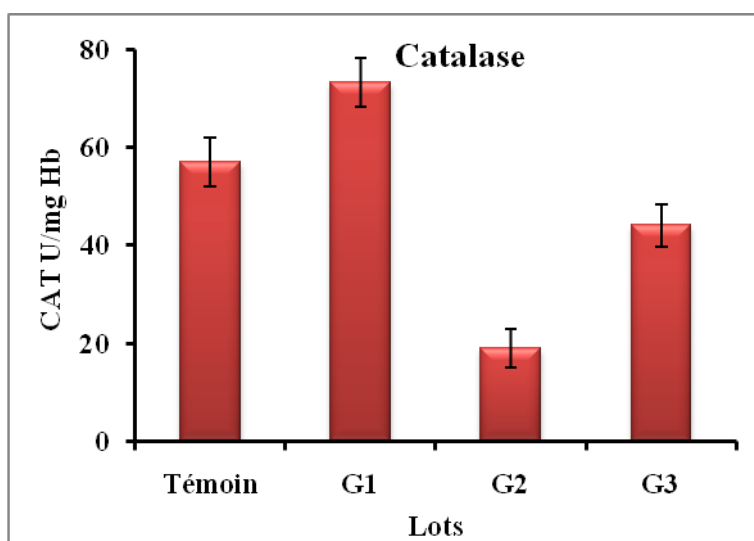
[Eraslan et al. \(2007\)](#) ont remarqué que l'exposition des rats au fluorure de sodium a entraîné une augmentation de l'activité de la catalase par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, il a été démontré par [Hsouna et al. \(2011\)](#) que l'administration orale de  $\text{CCl}_4$  a entraîné une diminution de l'activité de la catalase au niveau du foie et des reins par rapport aux rats témoins.

En comparant la valeur de l'activité de la catalase du groupe témoin avec celle obtenue pour le G1 qui a reçu uniquement l'extrait de caroube on remarque une augmentation chez ce dernier qui est estimée à 73,34 U/mg Hb ; ceci est confirmé par [Hsouna et al. \(2011\)](#) qui ont observé une augmentation de la catalase chez les rats traités par la caroube. De même, [Ahmed \(2010\)](#) a rapporté que la caroube a engendré l'élévation du niveau de la catalase chez des rats traités par ce dernier.

L'activité de la catalase a connu une augmentation significative ( $P < 0.05$ ) chez les animaux du groupe G3 (44,12 U/mg Hb) qui a été traité par la caroube suivie par l' $\text{AlCl}_3$  par rapport aux rats du G2 qui ont été exposés à l' $\text{AlCl}_3$  seulement. Par ailleurs, cette valeur est inférieure à celle obtenue pour le groupe témoin.

Il existe une similarité entre le résultat de notre étude et celui de [Hsouna et al. \(2011\)](#) qui ont montré que le prétraitement des rats exposés au  $\text{CCl}_4$  par la fraction d'acétate d'éthyle de caroube a entraîné une augmentation de l'activité de la catalase par rapport aux rats traités seulement par le  $\text{CCl}_4$ .

En outre, [Ahmed \(2010\)](#) a révélé une augmentation de l'activité de la catalase des rats traités par la caroube ensuite par le cisplatine par rapport au groupe qui n'a reçu que le cisplatine.



**Figure 26: Dosage de la catalase au niveau du plasma.**  
(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).

#### IV.2.2.3. Effet sur l'activité du superoxyde dismutase (SOD)

Les résultats du dosage du superoxyde dismutase des rats des différents groupes sont rapportés dans [la figure 27](#).

Le dosage de la SOD dans le plasma des rats exposés à une dose quotidienne d' $\text{AlCl}_3$  pendant 28 jours, montre une diminution de la SOD (11,11 U/cg Hb) par rapport au groupe témoin (6,78 U/cg Hb).

[Wessam \(2012\)](#) a révélé une baisse hautement significative ( $P < 0.05$ ) de l'activité enzymatique de la SOD au niveau du foie des rats traités par l' $\text{AlCl}_3$  par rapport aux rats

témoins. De plus, [Bhadauria \(2012\)](#) a mentionné que l'exposition aigue des rats à l'aluminium a engendré une baisse significative de l'activité enzymatique de la SOD au niveau du cerveau, le foie et les reins. De même, [Newairy et al.\(2009\)](#) ont enregistré une réduction significative de la superoxyde dismutase dans le foie, les reins et le cerveau des rats exposés à l' $AlCl_3$ .

En outre, [Hsouna et al. \(2011\)](#) ont rapportés dans une étude menée sur des rats que l'administration du  $CCl_4$  à ces derniers a entraîné une baisse importante de l'activité enzymatique de la SOD dans le foie et les reins.

