



N° d'Ordre : 14/2021

**Formation Doctorale : Sciences des Matériaux et Procédés
industriels**
Discipline : Chimie
Spécialité : Chimie Organique
**Laboratoire : Laboratoire d'ingénierie des matériaux
organométalliques, moléculaires et environnement (LIMOME)**

THESE DE DOCTORAT

Présentée par
Imane LAKKAB

**Valorisation du Caroubier du Maroc : Etude phytochimique, extraction
et valorisation des différentes parties de la caroube**

Soutenue le 13/ 03/ 2021 devant le jury composé de :

Pr. Anouar ALAMI	Faculté des Sciences, Fès	Président
Pr. Alin CIOBICA	Faculté de Biologie, Iasi, Roumanie	Rapporteur
Pr. Touria ZAIR	Faculté des Sciences, Meknès	Rapporteuse
Pr. Mohamed BOUKTAIB	Faculté des Sciences, Fès	Rapporteur
Pr. Salwa KARBOUNE	Faculté des Sciences d'agriculture et de l'environnement, Montréal	Examinatrice
Pr. Sanae BENNIS	Faculté de Médecine et de Pharmacie, Fès	Examinatrice
Pr. Abdellatif LOUKILI	Ecole Supérieure de Technologie, Fès	Examineur
Pr. Mohammed LACHKAR	Faculté des Sciences, Fès	Directeur de thèse

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués dans le Laboratoire d'Ingénierie des Matériaux Organométalliques, Moléculaires et Environnement (LIMOME), Faculté des Sciences, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès.

Une partie de cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Biologie Animale, Faculté de Biologie, Université d'Alexandru Ioan Cuza, Iasi, Roumanie.

Je voudrais initier mes remerciements par adresser ma gratitude et ma sincère reconnaissance à mon directeur de thèse, Monsieur Mohammed LACHKAR qui a encadré cette thèse et qui m'a offert l'opportunité de réaliser ce travail au sein du laboratoire LIMOME. Je vous remercie Monsieur, de votre soutien scientifique, humain et moral tout au long de ce travail. Aussi, je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée et de la liberté que vous m'avez laissée pour mener à bien ces travaux. Merci d'avoir cru en moi et en mon travail.

J'exprime mes profonds remerciements à Monsieur Alin CIOBICA pour son soutien, ses conseils et son temps qui m'a consacré durant et après le stage effectué dans le Laboratoire de Biologie Animale, Iasi, Roumanie.

J'exprime ma vive reconnaissance à Madame Salwa KARBOUNE de m'avoir accordé l'opportunité d'effectuer un stage au sein du Laboratoire des Sciences Alimentaires, Université de McGill, Canada. Qu'elle trouve ici mes profonds sentiments de gratitude et de reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent à Monsieur Anouar ALAMI (Faculté des Sciences de Fès) d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie également Monsieur Alin Ciobica (Faculté de Biologie de Iasi, Roumanie), Madame Touria ZAIR (Faculté des Sciences de Meknès) et Monsieur Mohamed BOUKTAIB (Faculté des Sciences de Fès) pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Un grand merci à Madame Salwa KARBOUNE (Faculté des Sciences d'agriculture et de l'environnement de Montréal, Canada), Madame Sanae BENNIS (Faculté de Médecine et de Pharmacie, Fès) et Monsieur Abdellatif LOUKILI (Ecole Supérieure de Technologie, Fès) pour avoir accepté d'être des membres de jury de cette thèse.

Ma reconnaissance affectueuse et inconditionnelle va à ma mère Prof. Khadija GOUMMA à qui je dois tout ce que je suis et qui sans sa générosité, son support aussi bien moral que financier et sa confiance qu'elle a mise à m'assurer sans faille pendant ces années de recherche, je n'aurais pas pu terminer cette thèse. Je la remercie aussi pour la patience avec laquelle elle a supporté et accompagné les moments les plus difficiles de cette thèse. Il n'y a pas de mots assez forts pour exprimer ma gratitude, la chance que j'ai de l'avoir dans ma vie et mon amour pour elle. Merci pour tout Maman.

Un grand merci va à mon père, mon frère, mes sœurs et à tous les membres de ma famille. Cette thèse doit beaucoup à vos encouragements et votre soutien.

Je remercie tout particulièrement mon oncle Adil pour tous ses précieux conseils, son encouragement ainsi que pour son soutien permanent.

Un grand merci aussi à ma meilleure amie, Dr. Fatiha SOUNNI avec qui j'ai surmonté tous les moments difficiles de cette thèse. Merci pour tes conseils, tes encouragements et ta présence dans ma vie.

Un merci spécial à mes collègues Najlaa HAMDI, Sara MOUJAB, Atipo Fernand ITOUA NGOPOH, Hanane El HAJAJI, Smail HERRADI et à tous les membres du laboratoire LIMOME : Abdelmoughit, Mohammed, Safae, Meriem et Imane pour leurs encouragements, suggestions et conseils.

Un grand merci à mes amis Dr. Mahdi HALIM, Yousra MASSAOUDI et Jamila Al-AKHAL pour leur agréable compagnie et leurs conseils.

J'exprime ma profonde gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin, directement ou indirectement à accomplir ce travail et qui ont contribué pour faire de cette aventure une expérience humaine enrichissante.

Dédicaces

A ma très chère maman

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Ta présence à mes côtés m'a toujours donné la force d'affronter les différents obstacles. Que Dieu tout-puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur et longue vie. Je t'aime fort Maman.

A mon très cher père

Pour tes encouragements, tes conseils et ton soutien. Ce modeste travail est témoin de ma profonde reconnaissance et amour.

A mes sœurs Fatima-Zahra, Ahlam et mon frère Abdelilah

Pour votre amour et soutien, vos conseils et encouragements. Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi.

A mes nièces Rania et Amira

A la mémoire de mon grand-père

A ma grand-mère, mes tantes, oncles, cousins et cousines.

A tous ceux qui m'aiment

Résumé

Les méthodes d'extraction sont parmi les problèmes majeurs du secteur des additifs alimentaires. L'additif alimentaire E410 ou la gomme de caroube est un additif alimentaire extrait des graines de caroube et largement utilisé dans différents domaines industriels. Ainsi, la valorisation des graines de caroube objectif de ce travail de thèse a porté essentiellement sur l'élaboration d'un nouveau procédé de décortilage des graines de caroube et sur leur prétraitement pour l'extraction de la gomme de caroube. La nouveauté du procédé élaboré repose sur une réaction d'hydrolyse enzymatique des graines entières et broyées par les enzymes cellulases. L'étude du prétraitement par hydrolyse enzymatique du substrat des graines de caroube a été réalisée en utilisant la méthodologie des plans d'expériences par un modèle de surface de réponse. Effectivement, la méthode de décortilage des graines de caroube entières a permis d'obtenir les trois parties de la graine de caroube avec une qualité et une quantité supérieure. Par ailleurs, les téguments des graines de caroube ont été soumis à un screening phytochimique visant à identifier les métabolites secondaires. Les différents extraits obtenus par macération du tégument ont révélé la richesse de ce dernier en différentes molécules bioactives dont les polyphénols, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les tanins. En outre, quatre techniques ont été utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante dont la méthode de DPPH, FRAP, PM et β -carotène. Ces différentes méthodes ont révélé que le tégument des graines de caroube exerce un fort pouvoir antioxydant lié essentiellement à sa haute teneur en différentes familles chimiques à effet médicinal et thérapeutique intéressants. Les tests de l'activité antibactérienne du tégument des graines de caroube ont aussi révélé une bonne activité antibactérienne sur les souches *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* par contre la souche *Escherichia coli* a montré une forte résistance.

En parallèle, une étude phytochimique plus approfondie a porté sur l'identification, la séparation et l'isolement des différentes molécules et fractions composant le tégument des graines de caroube. De ce fait, nous avons utilisé des techniques d'identification et de séparation chromatographique comme la chromatographie sur couche mince et sur colonne de gel de silice. La chromatographie liquide à haute performance a été aussi utilisée afin de déterminer la composition de certaines fractions.

Les extraits du tégument des graines de caroube ont aussi amélioré les fonctions cognitives des souris suggérant ainsi un effet anxiolytique et antidépresseur. Cet effet a été évalué par différents tests comportementaux à savoir les tests de labyrinthe en Y, de labyrinthe en croix surélevé ainsi que par le test de nage forcée et le test en champ ouvert. De plus, les extraits du tégument ont aussi amélioré les dysfonctionnements cognitifs liés à la démence de la schizophrénie confirmée par les différents tests comportementaux et les tests des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et la malondialdéhyde) des souris sujettes des symptômes de la schizophrénie induite par la méthionine.

Mots clés : *Ceratonia siliqua* L., graines, procédé d'extraction, hydrolyse enzymatique, gomme de caroube, screening phytochimique, maladies neuropsychiatriques.

Abstract

The extraction methods are among the major encountered problems of food additives sector. The E-410 or Locust bean gum is a food additive extracted from carob seeds and extensively used in several industrial fields. Thus, the valorization of carob seeds was initially centered around the elaboration of a new process of dehulling the carob seeds and extracting the carob gum or the food additive E-410. The novel process is based on an enzymatic hydrolysis reaction of the Whole and milled seeds by the cellulase enzymes. The study of pretreatment by enzymatic hydrolysis method of carob seeds substrate was carried out using the methodology of experimental designs by a response surface model. As a result, the dehulling method were efficient to obtain the three parts of the carob seed with a higher quality and quantity. Separately, the phytochemical profile of carob seeds peels was elaborated and revealed the richness of this compound in different bioactive molecules including polyphenols, flavonoids, alkaloids and tannins. Moreover, multiple techniques were used for the evaluation of the antioxidant activity including the method of DPPH, Frap, PM and β -carotene. These different methods have revealed that the peels of carob seeds exert a strong antioxidant activity related essentially to the high content in different chemical families with interesting medicinal and therapeutic effects. The analysis of the antibacterial activity of the carob seeds peels also revealed a good antibacterial activity on *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains, while the *Escherichia coli* strain was very resistant. Furthermore, a phytochemical study involving the identification, separation and isolation of different molecules and fractions from carob seeds peels was also investigated. Thus, chromatographic techniques such as thin layer and column chromatography were used. Consequently, the determination and identification of these isolated compounds were analyzed using High performance liquid chromatography.

Extracts of the peels of carob seeds improved the short- term memory, anxiety, and depression disorders. This effect was evaluated by various behavioral tests, including the Y-maze, elevated plus-maze tests as well as the forced swimming test, and open field test. In addition, the peel extracts also improved the symptoms related to the dementia of schizophrenia confirmed by behavioral tests, and the tests of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and malondialdehyde) of the mice-methionine models of Schizophrenia.

Keywords: *Ceratonia siliqua* L., carob seed, extraction procedure, enzymatic hydrolysis, carob gum, phytochemical profile, neuropsychiatric disorders.

Liste des abréviations

AA : Acide ascorbique	GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
ABTS: 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	GPx : Glutathion peroxydase
Ac : Acide	H ₂ SO ₄ : Acide sulfurique
Acet : Acétone	HCl : Acide chlorhydrique
ADN : Acide désoxyribonucléique	HE : Hydrolyse enzymatique
AG : Acide gallique	HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
BHT : Hydroxytoluène butylé	kDa : Kilodalton
CAT : Catalase	LBG: Locust bean gum
DMSO : Diméthylsulfoxyde	M/G : Mannose/Galactose
DPPH : 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl	MDA : Malondialdéhyde
DS _G : Degré de substitution en galactose	MeOH : Méthanol
EAG : Equivalent acide gallique	MS : Spectrométrie de masse
ECAT : Equivalent catéchol	NaOH : Hydroxyde de sodium
ERO : Espèces réactives de l'oxygène	PM : Phosphomolybdène
EtOAc : Acétate d'éthyle	PT : Polyphénols totaux
EtOH : Ethanol	Qe : Quercétine
FeCl ₃ : Chlorure de fer (III)	RMN : Résonance magnétique nucléaire
Frap: Ferric reducing antioxidant potential	SOD: Superoxyde dismutase
FST: Forced swimming test	TAC: Total antioxidant capacity
FT : Flavonoides totaux	TC : Tanins condensés
FTIR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	TGC : Tégument de graines de caroube
GC : Gomme de caroube	UFC : Unité formant colonie

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
------------------------------------	----------

CHAPITRE I: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. PRESENTATION DU CAROUBIER	4
1. ETYMOLOGIE	4
2. TAXONOMIE	4
3. DESCRIPTION BOTANIQUE.....	4
4. DISTRIBUTION GEOGRAPHIQUE.....	7
5. PRODUCTION MONDIALE.....	8
6. PRODUCTION AU MAROC.....	8
II. INTERET ET UTILISATION DU CAROUBIER	9
1. LES GOUSSES	9
2. LES GRAINES	12
III. METABOLITES SECONDAIRES DES PLANTES : GENERALITES	20
INTRODUCTION	20
1) LES POLYPHENOLS	21
2) LES ALCALOÏDES.....	32
IV. LE STRESS OXYDATIF	36
1) DEFINITION ET CAUSES	36
2) LES ANTIOXYDANTS	37
3) LE STRESS OXYDATIF ET LES MALADIES NEUROPSYCHIATRIQUES	40
4) METHODES D'ANALYSE DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE	41
CONCLUSION.....	44

CHAPITRE II : ELABORATION D'UN NOUVEAU PROCEDE D'EXTRACTION ET DE DECORTICAGE DES GRAINES DE

CAROUBE

I. INTRODUCTION.....	45
II. LES ETAPES D'EXTRACTION DE LA GOMME DE CAROUBE	47
1. LA DECUTILATION	47
1.1. Méthode mécanique.....	47
1.2. Méthode chimique	47
1.3. Méthode thermique.....	48
1.4. Méthode par cuisson thermique	48
2. ETAPE DE DEGERMINATION.....	49

3. ETAPE DE PURIFICATION	49
III. HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GRAINES DE CAROUBE	49
1. PRINCIPE DE LA METHODE D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE.....	49
2. ENZYMES UTILISEES	50
3. FACTEURS INFLUENÇANT L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE	51
4. ACTIVITE ENZYMATIQUE	53
IV. OPTIMISATION DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GRAINES ENTIERES	54
1. MATERIEL ET METHODES.....	54
2. RESULTATS DE L'OPTIMISATION DES GRAINES ENTIERES.....	57
CONCLUSION DE L'HE DES GRAINES ENTIERES.....	64
V. OPTIMISATION DE L'HE DES GRAINES BROYEES PAR PLAN D'EXPERIENCES	65
1. APERÇU SUR LES PLANS D'EXPERIENCES	65
2. LES ETAPES DE L'OPTIMISATION DU PROCEDE D'HE PAR PLAN D'EXPERIENCES	66
3. LES ETAPES DU PROCEDE D'HE	77
CONCLUSION DE L'OPTIMISATION PAR PLAN D'EXPERIENCES.....	79
<i>CHAPITRE III : PROFILS PHYTOCHIMIQUES ET ACTIVITES ANTIOXYDANTES DU TEGUMENT ET DU GERME DES GRAINES DE CAROUBE</i>	
I. INTRODUCTION.....	81
II. MATERIELS ET METHODES	82
1. PREPARATION DES EXTRAITS.....	82
2. SCREENING PHYTOCHIMIQUE	82
3. DOSAGES QUANTITATIFS	84
4. ACTIVITE ANTIOXYDANTE.....	85
5. ACTIVITE ANTIBACTERIENNE.....	86
III. PROFIL ANTIOXYDANT, ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET ANTIBACTERIENNE DU TGC	87
1) SCREENING PHYTOCHIMIQUE.....	87
2) DOSAGES QUANTITATIFS.....	88
3) ACTIVITE ANTIOXYDANTE	91
4) ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	94
IV. PROFIL PHYTOCHIMIQUE, ACTIVITE ANTIOXYDANTE DU GERME	95
1. SCREENING PHYTOCHIMIQUE DU GERME.....	95
1. DOSAGES QUANTITATIFS.....	96
2. ACTIVITE ANTIOXYDANTE	98
IV. ISOLEMENT DES MOLECULES BIOACTIVES DU TGC.....	102