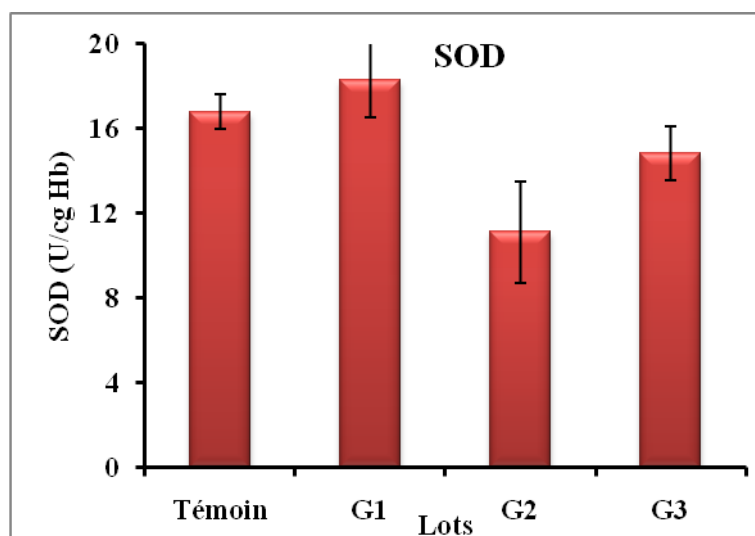
Par ailleurs, [Eraslan et al. \(2007\)](#) ont mentionné que le traitement des rats par le fluorure de sodium s'est soldé par une augmentation de l'activité de la SOD par rapport au groupe contrôle.

Chez le groupe 1 traités par l'extrait de caroube, on remarque que l'activité de la SOD se rapproche de celle des rats témoins avec un taux de 18,27 U/cg Hb.

Le résultat de la présente étude est en concordance avec la littérature ([Hsouna et al. 2011](#) ; [Ahmed 2010](#)) qui ont observé les mêmes effets au niveau de l'activité de la SOD chez des rats Wistar traités par la caroube.

Le prétraitement des rats Wistar exposés à l' $AlCl_3$  avec l'extrait de caroube (groupe 3) a conduit à l'augmentation de l'activité de la SOD avec un taux de 14,83 U/cg Hb par rapport aux rats traités uniquement par l' $AlCl_3$  du 2<sup>ème</sup> groupe. Cela permet de conclure que la caroube améliore positivement l'activité enzymatique de la SOD.

A des fins comparatives, [Hsouna et al. \(2011\)](#) ont également enregistré une augmentation au niveau de l'activité enzymatique de la SOD dans le foie et les reins des rats traités par la caroube avant l'administration du  $CCl_4$  par rapport aux rats traités uniquement par le  $CCl_4$ .



**Figure 27: dosage de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase.**

(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).

#### IV.2.2.4. Effet sur l'activité plasmatique de la Glutathion peroxydase

Le dosage de la forme réduite du glutathion (fig. 28) a montré une baisse hautement significative ( $P < 0.05$ ) au niveau du plasma des rats du groupe 02 à qui on a administré oralement une dose quotidienne d' $\text{AlCl}_3$  avec un taux de 22,57 U/mg Hb par rapport aux rats témoins qui ont enregistré un taux estimé à 58,11 U/mg Hb.

Les mêmes effets ont été observés par Newairy *et al.* (2009) avec une réduction significative de la glutathion-S-transférase au niveau du foie, des reins et du cerveau des rats exposés à l' $\text{AlCl}_3$  pendant une période de 70 jours. De plus, Wessam (2012) a rapporté que l'administration orale d' $\text{AlCl}_3$  chez des rats était associée à une diminution significative ( $P < 0,05$ ) de l'activité de l'enzyme antiradicalaire Glutathion peroxydase.

Ce résultat est similaire à celui de Hsouna *et al.* (2011) qui a noté une augmentation des marqueurs du stress oxydatif entraînant une réduction du niveau de l'activité plasmatique de la Glutathion peroxydase dans le foie et les reins des rats exposés au  $\text{CCl}_4$  pendant 08 jours.

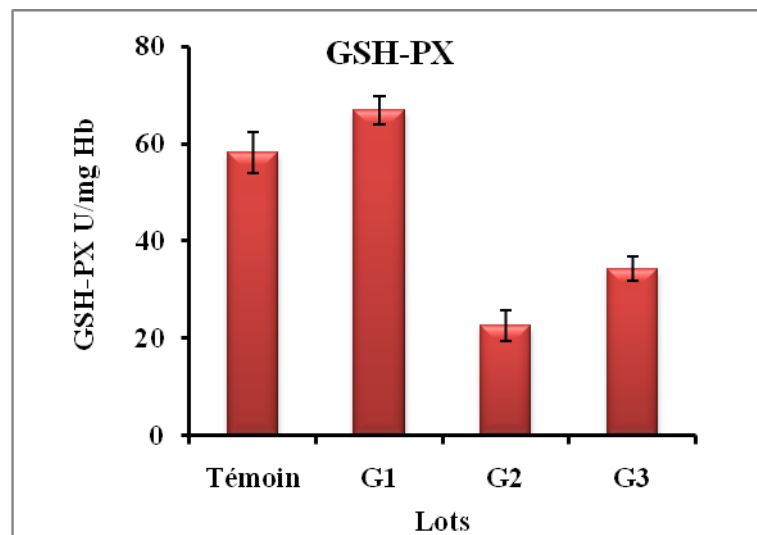
En outre, Bhadauria (2012) a montré que l'aluminium a provoqué un stress oxydatif indiqué par une diminution significative de l'activité plasmatique de la GSH-PX au niveau du cerveau, du foie et des reins des rats Wistar traités.

D'après nos résultats, on note une augmentation de la concentration de l'activité plasmatique de la Glutathion peroxydase chez le G1 traité par l'extrait de caroube avec un taux de 66,8 U/mg Hb comparé au groupe témoin.

Ce résultat est compatible avec celui des travaux réalisés par [Hsouna et al. \(2011\)](#) et [Ahmed \(2010\)](#) qui ont rapporté que l'administration de la caroube à des rats a empêché la réduction de l'activité plasmatique de la Glutathion peroxydase.