1.	PREPARATION DES EXTRAITS.....	102
2.	EXTRACTION DES ALCALOÏDES TOTAUX.....	103
3.	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	105
4.	CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	106
5.	ETUDE DE L'EXTRAIT HEXANIQUE DU TGC.....	106
6.	ETUDE DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE DU TGC.....	107
CONCLUSION		108
CHAPITRE IV: EFFET DU TEGUMENT DES GRAINES DE CAROUBE SUR LES MALADIES NEUROPSYCHIATRIQUES		
I.	INTRODUCTION.....	110
II.	MATERIELS ET METHODES	112
1.	PREPARATION DES EXTRAITS.....	112
2.	PREPARATION DES ANIMAUX	112
3.	LES MODELES ANIMAUX DES TROUBLES D'HUMEUR.....	112
4.	LES MODELES ANIMAUX DES SYMPTOMES DE LA SCHIZOPHRENIE.....	113
5.	TESTS COMPORTEMENTAUX	114
6.	COLLECTE DES TISSUS.....	118
7.	ANALYSE DES ENZYMES ANTIOXYDANTES.....	118
8.	ANALYSE STATISTIQUE.....	119
III.	RESULTATS ET DISCUSSION	119
1.	EFFET DES TGC SUR LES TROUBLES D'HUMEUR	119
2.	EFFET DES TGC SUR LES MODELES ANIMAUX DES SYMPTOMES DE LA SCHIZOPHRENIE	125
CONCLUSION		134
CONCLUSION GENERALE.....		136
PERSPECTIVES		138
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		140
ANNEXES.....		170

Liste des figures

FIGURE 1: L'ARBRE DU CAROUBIER (CERATONIA SILIQUA L.)	5
FIGURE 2 : REPRESENTATION PHOTOGRAPHIQUE DES DIFFERENTES PARTIES DE CERATONIA SILIQUA L. (A) LES FEUILLES, (B) LES FLEURS FEMELLES, (C) LE FRUIT DU CAROUBIER AVANT MATURETE ET (D) LE FRUIT DU CAROUBIER APRES MATURETE.....	6
FIGURE 3 : REPARTITION GEOGRAPHIQUE DU CAROUBIER DANS LE MONDE [7].....	7
FIGURE 4 : MEILLEURS PRODUCTEURS MONDIAUX DE CAROUBE ENTRE L'ANNEE 2006 ET 2014 SELON (FOASTAT, 2017)	8
FIGURE 5 : EVOLUTION DE LA PRODUCTION DE LA CAROUBE AU MAROC ENTRE 2006 ET 2017 (FAOSTAT, 2019)	9
FIGURE 6 : A : FRUIT DU CAROUBIER : LA CAROUBE OU BIEN LA GOUSSE CONTENANT LES GRAINES, B : LA PULPE DE CAROUBE, C : LES GRAINES DE CAROUBE	10
FIGURE 7: LES FLAVONOÏDES ISOLES DES GRAINES DE CAROUBE	12
FIGURE 8 : COUPE TRANSVERSALE DE LA GRAINE DE CAROUBE [56].....	13
FIGURE 9 : A : FRACTION DU TEGUMENT APRES EXTRACTION AVEC L'EAU BOUILLANTE, B : FRACTION DU TEGUMENT APRES SECHAGE ET BROYAGE	14
FIGURE 10 : A : FRACTION D'ENDOSPERME APRES EXTRACTION AVEC L'EAU BOUILLANTE, B : FRACTION D'ENDOSPERME APRES SECHAGE ET BROYAGE (GOMME DE CAROUBE BRUTE).....	16
FIGURE 11 : STRUCTURE PROPOSEE DES GALACTOMANNANES DE LA GOMME DE CAROUBE D'APRES (SITTIKIYOTHIN ET AL., 2005) [76]	18
FIGURE 12 : A : FRACTION DU GERME APRES EXTRACTION AVEC L'EAU BOUILLANTE ; B : FRACTION DU GERME BROYEE APRES L'ETAPE DE SECHAGE ET DU BROYAGE	19
FIGURE 13: STRUCTURE CHIMIQUE DES POLYPHENOLS.....	21
FIGURE 14: STRUCTURES CHIMIQUES DES ACIDES PHENOLIQUES.....	23
FIGURE 15 : STRUCTURE BASIQUE DES FLAVONOÏDES	24
FIGURE 16 : LES STRUCTURES DES TANINS HYDROLYSABLES : (A) ACIDE GALLIQUE, (B) ACIDE HEXAHYDROXYDIPHENIQUE, (C) ACIDE ELLAGIQUE, (D) GALLOTANINS, (E) ELLAGITANINS	28
FIGURE 17 : LES STRUCTURES DES TANINS CONDENSES : (1) CATECHINE, (2) EPICATECHINE, (3) PROCYANIDINE.	29
FIGURE 18 : LES STRUCTURES DE BASE DES PHLOROTANINS ISOLES DES ALGUES.....	30
FIGURE 19 : LA STRUCTURE DU STILBENE LE PLUS CONNU DES PLANTES « LE TRANS-RESVERATROL	30
FIGURE 20 : DIMERISATION DES PHENYLPROPANOÏDES : SYNTHÈSE DES LIGNANES- STRUCTURE DE DIVERS LIGNANES [120]	31
FIGURE 21: STRUCTURES DES PHYTOSTEROLS DETECTES DANS LA FARINE DE GRAINES DE CAROUBE.....	32
FIGURE 22: DES EXEMPLES DE QUELQUES STRUCTURES DES ALCALOÏDES VRAIS (A) COCAÏNE, (B) MORPHINE ET (C) QUININE.....	33
FIGURE 23 : STRUCTURE D'UN PROTO-ALCALOÏDE : L'HORDENINE.	34
FIGURE 24 : EXEMPLES DES STRUCTURES DE PSEUDO-ALCALOÏDES (1) : CONINE ET (2) : ACONITINE.....	35
FIGURE 25 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA THEOPHYLLINE	36
FIGURE 26 : LES REACTIONS D'INHIBITION DES ROS PAR LES ENZYMES ANTIOXYDANTS (SOD : SUPEROXYDE DISMUTASE, CAT : CATALASE, GPX : GLUTATHION PEROXYDASE	40
FIGURE 27 : REACTION DE REDUCTION DU RADICAL DPPH PAR UN ANTIOXYDANT (R-H)	42

FIGURE 28 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA B-CAROTENE [93]	44
FIGURE 29 : SCHEMA DU PROCESSUS D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DE LA GOMME DE CAROUBE [77] - PROCESS OF EXTRACTION AND SOLUBILISATION OF THE LOCUST BEAN GUM.	46
FIGURE 30 : EFFET DU PH SUR LE TAUX DE SUCRES REDUCTEURS PRODUIT A 50°C EN FONCTION DU TEMPS	57
FIGURE 31 : EFFET DE LA CONCENTRATION D'ENZYME SUR LE TAUX DE SUCRES REDUCTEURS PRODUITS DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GRAINES DE CAROUBES ENTIERES	58
FIGURE 32 : EFFET DE LA CONCENTRATION D'ENZYME SUR L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GRAINES DE CAROUBES DANS UN BAIN ULTRASON AVEC P = 20%, pH = 4,8 ET T° = 50°C.	59
FIGURE 33 : STRUCTURE DU TEGUMENT DES GRAINES DE CAROUBE AVANT ((A), (B), (C)) ET APRES HYDROLYSE ENZYMATIQUE ((D), (E) ET (F))	61
FIGURE 34 : SPECTRES INFRAROUGES DE LA GOMME DE CAROUBE OBTENUE PAR DIFFERENTES METHODES. (A) PAR LA METHODE D'HE, (B) SPECTRE IR DE LA GOMME COMMERCIALE (LBG) [209].....	62
FIGURE 35 : VARIATION DE LA SOLUBILITE DE LA GOMME DE CAROUBE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE (A) 25°C ET (B) A 80°C ENTRE LA GOMME OBTENUE PAR LA METHODE CHIMIQUE (Ac) ET PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE (HE)	64
FIGURE 36 : DIAGRAMME D'ISHIKAWA OU DE CAUSES – EFFETS.	67
FIGURE 37 : SURFACE DE REPONSES (RS = SUCRES REDUCTEURS) AVEC T = 2H, X1= CHARGE SUBSTRAT ET X2 = CONCENTRATION D'ENZYME (ANALYSE GRAPHIQUE 3D)	74
FIGURE 38 : COURBES D'ISOREPONSES (2D) DU TAUX DES SUCRES REDUCTEURS PRODUITS PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GRAINES DE CAROUBE BROYEES DURANT 2 H DE TRAITEMENT A 50°C.....	75
FIGURE 39 : SPECTRE INFRAROUGE DE LA GOMME DE CAROUBE OBTENUE PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE (GHE) ET PAR LA METHODE ACIDE (GAC).....	77
FIGURE 40 : HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GRAINES DE CAROUBE BROYEES PAR LA CELLULASE	78
FIGURE 41 : COMPARAISON VISUELLE ENTRE LA GOMME DU PROTOCOLE ACIDE (A) ET LA GOMME D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE (B)..	79
FIGURE 42 : ACTIVITE DU PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH PAR LES EXTRAITS DES TGC VS. BHT.....	91
FIGURE 43 : POUVOIR REDUCTEUR DES EXTRAITS DES TGC (EtOAc : ACETATE D'ETHYLE, MeOH : METHANOL ET ACETONE) VS. ACIDE ASCORBIQUE ET ACIDE GALLIQUE.....	92
FIGURE 44 : CAPACITE ANTIOXYDANTE TOTALE DES EXTRAITS DES TGC (ACETATE D'ETHYLE (EtOAc), ACETONE ET METHANOL (MeOH)) VS. ACIDE GALLIQUE.....	93
FIGURE 45 : POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA DECOLORATION DU B-CAROTENE/PEROXYDATION DE L'ACIDE LINOLEIQUE PAR LES EXTRAITS DES TGC (EtOAc : ACETATE D'ETHYLE, ACETONE ET METHANOL : MeOH) VS. BHT	94
FIGURE 46 : ACTIVITE DU PIEGEAGE DU RADICAL LIBRE DPPH PAR LES EXTRAITS DES GERMES DE GRAINES DE CAROUBE VS. BHT	99
FIGURE 47 : POUVOIR REDUCTEUR DES EXTRAITS DES GERMES DE CAROUBE (EtOAc : ACETATE D'ETHYLE, MeOH : METHANOL ET ACETONE) VS. ACIDE GALLIQUE.	100
FIGURE 48 : CAPACITE ANTIOXYDANTE TOTALE DES EXTRAITS DES GERMES DE CAROUBE (ACETATE D'ETHYLE (EtOAc), ACETONE ET METHANOL (MeOH)) VS. BHT. LES RESULTATS SONT PRESENTES EN MG/ML EQUIVALENT D'ACIDE ASCORBIQUE.	101
FIGURE 49 : POURCENTAGE D'INHIBITION DE LA DECOLORATION DU B-CAROTENE/PEROXYDATION DE L'ACIDE LINOLEIQUE PAR LES EXTRAITS DES GERMES DE CAROUBE (EtOAc : ACETATE D'ETHYLE, ACETONE ET METHANOL : MeOH) VS. BHT.	102

FIGURE 50 : SCHEMA DES DIFFERENTES ETAPES DE PREPARATION DES EXTRAITS PAR APPAREIL SOXHLET ET D'EXTRACTION DES ALCALOÏDES TOTAUX EN MILIEU ALCALIN.....	104
FIGURE 51 : IMAGE DE L'APPAREIL DE CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC).....	105
FIGURE 52 : CHROMATOGRAMME HPLC DES ALCALOÏDES TOTAUX DES TEGUMENTS DE GRAINES DE CAROUBE (REVELATION A 254 NM).....	107
FIGURE 53 : IMAGE DU LABYRINTHE EN FORME DE (Y).....	114
FIGURE 54 : IMAGE DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE (ELEVATED PLUS MAZE).....	115
FIGURE 55 : IMAGE DU TEST DE NAGE FORCEE (FORCED SWIMMING TEST).....	116
FIGURE 56 : IMAGE DE LA CHAMBRE UTILISEE DANS LE TEST EN CHAMP OUVERT (OPEN FIELD TEST).....	117
FIGURE 57 : IMAGE DE LA CHAMBRE UTILISEE POUR LE TEST DE RECONNAISSANCE DES NOUVEAUX OBJETS (NOVEL OBJECT RECOGNITION)	118
FIGURE 58 : EFFET DE L'ADMINISTRATION DES EXTRAITS DES TGC (50 AND 100 MG/KG) SUR LE POURCENTAGE DES ALTERNATIONS SPONTANEEES DANS LE TEST DE LABYRINTHE EN Y CONTRE LE GROUPE CONTROLE.....	120
FIGURE 59 : EFFET DES EXTRAITS DES TGC (EtOAc ET ACETONE 50 AND 100 MG/KG) SUR LE NOMBRE D'ENTREES DANS LES BRAS FERMES (A) ET SUR LE TEMPS PASSE DANS LES BRAS OUVERTS (B) DES SOURIS CONTRE LE GROUPE CONTROLE. LES RESULTATS SONT PRESENTES SOUS FORME DES MOYENNES	122
FIGURE 60 : EFFET ANTIDEPRESSEUR DES EXTRAITS DES TGC DES DIFFERENTES DOSES (50 ET 100 MG/KG) SUR LE TEMPS D'IMMOBILITE ET DE MOBILITE DES SOURIS. (N = 6 SOURIS/ GROUPE) CONTRE LE GROUPE CONTROLE.	124
FIGURE 61 : EFFET DES EXTRAITS DES TGC AVEC DIFFERENTES DOSES (50 ET 100 MG/KG) SUR L'ACTIVITE LOCOMOTRICE ET L'ANXIETE. (A) REPRESENTE LE NOMBRE D'ETIREMENT ET (B) LE NOMBRE DE LIGNES PASSEES PAR LES SOURIS (N = 6 SOURIS/ GROUPE) CONTRE LE GROUPE CONTROLE	125
FIGURE 62 : EFFET DE L'ADMINISTRATION DES EXTRAITS DES TGC (50 AND 100 MG/KG) SUR LE POURCENTAGE DES ALTERNATIONS SPONTANEEES DANS LE TEST DE LABYRINTHE EN Y CONTRE LE GROUPE CONTROLE ET LE GROUPE METHIONINE.....	127
FIGURE 63 : EFFET ANXIOLYTIQUE DES EXTRAITS DES TGC (EtOAc ET ACET) AVEC DIFFERENTES DOSES (50 ET 100 MG/KG) SUR LE TEMPS PASSE DANS LES BRAS OUVERTS (BO) VS. GROUPES CONTROLE ET METHIONINE.....	128
FIGURE 64 : EFFET ANTIDEPRESSEUR DES EXTRAITS DES TGC DES DIFFERENTES DOSES (50 ET 100 MG/KG) SUR LE TEMPS D'IMMOBILITE ET DE MOBILITE DES SOURIS. (N = 6 SOURIS/GROUPE) CONTRE LE GROUPE CONTROLE.....	129
FIGURE 65 : EFFET DES EXTRAITS DES TGC SUR LE % DE PREFERENCE ENTRE LE NOUVEL OBJET ET L'OBJET FAMILIER PAR RAPPORT AU GROUPE CONTROLE ET GROUPE METHIONINE.....	130
FIGURE 66 : EFFET DES EXTRAITS D'EtOAc ET D'ACETONE DES TGC SUR L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA SOD VS LES GROUPES CONTROLE ET DE METHIONINE.....	131
FIGURE 67 : EFFET DES EXTRAITS DES TGC SUR L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE GPx PAR RAPPORT AUX GROUPES CONTROLE ET METHIONINE. LES DONNEES SONT PRESENTES (MOYENNE $\pm$ ECART-TYPE). (N = 4; 6 PAR GROUPE). **p $\leq$ 0,01 vs. CONTROLE, ##p $\leq$ 0,01 ET ###p $\leq$ 0,001 vs. METHIONINE.	132
FIGURE 68 : EFFET DES EXTRAITS DES TGC (ACETATE D'ETHYLE (50 ET 100 MG / KG) ET ACETONE (50 ET 100 MG / KG) SUR LES TAUX DE MALONDIALDEHYDE (MDA) PAR RAPPORT AUX GROUPES CONTROLE ET METHIONINE.	133