L'exposition des rats à l' $AlCl_3$  après l'administration orale de l'extrait de caroube (G3) a provoqué un accroissement de l'activité de la Glutathion peroxydase au niveau plasmatique des rats du G3 avec un taux de 34,32 U/mg Hb comparé au 2ème groupe.

Ceci est en accord avec ce qui a été rapporté par [Hsouna et al. \(2011\)](#) qui ont montré que l'administration de la caroube suivie par l' $AlCl_3$  a empêché la diminution de l'activité plasmatique de la Glutathion peroxydase des rats Wistar.



**Figure 28: dosage de l'activité plasmatique de la Glutathion peroxydase.**  
(Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$ SD (n=5)).

## *Conclusion et perspectives*



## ***Conclusion et perspectives***

Le stress oxydatif se réfère à une perturbation dans la balance métabolique cellulaire durant laquelle, la génération d'oxydants accable le système de défense antioxydant provoquant ainsi des dommages cellulaires importants pouvant conduire à des défaillances au sein d'un organe (Sorg, 2004). En raison de la toxicité des antioxydants synthétiques, le recours à des phytonutriments doués d'activités antioxydantes s'avère très avantageux et d'actualité. En outre, les recherches scientifiques ont démontré, sur le plan phytochimique, que la caroube est riche en antioxydants (flavonoïdes, isoflavonoïdes, tanins, composés phénoliques), en sucres, protéines, fibres, potassium et calcium (El hajaji *et al.*, 2010). Par ailleurs, en thérapeutique, cette plante est connue pour son effet hypocholestérolémiant, antiprolifératif, anti-diarrhéique, contre les troubles digestifs, etc (Hariri *et al.*, 2009).

Dans notre étude, les extraits des pulpes de *Ceratonia Siliqua* L. et en particulier l'extrait éthanolique semblent présenter un intérêt réel et potentiel par leurs activités antioxydantes qui ont été établies aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

En ce qui concerne l'étude physico-chimique, nous avons remarqué que la farine des pulpes de caroube est riche en sucres totaux mais pauvre en protéines et lipides et présente une faible teneur en acide ascorbique.

L'activité anti-oxydante des extraits EEC, EMC et EWC via le test du DPPH ont révélé que L'EEC a le plus d'activité anti-oxydante avec une activité anti-radicalaire significative dose-dépendante. Ces observations préliminaires laissent penser que cette plus forte activité anti-radicalaire de cet extrait (EEC) pourrait être liée à leur teneur en polyphénols qui est également plus élevée par rapport à celle des autres extraits. Ces mêmes résultats ont été constatés avec les flavonoïdes.

L'identification des fractions d'EEC par LC-MS/MS a montré la présence de composés polyphénoliques, d'acides Palmitoléique, Isoprenyl coumarique, cinnamique et ses dérivés. Le Prenyl caffeate a été trouvé dans la plupart des fractions, tandis que de nombreux

types de flavonoïdes, comme la Chrysin, le Kaempferol, la méthyl quercétine, la quercétine et la tectochrysin, ont été trouvés dans ces fractions.

L'étude *in vivo* a permis d'évaluer l'effet bénéfique de l'extrait éthanolique de caroube contre le stress oxydant engendré par l'exposition des rats wistar au trichlorure d'aluminium. Le prétraitement des rats par voie orale utilisant cet extrait a entraîné une amélioration significative de la capacité antioxydante totale du sang par l'augmentation des activités des enzymes antioxydantes (la SOD, la CAT et la GSH-PX) et une prévention contre la peroxydation lipidique en diminuant le taux de MDA.

Par ailleurs, les résultats des analyses biochimiques sanguines montrent que la caroube peut probablement empêcher les troubles causés par le chlorure d'aluminium toxique, notamment les complications cardiovasculaire, hépatique et rénale chez les rats Wistar expérimentés.

## *Références bibliographique*

## **Références bibliographiques**

1. **Aafi. A. (1996).** Note technique sur le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.), Centre Nationale de la Recherche Forestière, Rabat (Maroc), pp. 10.
2. **Abi Azar. R. (2007).** Complexassions des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier. Propriétés technologiques des coagulums obtenus, Agroparistech Ecole Doctorale Abies, Thèse de doctorat.
3. **Abreu. I.A. ; Cabelli. D.E. (2010).** Superoxide dismutases-a review of the metal associated mechanistic variations. *Biochim. Biophys. Acta.* 1804: 263-274.
4. **Aebi. H. (1974).** Catalase in method of enzymatic analysis, Bergmayer H.U. Chimie, Ed: 2, Vol. 2, Weinheim, F.R.G. 673-684.
5. **Afonso. V. ; Champy. R. ; Mitrovic. D. ; Collin. P. (2007).** Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxydes dismutases: Rôle dans les maladies rhumatismales. *Rev. Rhum.* 74: 636-43.
6. **Ahmed. M.M. (2010).** Biochemical studies on nephroprotective effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) growing in Egypt. *Nat. Sci.* 8:41-47.
7. **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, pp.1-4.
8. **Akowauh. G.A. ; Zhari. I. ; Norgyati. I. ; Sadikun. A. ; Khamsah. S.M. (2004).** The effects of different extraction solvents of varying polarities on polyphenols of *Orthosiphon stamineus* and evaluation of the free radical-scavenging activity. *Food chemistry* 87: 559-566.
9. **Albanell. E. ; Caja. G. ; Plaixats. J. (1991).** Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles. *Options Méditerranéennes - Série Séminaires – n°16:* 135-136.
10. **Ames. B.N. ; Shigenaga. M.K. ; Hagen. T.M. (1993).** "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7915-7922.
11. **APG. II. (2003).** Angiosperm Phylogeny Group II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot. J. Linn. Soc.* 141: 99-436p.