Liste des tableaux

TABLEAU 1: TAXONOMIE DU CAROUBIER <i>CERATONIA SILIQUA</i> L	4
TABLEAU 2: COMPOSITION CHIMIQUE EN (%) DE LA GOMME DE CAROUBE BRUTE (GC BRUTE) ET LA GOMME DE CAROUBE PURIFIEE (GC PURIFIEE) [67]	17
TABLEAU 3 : LES SOURCES DES SOUS-CLASSES DES FLAVONOÏDES, STRUCTURES ET LEURS TYPES.....	25
TABLEAU 4 : RENDEMENT DU TEGUMENT, ENDOSPERME ET DU GERME (%) DES GRAINES DE CAROUBE EXTRAITE PAR METHODES ACIDE (AC), A L'EAU BOUILLANTE (AQ) ET PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE (HE).....	60
TABLEAU 5 : RECAPITULATIF DES NIVEAUX DE FACTEURS ET LEURS UNITES POUR L'ETUDE DU PLAN A SURFACE DE REPONSE	68
TABLEAU 6 : MATRICE D'EXPERIENCES DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GRAINES DE CAROUBES BROYEES.....	70
TABLEAU 7: ENSEMBLE DES EXPERIENCES REALISEES AVEC LES TAUX DE SUCRES REDUCTEURS PRODUITS EN (G/L).	71
TABLEAU 8 : TABLEAU D'ANALYSE DES COEFFICIENTS.....	72
TABLEAU 9: QUALITE DESCRIPTIVE DU MODELE	72
TABLEAU 10 : TABLEAU D'ANALYSE DE LA VARIANCE	73
TABLEAU 11 : TABLEAU DE RESULTAT DE RECHERCHE D'OPTIMUM OBTENU POUR UNE REPONSE CIBLE MAXIMUM DE 1,00 G/L EN SR	76
TABLEAU 12 : SCREENING PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS DE MACERATION DES TEGUMENTS DES GRAINES DE CAROUBE DONT (+) PRESENCE ET (-) ABSENCE DU GROUPE CHIMIQUE.	88
TABLEAU 13 : TENEURS EN POLYPHENOLS TOTAUX DES EXTRAITS DES TEGUMENTS DES GRAINES DE CAROUBE EN MG EQUIVALENT D'ACIDE GALLIQUE/G D'EXTRAIT SEC.	89
TABLEAU 14 : TENEURS EN FLAVONOÏDES TOTAUX DES EXTRAITS DES TEGUMENTS DES GRAINES DE CAROUBE EN MG EQUIVALENT DE QUERCETINE /G D'EXTRAIT SEC.	90
TABLEAU 15 : TENEURS EN TANINS CONDENSES DES EXTRAITS DES TEGUMENTS DES GRAINES DE CAROUBE EN MG EQUIVALENT DU CATECHOL/G D'EXTRAIT SEC.	90
TABLEAU 16 : CMI ET CMB DES EXTRAITS DES TEGUMENTS DES GRAINES DE CAROUBE	95
TABLEAU 17 : SCREENING PHYTOCHIMIQUE DES EXTRAITS DE MACERATION DES GERMES DES GRAINES DE CAROUBE DONT (+) PRESENCE ET (-) ABSENCE DU GROUPE CHIMIQUE.	96
TABLEAU 18 : TENEURS EN POLYPHENOLS TOTAUX DES EXTRAITS DES GERMES DES GRAINES DE CAROUBE EN MG EQUIVALENT D'ACIDE GALLIQUE/G D'EXTRAIT SEC.....	97
TABLEAU 19 : TENEURS EN FLAVONOÏDES TOTAUX DES EXTRAITS DES GERMES DES GRAINES DE CAROUBE EN MG EQUIVALENT DE QUERCETINE/G D'EXTRAIT SEC.	97
TABLEAU 20 : TENEURS EN TANINS CONDENSES DES EXTRAITS DES GERMES DES GRAINES DE CAROUBE EN MG EQUIVALENT DU CATECHOL/G D'ES.	98
TABLEAU 21 : GRADIENT D'ELUTION EN HPLC.....	106



Introduction générale



Introduction générale

En industrie agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, textile, papier, etc., tous les produits de la filière de caroubier trouvent leurs utilités. Selon plusieurs études, le caroubier a été utilisé depuis l'antiquité non seulement en raison de sa qualité nutritive mais aussi pour ses vertus médicinales. Ainsi, en ethnopharmacologie, les décoctions et les infusions des différentes parties de la caroube (gousses, feuilles, écorces) ont été utilisées pour remédier aux différents troubles du système digestif et aussi comme antidiabétique et antidiarrhéique [1]–[3]. Par ailleurs, depuis les années 80, ces différentes activités ont été testées *in vitro* et *in vivo* et ont confirmé la capacité des différentes parties du caroubier anti-inflammatoire, antioxydante, antidiabétique, antidiarrhéique, antibactérienne, antifongique ainsi qu'anticancer [4]–[8].

Bien que les feuilles, les écorces et les racines du caroubier soient très étudiés pour leurs richesses en métabolites secondaires et leurs propriétés pharmaceutiques et médicinales, le fruit (gousses et graines) trouve une importance plus particulière. En effet, la farine de la caroube (la poudre de la caroube sans graine) et la gomme de la caroube (une poudre blanche à jaunâtre extraite des graines de caroube) sont les plus commercialisées du caroubier et font sujet de transactions économiques très importantes. Prenant comme exemple impressionnant la gomme de caroube qui constitue un additif alimentaire, codé sous E410, agent texturant, gélifiant et stabilisant faisant partie des ingrédients d'une large gamme de produits de tous les domaines. Le marché mondial de cet additif (E410), est évalué à 103 millions de dollars américains en 2020, et devrait atteindre 121,9 millions de dollars américains d'ici la fin de l'année 2026.

Dans l'ensemble, le présent travail est centré particulièrement autour de la valorisation des graines de caroube. Cette partie de la caroube est composée du tégument, de l'endosperme, qui est la source de la gomme de caroube, et du germe. Toutefois, considérant l'impact environnemental, économique et énergétique des méthodes d'extraction des différentes parties de la graine, un intérêt particulier a été porté aux procédés d'extractions. Jusqu'à présent, les méthodes utilisées pour le décorticage des graines de caroube et l'extraction de la gomme sont soit la méthode chimique utilisant l'acide sulfurique ou bien la méthode thermique reposant sur le trempage des graines dans l'eau bouillante. Ces méthodes bien qu'elles soient simples à appliquer et donnent un rendement élevé, leurs utilisations présentent différents problèmes environnementaux et consomment de l'énergie et du temps. De ce fait, et vu les exigences actuelles en termes d'importance du respect de l'environnement, le présent travail vise la mise au point d'un nouveau procédé de décorticage des graines de caroube en utilisant des produits biologiques sains et écologiques, afin de récupérer toutes les parties de la graine et surtout la gomme de caroube avec une qualité et un rendement élevé. Ce procédé innovant dépend essentiellement des différentes conditions de traitement des graines de caroube ainsi que du

Introduction générale

substrat utilisé (les graines broyées ou en entier) car suivant la nature des graines le procédé a été optimisé. En effet, le traitement par hydrolyse enzymatique a permis d'atteindre l'objectif visé et tous les constituants de la graine ont été récupérés avec une qualité élevée et un rendement supérieur en comparaison avec les gommages obtenues par les procédés classiques. La réalisation du prétraitement des graines de caroube est passée par des optimisations réalisées par la méthodologie des plans d'expériences par surface de réponse avec un plan composite contré. De plus l'endosperme, le tégument et le germe ont été aussi récupérés suivant la même méthode d'hydrolyse enzymatique. Par conséquent, l'élaboration du profil phytochimique et l'analyse de l'activité antioxydante de ces deux parties ont été effectués. Les travaux réalisés sur le tégument en particulier sont peu nombreux. De ce fait, une investigation phytochimique de ce composant a été faite pour une meilleure valorisation. Effectivement, le tégument s'est révélé très riche en polyphénols et exerce une activité antioxydante assez puissante. De ce fait, il a été suggéré comme alternative pour réduire les dommages oxydatifs liés aux maladies neuropsychiatriques. Dans ce travail, nous l'avons spécifiquement testé sur les symptômes négatifs liés à l'anxiété, la dépression et la schizophrénie.

Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres :

Dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique sera présentée discernant la filière du caroubier. L'importance et le rôle de chaque composant du caroubier seront présentés. La première partie de ce chapitre sera consacrée à la description des différentes familles recherchées des métabolites secondaires de la caroube ainsi que leurs propriétés chimiques et médicinales.

Dans le deuxième chapitre, nous ferons une présentation du procédé inventé pour l'extraction de la gomme de caroube par hydrolyse enzymatique des graines de caroube en entier et de décortilage des graines de caroube broyées. De plus, les étapes suivies pour l'application de ce procédé avec un aperçu de la méthodologie des plans d'expériences et des méthodes classiques déjà reportées d'extraction de la gomme de caroube ont été bien élucidés dans cette partie. Les deux procédés de décortilage des graines de caroube et d'extraction de la gomme de caroube ont fait l'objet d'un brevet national (MA 41080 A1) et d'un brevet international (WO 2019/059751 A1).