12. **Arnous. A. ; Makris. D.P. ; Kefalas. P. (2002).** Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 655–665.
13. **Audigié. C. ; Figarella. J. ; Zonszain. F. (1978).** Manipulation d'analyse biochimique. Doin (Ed). Paris, 247.
14. **Audigie. C.L. ; Dupont. G. (1982).** Principes des méthodes d'analyses biochimiques, Paris, pp. 566-567.
15. **Audigié C, Dupont G, Zonszain F. (1983).** Principes des méthodes d'analyse biochimique. *Ed. Doin, T. 2, Paris, 144 p.*
16. **Avallone. R. ; Plessi. M. ; Baraldi. M. ; Monzani. A. (1997).** Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua* L.): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins. *Journal of food composition and analysis*, Vol.10, pp.166–172.
17. **Ayaz. F.A. ; Torun. H. ; Ayaz. S. ; Correia. P.J. ; Alaiz. M. ; Sanz. C. ; Gruz. J. ; Strnad. M. (2007).** Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia Siliqua* L.): Sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds. *Journal of food quality*, vol. 30, N° 6, pp. 1040-1055.
18. **Ayaz. F.A. ; Torun. H. ; Glew. R.H. ; Bak. Z.D. ; Chuang. L.T. ; Presley. J.M. ; Andrews. R. (2009).** Nutrient Content of Carob Pod (*Ceratonia siliqua* L.) Flour Prepared Commercially and Domestically. *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 64, pp. 286–292.
19. **Batista. M.T. ; Amaral. M.T. ; Proença Da Cunha. A. (1996).** Carob fruits as source of natural antioxidant. In Proceeding of the III International Carob Symposium. Cabanas-Tavira, Portugal.
20. **Battle. I. (1997).** Current situation and possibilities of development of the carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) in the Mediterranean region. Unpublished FAO Report. Rome. Italy.
21. **Battle. I. ; Tous. J. (1988).** Lineasde investgati3n sobre el algarrobo (*Ceratonia siliqua* L.) en el IRTA, Cataluña (Espa1a). In: Brito de Carvalho JH, ed.I : Encorto Linhas de Investiga3o de Alfarroba. AIDA, Oeiras: AIDA, 92-104.
22. **Battle. I. ; Tous. J. (1997).** Carob tree *Ceratonia siliqua* L., Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17, Gatersleben: Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Rome: International Plant Genetic Resources Institute, pp. 92.

23. **Baytop. T. (1984).** Therapy with medicinal plant in Turkey (Past and Present). Publication of the Istanbul University. N°: 3255. Istanbul.
24. **Belaizi. M. ; Bolen. M.R. ; Boxus. P. (1994).** Régénération in vitro et acclimatation du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.), Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Ed. AUPELFUREF. John Libbey Eurotext. Paris, p. 227-22.
25. **Ben Hsouna. A. ; Trigui. M. ; Jaoua. S. (1986).** Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of the ethyl acetate extract of endemic *Ceratonia siliqua* leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 34, N° 5, pp. 827-829.
26. **Ben Hsouna. A. ; Trigui. M. ; Ben Mansour. R. ; Mezghani Jarraya. R. ; Damak. M. ; Jaoua. S. (2011).** Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *Journal of Food Microbiology*, 148(1):66-72.
27. **Bergmer. et al. (1977).** Provisional recommendation on IFCC method for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase. *Clin. Chem.*; 23: 887-889.
28. **Bernardo-Gil. M.G. ; Roquea. R. ; Roseirob. L.B. ; Duarteb. L.C. ; Giriob. F. ; Esteves. P. (2011).** Supercritical extraction of carob kibbles (*Ceratonias siliqua* L.). *J. of Supercritical Fluids*; 59 p.36-42.
29. **Berthelot. M.P.E. (1998).** Antioxidant status in diabetic rat liver. Effects of vanadate. *Biochem. Pharmacol.*; 45(3):539-42. La port chem. APPL 284.
30. **Bhadauria. M. ; Satendra. K.N. ; Sangeeda. S. (2008).** Multiple treatment of propolis extract ameliorates carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology* 46: 2703-2712.
31. **Bhadauria. M. (2012).** Combined treatment of HEDTA and propolis prevents aluminium induced toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology* 50: 2487-2495.
32. **Biaye. M. (2002).** Actions pharmacologiques des tannins. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Faculté de Médecine et de Pharmacie. Université Cheikh Anta Diop. Dakar. Sénégal. 53p + annexes.
33. **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* N°100, pp.1453-1455.
34. **Blanc. M. ; Moinard. C. ; Cynober. L. (2005).** "Monoxyde d'azote." Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier: p 25-43.
35. **Boubchir. M.A. (2002).** Biochimie de néphrologie. 2<sup>ème</sup> ed. ISBN-00789-23:320.