Le profil phytochimique et les méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante du tégument et du germe seront reportés dans le troisième chapitre. L'analyse de l'activité antibactérienne des

Introduction générale

extraits du tégument sera aussi reportée dans ce chapitre. En outre, différents extraits du tégument des graines de caroube ont été soumis à des séparations par colonne de gel de silice afin d'isoler et d'identifier les composés bioactifs caractérisant cette partie de caroube. Ainsi différentes techniques, étapes d'extraction et de séparation seront présentées.

Le dernier chapitre reportera la valorisation médicinale du tégument comme étant un antioxydant naturel efficace pour prévenir ou remédier aux différents symptômes liés aux maladies neuropsychiatriques et en particulier aux troubles d'humeur et à la schizophrénie.



Chapitre I

Synthèse bibliographique



I. Présentation du Caroubier

1. Etymologie

Le nom scientifique du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) dérive du grec *keras* signifiant corne et du latin *siliqua*, se référant à la dureté et la forme des gousses [7]. Le nom commun provient de l'Arabe *al-kharroube* duquel dérivent *algarrobo* ou *garrofero* en espagnol, *carrubo* en italien, *caroubier* en français, *karubenbaum* en allemand, *alfarrobeira* en portugais, *charaoupi* en grec, *charnup* en turc et *garrofer* ou *garrover* en catalan. Différents noms sont utilisés dans différentes régions d'Italie : *ascenedda*, *carrua*, *carrubbi*, *carrubbio*, *carrubo*, *Garrubaro* et *Garrubbo*. En Asie, les noms suivants sont utilisés : *chiao-tou-shu* (Chine), *gelenggang* (Malaisie) et *chum het tai* (Thaïlande). La caroube est également connue sous le nom de pain Saint-Jean ou de caroube en référence à l'utilisation présumée de ses « sauterelles » par Saint Jean-Baptiste aussi carouge ou figuier de l'Egypte [9]

2. Taxonomie

Tableau 1: Taxonomie du Caroubier *Ceratonia siliqua* L

Règne : Plantae
Embranchement : spermatophytes (angiospermes)
Classe : dicotylédones
Ordre : Fabales
Famille : Fabaceae
Genre : <i>Ceratonia</i>
Espèce : <i>Ceratonia siliqua</i>

La famille *Leguminosae* est une des plus grandes familles des plantes à feuilles incluant plus que 18000 espèces et 650 genres [10]. En effet, le genre *Ceratonia* appartient à la famille *Leguminosae* = *Fabaceae* de l'ordre des *Fabales* (*Rosales*) dont le caroubier est généralement placé dans la tribu *Cassieae* et possède un nombre total de chromosomes de $2n = 48$ [11].

3. Description botanique

Le caroubier pousse comme un arbuste à feuilles persistantes ou sclérophylle d'une hauteur de 12 m, avec une large couronne semi-sphérique et un tronc épais avec écorce rugueuse brun et des branches solides (Figure 1). Les feuilles ont une longueur de 10 à 20 cm, alternes, pennées, avec ou sans feuillet terminal. Les folioles mesurent 3 à 7 cm de long, sont ovales à elliptiques,

Chapitre I : Synthèse bibliographique

en 4 à 10 paires opposées, coriaces, vert foncé et luisant au-dessus, vert pâle en dessous et finement veinées avec des marges légèrement ondulées et de minuscules stipules [7,12].



Figure 1: L'arbre du caroubier (*Ceratonia siliqua* L.)

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 ([Figure 2](#)) [7]. Les fleurs femelles sont constituées d'un pistil court et recourbé avec un petit ovaire (5 à 7 mm) bi carpelle. 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, à filets allongé [13].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Le fruit du caroubier « caroube ou gousse » est de grande taille 10 à 30 cm de longueur et 2 à 3,5 cm de largeur, nécessitant de 9 à 10 mois pour atteindre la maturité. Il est vert puis brun avant maturité et au moment de la maturité, brun foncé à noir. Il est une gousse indéhiscente et sinueux sur les bords, aplati, droit ou arqué [14].



Figure 2 : Représentation photographique des différentes parties de *Ceratonia siliqua* L. (A) les feuilles, (B) les fleurs femelles, (C) le fruit du caroubier avant maturité et (D) le fruit du caroubier après maturité

La gousse est séparée à l'intérieur par des cloisons pulpeuses et renferme 12 à 16 graines brunes dont la longueur et la largeur sont respectivement de 8 à 10 mm et de 7 à 8 mm avec une épaisseur de 3 à 5 mm [7,15].

4. Distribution géographique

Originaire du Moyen-Orient, le caroubier est aujourd'hui répandu dans tout le bassin méditerranéen. On le rencontre à l'état sauvage au Maroc, en Turquie, Chypre, Syrie, Liban, Palestine, Sud de Jordanie, Egypte, Tunisie et en Libye ([Figure 3](#)). Cependant, la répartition des espèces sclérophylles à feuilles persistantes comme *Ceratonia siliqua* dans les pays méditerranéens est contrôlée par le stress du froid hivernal [16]. Dans les années cinquante, le caroubier a été introduit dans de nombreux autres pays à climats chauds et semi-arides, principalement aux Etats-Unis (Floride et Californie), l'Australie et l'Argentine, l'Arizona, le Chili, le Mexique et l'Afrique du Sud [7]. On le rencontre actuellement dans les zones allant selon la surface cultivée ; Portugal, Italie, Maroc, Grèce, Turquie, et Algérie [17].



Figure 3 : Répartition géographique du Caroubier dans le monde [7]

Au Maroc, il est localisé en association avec l'olivier, le lentisque, le thuya ou l'arganier, dans les plaines et les moyennes montagnes du Rif, du Moyen Atlas, du Haut Atlas et de l'Anti-Atlas [18]. Il se trouve confiné dans des bioclimats arides et semi-arides avec une extension de certains peuplements au bioclimat subhumide. A l'exception des zones arides, le caroubier peut être rencontré jusqu'à des altitudes de 1600 mètres [14].

5. Production mondiale

Suivant l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), la superficie mondiale destinée à la récolte de la caroube de l'année 2006 est estimée à environ 102 000 ha dont l'Espagne (44%) occupe la première position suivie du Maroc (13%) puis l'Italie en troisième position en superficie (10%). En termes de production, le Maroc occupe la troisième position après l'Espagne et l'Italie et la production mondiale est estimée à environ 200 000 tonnes soit 1,22 tonnes/ha. En 2014, le Portugal est le premier producteur mondial occupant ainsi la première position suivie de l'Espagne, l'Italie puis le Maroc en 4^{ème} position avec une production mondiale estimée atteindre les 226 000 tonnes produite dans une superficie de 80000 ha. Les plus récentes statistiques présentées par la FAO datent de 2017, la production mondiale de caroube (pulpe) est estimée à 136 540 tonnes dont le Portugal (30,69%) est le premier producteur mondial suivi de l'Italie (21,17%) puis du Maroc (16,10%) ([Figure 4](#)).

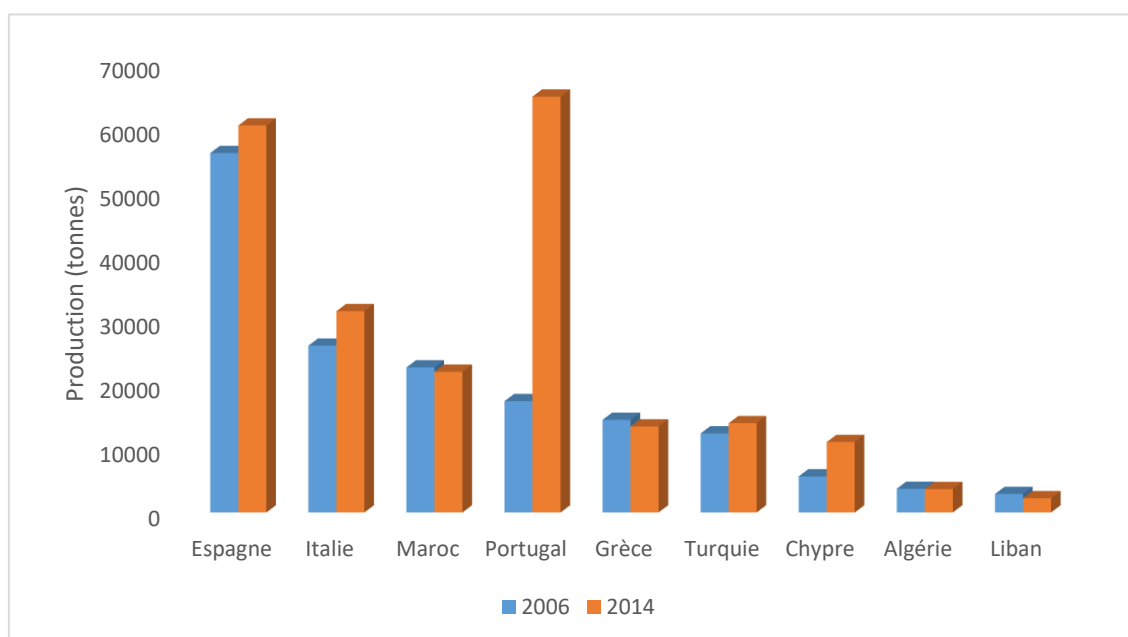


Figure 4 : Meilleurs producteurs mondiaux de caroube entre l'année 2006 et 2014 selon (FOASTAT, 2017)