36. **Bruneton. J. (1999).** Flavonoïdes. In : Pharmacognosie, Phytochimie : Plantes médicinales. Ed. 3: Technique et Documentation. Paris. 10-353p.
37. **Bureš. P. ; Pavlíček. T. ; Horová. L. ; Nevo. E. (2004).** Microgeographic genome size differentiation of the carob tree, *Ceratonia siliqua*, at 'Evolution Canyon'. *Israel. An. Bot.* 93: 529-535.
38. **Catalano. L. ; Franco. I. ; De Nobili. M. ; Leita. L. (1999).** Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: a comparison of the Folin-Ciocalteu and HPLC methods. *Agrochimica* N°43, pp. 193-205.
39. **Chaudiere. J. ; Ferrari-Iliou. R. (1999).** Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology.* 37, 949-962.
40. **Cosme. F. ; Ricardo-Da-Silva. J.M. ; Lauriano. O. (2008).** Interactions between protein fining agents and proanthocyanidins in white wine. *Food Chem.* 106, 536-544.
41. **Cronquist. A. (1981).** An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press.
42. **Custódio. A.C. ; Almeida. L.O. ; Pinto. G.R. ; et al. (2011).** Analysis of the polymorphisms XRCC1Arg194Trp and XRCC1Arg399Gln in gliomas. *Genet Mol Res,* 10, 1120-9.
43. **Dakia. P.A. ; Wathelet. B. ; Paquot. M. (2007).** Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ *Food Chemistry* Vol. 102, N° 4, pp. 1368-1374.
44. **De Candolle. A. (1983).** L'origine des plantes cultivées. Balière, Paris, France.
45. **Dixon. R.A. ; Xie. D.Y. ; Sharma. S.B. (2005).** Proanthocyanidins-a final frontier in flavonoid research? *New phytologist,* 165, 9-28.
46. **Dubois. M.K.A. ; Gilli. Y.K. ; Hamilton. P.A. (1956).** Colometric method for determination of sugar and related substances. *Jour. Anal. et chem.* Vol. 28, pp. 350-356.
47. **El Batal. H. ; Hasib. A. ; Ouatmane. A. ; Dehbi. F. ; Jaouad. A. ; Boulli. A. (2011).** Sugar composition and yield of syrup production from the pulp of Moroccan carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Arabian Journal of Chemistry,* doi:10.1016.
48. **El Hajaji. H. ; Lachkar. N. ; Cherrah. Y. ; Alaoui. K. ; Farah. A. ; Ennabili. B. ; El Bali. B. ; Lachkar. M. (2010).** Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of Three Varieties of Carob Tree Leaves from Morocco. *Rec. Nat. Prod.* 4:4 193-204.
49. **El-sherif. G. ; El-sherif. M.A. ; Tolba. K.H. (2011).** Extraction and Identification of Natural Antioxidants from Liquorices (*Glycyrrhiza glabra*) and Carob (*Ceratonia*

- siliqua*) and its Application in El-Mewled El-Nabawy Sweets (Sesames and Folia). *Nature and Science*, 9(11).
50. **Elstner. E.F. ; Youngman. R.J. ; Obwald. W. (1983).** Superoxyde dismutase in methods of enzymatic analysis. 3<sup>rd</sup> ed. H.B Bergmeyer. 3:293-303.
  51. **Eraslan. G. ; Kanbur. M. ; Silici. S. (2007).** Evaluation of propolis effects on some biochemical parameters in rats treated with sodium Xuoride. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88 : 273–283.
  52. **Fadel. F. ; Fattouch. S. ; Tahrouch. S. ; Lahmar. R. ; Benddou. A. ; Hatimi. A. (2011).** Les composés phénoliques des pulpes et des graines de *Ceratonia siliqua*. *J. Mater. Environ. Sci.* 2 (3) 285-292, ISSN : 2028-250.
  53. **Fassati. P. ; Principe. I. (1982).** Clin chem.28.2077.
  54. **Favier. A. (2003).** Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité Chimique*. 108-115.
  55. **Flynn. N.E. ; Meininger. C.J. ; Haynes. T.E. ; Wu. G. (2002).** The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy, *Biomedicine Pharmacotherapy* N°56, pp. 427–438.
  56. **Fuorucci. S. (2006).** Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes : Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat de l'université de Nice Sophia Antipolis.
  57. **Gardès. A. ; Jore. M.D. (2005).** "Aspects physicochimiques des radicaux libres centrés sur l'oxygène." Radicaux libres et stress oxydant. Paris, Lavoisier: p 1-23.
  58. **Gayon. P.R. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. *Ed. Dunod*. P: 254.
  59. **Gharnit. N. (2003).** Caractérisation et essai de régénération in vivo du caoubier (*Ceratonia siliqua* L.) originaire de la province de chef chaouen (Nord-ouest du Maroc). Thèse de Doctorat en science. Université Abdelmalek Essaadi. Tanger.
  60. **Gharnit. N. ; El Mtili. N. ; Ennabili. A. ; Sayah. F. (2006).** Pomological characterization of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) from the province of Chef chaouen (NW of Morocco). *Moroccan J. Bio.*, Vol. 2-3, P.1-1.
  61. **Grolier. P. ; Borel. P. ; Scalbert. A. ; Remesy. C. (2001).** Les phytomicronutriments. In: *Traité de nutrition clinique de l'adulte, Médecine-Sciences*, Flammarion, 165-177.
  62. **Grove. T.H. (1979).** Effects of reagent PH on determination of HDL cholesterol precipitation with sadium phosphor tungstate magnesium. *Clin.chem.* 25:560.