6. Production au Maroc

La production marocaine a connu une augmentation durant les 30 dernières années et elle est estimée à 22 700 tonnes en 2006 occupant ainsi la troisième position après l'Espagne et l'Italie. D'autres études ont confirmé que les meilleurs rendements en graines sont principalement originaires du Maroc et confirment l'occupation de la première position par le Maroc en production des graines de caroube [19]. D'après les dernières statistiques, la production a diminué arrivant à 21 938 tonnes en 2017 ([Figure 5](#)). Bien que la filière soit supposée connaître

une forte croissance de 10 à 20%, les pays concurrents ont tendance à connaître un ralentissement de 8 à 10%. D'où la nécessité d'une mobilisation pour augmenter les surfaces cultivées du caroubier, et surtout avec l'importance économique qui augmente de plus en plus envers la richesse de cette filière en sous-produits aux intérêts nutritifs et médicinaux très intéressants.

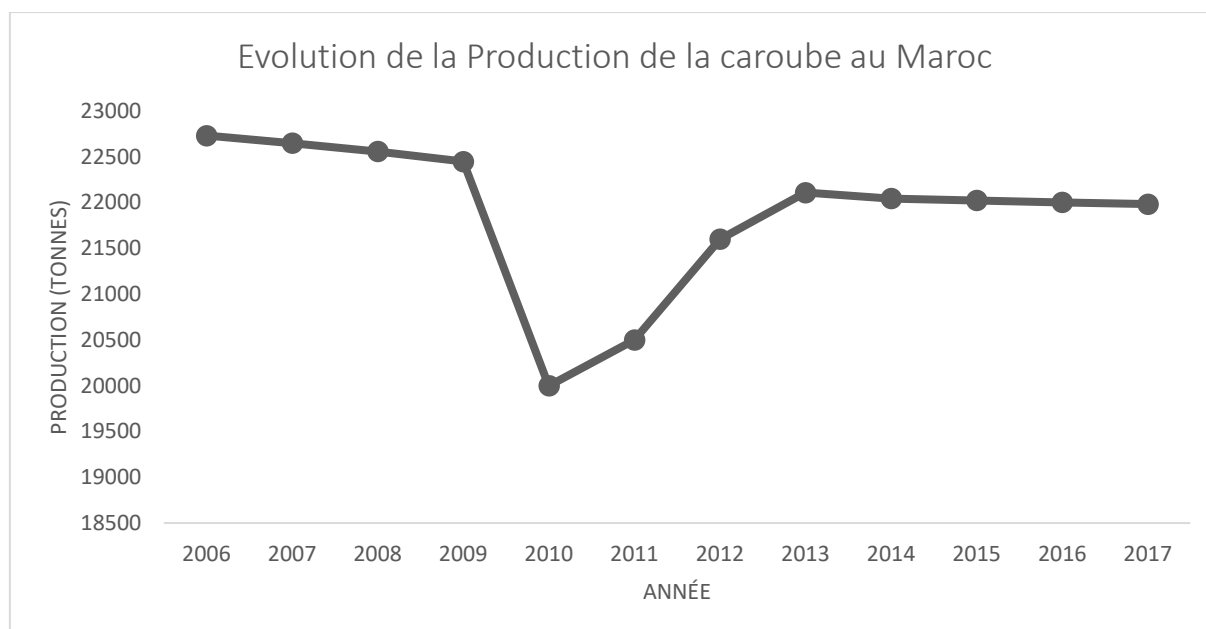


Figure 5 : Evolution de la production de la caroube au Maroc entre 2006 et 2017 (FAOSTAT, 2019)

II. Intérêt et utilisation du caroubier

1. Les gousses

Le fruit du caroubier nommé la caroube ou la gousse est parmi les aliments utilisés par les humains depuis l'antiquité pour son effet médicinal. Antidiarrhéique, antidiabétique, laxative, hépatoprotective, etc., pour tous ces effets, la caroube a déjà prouvé sa capacité à y remédier. Les gousses sont composées principalement de la pulpe (90%), et les graines représentent les 10% restantes du poids ([Figure 6](#)). Toutefois, les gousses sont très riches en carbohydrates, protéines et peu de lipides. Actuellement, les gousses (dépourvues des graines) en raison de leur richesse en sucres, font partie de nombreuses préparations alimentaires et sont commercialisées sous forme de farine de caroube utilisée comme chocolat ou substitut de cacao. L'avantage de cette farine c'est d'être un ingrédient qui ne contient ni caféine ni théobromine [20].



Figure 6 : A : Fruit du caroubier : la caroube ou bien la gousse contenant les graines, B : la pulpe de caroube, C : les graines de caroube

1.1. Composition de la pulpe

La composition chimique de la pulpe de caroube dépend des variétés, de l'origine et du moment de la récolte [21]. Dans l'ensemble, les composés majoritaires de la pulpe sont les sucres (48-56%), les fibres (27-50%), les polyphénols dont la majorité sont des tanins (16-20%), puis des minéraux (K, Na, Fe, Mg, Cu et Zn) avec des faibles teneurs en protéines et lipides [20], [22]–[25]. Cependant, une étude récente de (H. El Batal et *al.*, 2016) [26] a montré la dépendance géographique de la composition de la pulpe de caroube du Maroc. Par conséquent, la pulpe provenant de la région d'Essaouira contient la teneur la plus élevée en sucres totaux par rapport à la région de Taza, Marrakech et Taroudant. Par contre, la région Al-Hoceima contient la plus haute teneur en lipides et la région d'Agadir et Beni Mellal contiennent plus de polyphénols que les autres régions. Certes, toutes les régions contiennent une teneur en protéines similaires ainsi qu'elles sont très riches en minéraux et plus précisément en Ca, P, K, Mg, Na et Mn avec des traces de Fe, Cu et Zn. La composition minérale de la pulpe de caroube a été déjà réalisée par notre laboratoire en 2013 [27]. Cette étude a évalué non seulement la composition minérale de la pulpe mais aussi des feuilles, des écorces et des téguments des graines de caroube. Les résultats ont montré la richesse de la pulpe marocaine en Ca, K et Mg. Une étude antérieure aussi a montré que les extraits de la pulpe sont très riches, qualitativement et quantitativement

Chapitre I : Synthèse bibliographique

en composés phénoliques dont le profil phénolique de ce composant est dominé par l'acide coumarique et l'acide gallique [24].

1.2. Propriétés de la pulpe

La pulpe de caroube contient une teneur élevée en sucres solubles ainsi qu'en polyphénols totaux surtout les tanins condensés. Par conséquent, plusieurs études ont reporté les propriétés antioxydantes et révélé la puissante activité antioxydante de la pulpe de caroube. En effet, en utilisant les méthodes de DPPH et ABTS, les extraits de la pulpe ont montré une puissante capacité à inhiber les radicaux libres atteignant les 90% [28]. Ajoutant aussi, une activité réductrice élevée prouvée par la méthode de réduction de Fer [29]. La richesse de la pulpe en molécules bioactives tels que les polyphénols et les flavonoïdes engendre une forte capacité antioxydante avec des effets biologiques et médicaux intéressants. De ce fait, les extraits de la pulpe de caroube exercent un effet préventif contre les dommages oxydatifs résultants la destruction du foie et des reins en plus d'avoir un effet gastro-protectif contre l'éthanol induisant une ulcération gastrique [30–32]. Par ailleurs, la pulpe permet de réduire la dyslipidémie et la résistance à l'insuline pour le diabète type 2 en augmentant l'excrétion de graisse fécale et en permettant d'augmenter l'efficacité de la signalisation de l'insuline [33]. Quant aux maladies neuropsychiatriques, en utilisant les tests de nage forcée et de suspension caudale, les extraits de pulpe ont exercé un effet antidépresseur [34]. En outre, plusieurs études ont montré que les extraits de la pulpe exercent en plus de l'effet antioxydant, un effet anti-inflammatoire, antimicrobien, antidiarrhéique, anti-constipation, et antiprolifératif contre le carcinome hépatocellulaire [35–41].