63. **Gueye. P.M. (2007). Phénotypes majeurs** de l'haptoglobine humaine et stress oxydant induit par l'hémoglobine extra-érythrocytaire sur le globule rouge. Thèse de doctorat en Sciences Pharmaceutiques. Université Louis Pasteur – Strasbourg I. France.
64. **Hadi. M. (2004).** La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres : Etudes et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur.
65. **Halliwel. B. (1995). Antioxidant Characterization, Methodology and Mechanism.** *Biochem. Pharmacol.* 49, 1341-1348. 39.
66. **Halliwel. B. (1999).** How to characterize a biological antioxydant free radical. *Res.Comm*, 9:1-32.
67. **Halliwel. B. ; Whiteman. M. (2004).** Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British journal of pharmacology.* 142:31-2.
68. **HAS. (2005).** Haute Autorité de Santé.
69. **Haslam. E. (1989).** Plant polyphenols. Vegetable tannins revised. *Cambridge University Press.* Cambridge. 230p.
70. **Hassoun. E.A. ; Stohs. S.J. (1995).** Comparative studies on oxidative stress as a mechanism for the fetotoxic of TCDD, endrin and lindanein C57BL/6J and DBA/2J mice. *Teratology* 51: 186-192.
71. **Heim. E.K. ; Tagliaferro. A.R. ; Bobilya. D.J. (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry , metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 13: 572-584p.
72. **Hennebelle. T. (2006).** Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de la lamiles productrices d'antioxydants: *Marrubium peregrinum, Ballota larendana, Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbénacées). Thèse de doctorat. Lille, 304p.
73. **Hillcoat. D. ; Lewis. G. ; Verdcourt. B. (1980).** A new species of *Ceratonia* (Leguminocea-Caesalpinioideae) from Arabia and the Somali Republic. *Kew bull.* 35(2):261-271.
74. **Hsouna. A.B. ; Saoudi. M. ; Trigui. M. ; Jamoussi. K. ; Boudawara. T. ; Jaoua. S. ; Feki. A.E. (2011).** Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of *Ceratonia siliqua* leaf extract against CCl<sub>4</sub> induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats. *Food Chem. Toxicol.* 49(12):3183-91.

75. **Hussein. A.M.S. ; Shedeed. N.A. ; Abdel-Kalek. H.H. ; Shams El-Din. M.H.A. (2011).** Antioxidative, Antibacterial and Antifungal Activities of Tea Infusions from Berry Leaves, Carob and Doum. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, Vol. 61, No. 3, pp. 201-209.
76. **Joslyn. M.A. ; Nishira. H. ; Ito. S. (1968).** Leucoanthocyanins and related phenolic compounds of carob pods (*Ceratonia siliqua*). *J. Sci. Food Agric.*, N°19, pp.543-550.
77. **Karmen. A. ; Wroblewski. F. ; Ladue. J.S. (1955).** Transaminase activity in human blood. *J. Clin. Invest.* 34(1):126–131.
78. **Kivçak. B. ; Mert. T. (2002).** Antimicrobial and cytotoxic activities of *Ceratonia siliqua* L. extracts. *Turk J. Biol.* 26:197-200.
79. **Koechlin-Ramonatxo. C. (2006).** Oxygen, oxidative stress and antioxidant supplementation, or another way for nutrition in respiratory diseases. *Nutrition clinique et métabolique.* 20:165-177.
80. **Kruidenier. L. ; Verspaget. H.W. (2002).** "Oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease - radicals or ridiculous?" *Aliment Pharmacol. Ther.* 16: 1997-2015.
81. **Kumazawa. S. ; Taniguchi. M. ; Suzuki. Y. ; Shimura. M. ; Mi-Sun. K. ; Nakayama. T. (2002).** Antioxidant Activity of Polyphenols in Carob Pods. *J. Agric. Food Chem.*, Vol.50. N°2, pp. 373–377.
82. **Lambert. A.J. ; Brand. M.D. (2009).** "Reactive oxygen species production by mitochondria." *Methods Mol. Biol.* 554: 165-181.
83. **Legrand. F. ; Kunth. D. ; Mas-Hesse. J. M. ; Lequeux. J. (1997).** Evidences for an expanding shell in the blue compact dwarf galaxy Haro 2. *Astronomy and Astrophysics*, v.326, p.929-935.
84. **Lugasi. A. ; Hovari. J. ; Sagi. K.V. ; Biro. L. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegedediensis.* 47: 119-124p.
85. **Lowry. O.H. ; Rosebrough. N. J. ; Farr. A.L. ; Randall. R.J. (1951).** Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
86. **Lubec. G. (1996).** "The hydroxyl radical: from chemistry to human disease." *J. Investig. Med.* 44: 324-346.
87. **Luck. H. (1965).** Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis.* Ed. by H. Bergmeyer, pp. 895-897. Academic Press, London.

88. **Macheix. J.J. ; Fleuriet. A. ; Jaye-Allemand. C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'une importance économique. Presses Polytechniques et Universitaires. Romandes. Lausanne. 185p.
89. **Maged. A.S. (2003).** New ester and Furocoumarins from the roots of *Pituranthos totruosus*. *J. Braz. Chem. Soc.* 14: 48-56p.
90. **Mahieu. S. ; Millen. N. ; González. M. ; Carmen Contini. M.D. ; Elías. M.M. (2005).** Alterations of the renal function and oxidative stress in renal tissue from rats chronically treated with aluminium during the initial phase of hepatic regeneration. *J. Inorg. Biochem.* 99(9):1858-64.
91. **Makris. D.P. ; Kefalas. P. (2004).** Carob Pod as a source of polyphenolic Antioxidants. *Food Technol. Biotechnol.* Vol. 42, N° 2, pp. 105–108.
92. **Marfak. A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de dépsides. Thèse de doctorat de l'université de limoges.
93. **Martínez-Cayuela. M. (1995).** Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie.* 77: 147-161.
94. **Mueller-Harvey. I. (2001).** Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91, 3-20.
95. **Mulier. B. ; Rahman. I. ; Watchorn. T. ; et al. (1998).** "Hydrogen peroxide-induced epithelial injury: the protective role of intracellular nonprotein thiols (NPSH)." *Eur. Respir. J.* 11: 384-391.
96. **Murphy. M.P. ; Packer. M.A. ; Scarlett. J.L. ; et al. (1998).** "Peroxynitrite: a biologically significant oxidant." *Gen. Pharmacol.* 31: 179-186.
97. **Nabli. A. (1989).** Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisienne. Éléments de botanique et de phyto-écologie, MAB-FST-Laboratoire de botanique fondamentale et appliquée, pp. 247.
98. **Naskar. S. ; Islam. A. ; Mazumder. U.K. ; Saha. P. ; Haldar. P.K. ; Gupta. M. (2010).** In Vitro and In Vivo Antioxidant Potential of Hydromethanolic Extract of Phoenix dactylifera Fruits. *J. Sci. Res.* 2 (1), 144-157.
99. **Neuzil. J. ; Stocker. R. (1993).** Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters.* 331: 281-284.

100. **Newairy. A.S.A. ; Salama. A.F. ; Hussein. H.M. ; Yousef. I.M. (2009).** Propolis alleviates aluminium-induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats. *Food and Chemical Toxicology*; Vol. 47:1093–1098.
101. **Nzengue. Y. (2008).** Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53. Thèse de Doctorat. Université Joseph fourier – Grenoble.297p.
102. **Owen. R.W. ; Haubne. R. ; Hull. W.E. ; Erben. G. ; Spiegelhalder. B. ; Bartsch. H. ; Habe. B. (2003).** Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre, *Food and Chemical Toxicology* Vol. 41, N°12, pp. 1727-1738.
103. **Ozcan. M.M. ; Arslan. D. ; Gökçalik. H. (2007).** Some compositional properties and mineral contents of carob (*Ceratonia siliqua*) fruit, flour and syrup. *Nt. J. Food. Sci. Nutr.*, vol.58, N°8, pp.652-8.
104. **Ôzcan. M.M. ; Chalchat. (2008).** Chemical composition and antifungal activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil from Turkey. *Inter. J. of Food Sci. and Nutr.* Vol. 59, No. 7-8, P 691-698.
105. **Paglia. D.E. ; Valentine. W.N. (1967).** Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70:158-69.
106. **Popovici. C. ; Saykova. I. ; Tylkowski. B. (2010).** Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, e-*Revue de génie industriel*, N° 4, pp1313-8871.
107. **Priolo. A. ; Waghorn. G.C. ; Lanza. M. ; Biondi. L. ; Pennisi. P. (2000).** Polyethylene glycol as a means for reducing the impact of condensed tannins in carob pulp: Effects on lamb growth performance and meat quality. *J. Anim. Sci.* 78: 810-816.
108. **Que zel. P. ; Santa. S. (1963).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales (tome1), Editions du centre national de la recherche scientifique, pp.557.
109. **Raffaëlli. B.A. ; Hoikkala. A.B. ; Leppala. E. ; Wahala. K. (2002).** Enterolignan. J. Chromatography B. *Analyt Technol Biomed Life Sci.* 777: 29-43p.
110. **Rao. C.V. (2004).** "Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention." *Mutat. Res.* 555: 107-119.
111. **Rebour. H. (1968).** Fruits Méditerranéen, la maison rustique Paris, 330pp.
112. **Reddy. N.S. ; Gumireddy. K. ; Mallireddigari. M.R. (2005).** Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 13: 3141-3147p.

113. **Reese. J.C. ; Chan. B.G. ; Waiss. A.C. (1982).** Effects of cotton condensed tannin, Maysin (corn) and Pinitol (soybeans) on *Heliothis zea* growth and development. *Journal of Chemical Ecology*. 8: 1429-1436p.
114. **Rejeb. M.N. (1989).** Mécanismes physiologiques d'adaptation à la sécheresse du Caroubier. *Rev. Res. Amélior. Prod. Milieu Aride I*, pp.47-55.
115. **Rejeb. M.N. ; Laffray. D. ; Louguet. P. (1991).** Physiologie du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) en Tunisie. In : Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. Groupe d'Etude de l'Arbre, Paris, P. 417-426.
116. **Rejeb. M.N. (1995).** Le caroubier en Tunisie: Situations et perspectives d'amélioration. Dans: Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Edit. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris. pp: 79-85.
117. **Sanchez-Moreno. C. (2002).** Method used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8:121-137.
118. **Sbay. H. ; Abrouch. M. (2006).** Apport des espèces à usages multiples pour le développement durable : cas du pin pignon et du caroubier. Centre de Recherche Forestière Haut Commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification. Rabat p. 1-9.
119. **Sakakibara. H. ; Honda. Y. ; Nakagawa. S. ; Ashida. H. ; Kanazawa. K. (2003).** Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 571–581.
120. **Sbay. H. (2008).** Le caroubier au Maroc, Un arbre d'avenir. CRF Collection Maroc Nature.
121. **Saidi. R. ; Lamarti. A. ; Badoc. A. (2007).** Micropropagation du caroubier (*Ceratonia siliqua*) par culture de bourgeons axillaires issus de jeunes plantules. *Bull. Soc. Pharm.* Bordeaux, 2007, 146, 113-129.
122. **Scalbert. A. ; Williamson. G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* 130: 2073-2085p.
123. **Schweinfurth. G. (1894).** Collection de plantes arabe éthiopiens, résultats de voyager dans les années 1881, 1888-89, 1891-92. *Bull. Herb. Boissier* 2:1-114.
124. **Sebai. H. ; Souli. A. ; Chehimi. L. ; Rtibi. K. ; Amri. K. ; El-Benna. J. ; Sakly. M. (2013).** In vitro and in vivo antioxidant properties of Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 7(2), pp. 85-90.

125. **Servais. S. (2002).** Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l’ozone : effets de l’âge et d’une supplémentation en Oméga-3. Thèse de doctorat de l’université de Claude Bernard.
126. **Shukla. S. ; Bhadauria. M. ; Jadon. A. (2004).** Effect of propolis extract on acute carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Indian J. Exp. Biol.* 42: 993-997.
127. **Siby. S. (2008).** Etude de la variation des paramètres biochimiques et Hématologiques dans le district de bamako. Thèse pour l’obtention de grade de docteur en médecine.
128. **Singleton. V.L. ; Ortorfer. R. ; Lannela. R.M. (1999).** Analyse of total phenols and other oxidation substrate and antioxydants by mean of Folin Ciocalteu reagent. *Academic press*, 5:152-178.
129. **Steinberg. D. (1991).** Antioxidants and atherosclerosis. A current assesement. *circulation*. 85:1420-5.
130. **Sorg. O. (2004).** Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality. *Comptes Rendus Biologies*. 327: 649-662.
131. **Tabart. J. ; Keversa. C. ; Pincemail. J. ; Defraigne. J.O. ; Dommesa. J. (2009).** Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.*, 113: 1226-1233.
132. **Tous. J. ; Baltte. I. (1990).** El algarrobo. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
133. **Travlos. G.S. ; Morris. R.W. ; Elwell. M.R. ; Duke. A. ; Rosenblum. S. ; Thompson. M.B. (1996).** Frequency and relationships of clinical chemistry and liver and kidney histopathology findings in 13-week toxicity studies in rats. *Toxicology*. 107:17-29.
134. **Trinder. P. (1969).** Determiration of blood glucose using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem*. 6: 24-27 11.
135. **Tucker. S.C. (1992).** The developmental basis for sexual expression in *Ceratonia siliqua* (Leguminosae: Ceasalpinoideae: Cassieae). *Am. J. Bot.* Vol.79, N°3, pp. 367-327.
136. **Uličná. O. ; Greksák. M. ; Vančová. O. ; Zlatos. L. ; Galbavý. S. ; Bozek. P. ; Nakano. M. (2003).** Hepatoprotective Effect of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*) on CCl4-Induced Liver Damage in Rats. *Physiol. Res*. 52: 461-466.
137. **Vaher. M. ; Koel. M. (2003).** Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 990, 225-230.

138. **Valko. M. ; Rhodes. C.J. ; Moncol. J. ; Izakovic. M. ; Mazur. M. (2006).** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*. 160: 1-40.
139. **Valdigué. P. ; Solera. M.L. ; Lagente. M. ; De Graeve. J. (2000).** Biochimie clinique, 2<sup>ème</sup> Eds. Médicale internationales Allée de la Croix Bossée F-94234 Cachan cedex.
140. **Wardman. P. ; Candeias. L.P. (1996).** "Fenton Chemistry: An Introduction." *Radiat. Res.* 145: 523-531.
141. **Wessam. M.A.W. (2012).** AlCl<sub>3</sub>-Induced Toxicity and Oxidative Stress in Liver of Male Rats: Protection by Melatonin. *Life Sci. J.*; 9(4): 1173-1182.
142. **Whelton. A. ; et al. (1994).** Nitrogen Metabolites and renal function. En : CA Burtis and ER Ashwood, comps., Tietz Rexbook of Clinical Chemistry, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders company 1513-1575.
143. **Woisky. R.G. ; Salatino A. (1998).** Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J.of apicultural research*. Vol. 37(2), 99-105.
144. **Wrüblewski. F. ; La Due. J.S. (1965).** Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 91: 569-571.
145. **Young. D. ; Destaner. L. (1975).** Clin chem. 21-5.
146. **Yousef. M.I. (2004).** Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology*. 199(1):47-57.
147. **Yousif. A.K. ; Alghzawi. H.M. (2000).** Processing and characterization of carob powder. *Food chemistry*, Vol. 69, N°3, pp.283-287.
148. **Zelko. I.N. ; Marian. T.J. ; Folz. R.J. (2002).** Superoxide dismutase multigene family : a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free radical biology & medicine*. 33: 337-349.
149. **Zohary. M. (1973).** Geobotanical Foundations of the Middle East, 2 vols. Stuttgart.
150. **Zouhair. O. (1996).** Le caroubier: situation actuelle et perspectives d'avenir. Document interne, Eaux et forêts. Maroc. 22 pages.