1.3. Utilisation de la pulpe

La pulpe est principalement utilisée comme aliment pour animaux [42]. Certes, chez l'homme, la pulpe de caroube a été proposée principalement comme substitut du cacao [43,44]. Actuellement, vu la richesse de la farine de la pulpe en nutriments et composés à hautes valeurs ajoutées, on la trouve additionnée comme supplément dans plusieurs produits alimentaires à base de céréales (pain, biscuits, snacks ou collations, pâtes, etc.) [45], dans les produits diététiques [46], et aussi utilisée dans la production d'éthanol atteignant ainsi un rendement de 45% [47]. Et comme elle contient des teneurs élevées en sucre (saccharose, fructose et glucose), la pulpe trouve son utilisation comme matière première pour la production des sirops [26,48,49].

2. Les graines

Les graines de caroube sont considérées comme étant la partie la plus précieuse dans le fruit du caroubier. Dans l'antiquité et vu leurs conformités, les graines de caroube ont été utilisées comme unité de mesure des pierres précieuses appelée ainsi « Carat » de l'Arabe (قيراط) pesant environ 200 mg = 1 Carat [7,50]. Toutefois, que ça soit en industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, textile, papier, les graines de caroube sont largement exploitées pour leur endosperme. Ce dernier constitue la matière de base de la production de la gomme de caroube (GC) ou autrement appelée « Locust bean gum » connu ainsi comme additif alimentaire sous le code « E410 ». En effet, grâce aux différentes propriétés de ladite GC, celle-ci se trouve dans divers produits alimentaires et industriels comme additif à effet gélifiant, épaississant, texturant et stabilisant [51]. Des études antérieures ont été réalisées sur les graines entières afin d'identifier leur composition chimique ainsi que leurs propriétés biologiques et nutritionnelles. Dans l'ensemble, les graines de caroube sont constituées essentiellement de 75% carbohydrates, des fibres (7%), protéines 6%, cendres (3%), lipides (2%) et humidité (6%) en plus des minéraux (S, K, Ca, Fe, Zn, Mn, Cu, O, Na et Se) [52,53]. D'autre part, six glycosides de flavonols acylés des graines de caroube ont été isolés pour la première fois par (Gohar et *al.*, 2009) [54], identifiés et testés pour leurs activités antioxydantes intéressantes. Les six composés caractérisés sont : 4'-p-hydroxybenzoylisorhamnetin-3-O- α -L-rhamnopyranoside nommé (ceratoside) (5), kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranoside (afzelin) (3), quercétine-3-O- α -L-arabinofuranoside (auriculain) (4), quercétine-3-O- α -L-rhamnopyranoside (6), β -sitostérol (1) et β -sitosterol-3-O- β -D-glucoside (2) (Figure 7).

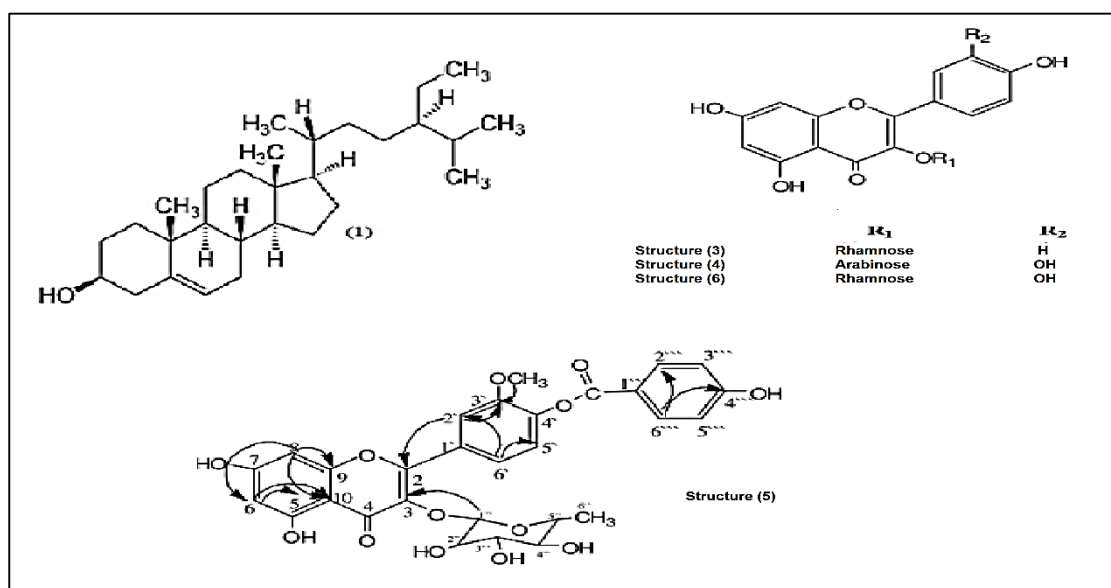


Figure 7: Les flavonoïdes isolés des graines de caroube

En plus le profil phénolique des graines a été déterminé indiquant la présence majoritaire de l'acide coumarique suivie de l'acide gallique [36]. La plus récente étude sur les graines de caroube a rapporté leur richesse en molécules bioactives : les polyphénols, flavonoïdes et tannins condensés en plus d'une forte activité antioxydante et réductrice [55].

La [Figure 8](#) décrit la composition de la graine de caroube avec ses différentes parties. En effet, la graine est composée de trois parties : le tégument ou l'enveloppe, l'endosperme et le germe. Le tégument couvrant l'endosperme constitue 30-33%, l'endosperme occupe environ 42-46% et le germe 20-23% du poids total de la graine [56]. Toutefois, ces rendements dépendent essentiellement des variétés et de l'origine du caroubier et de la méthode utilisée pour l'extraction.

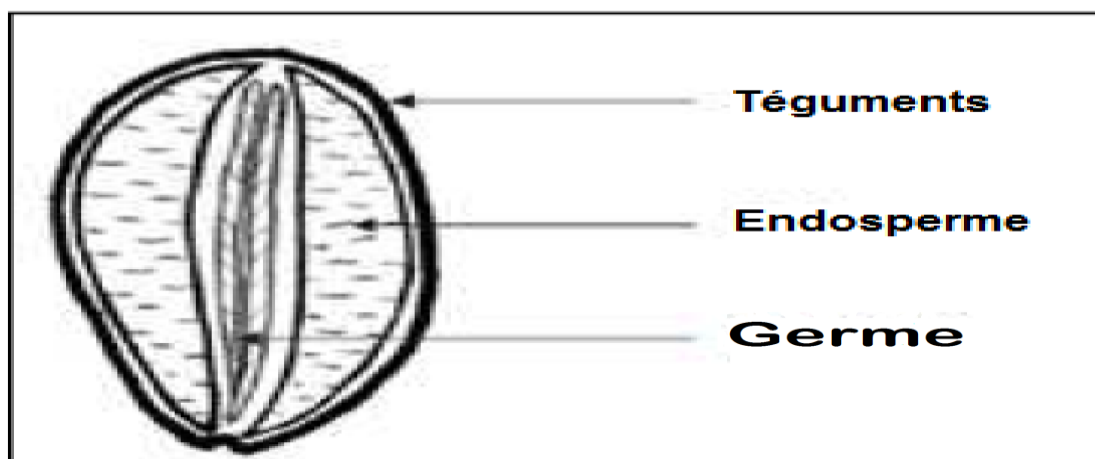


Figure 8 : Coupe transversale de la graine de caroube [56]

2.1. Le tégument

Le tégument de la graine de caroube (TGC) ou l'épisperme est une enveloppe en brun foncé, coriace et dure, considérée comme une source naturelle de polyphénols [29] ([Figure 9](#)). Très peu d'études ont été réalisées sur le TGC du fait de l'utilisation répandue de la méthode chimique pour l'extraction de la GC qui carbonise le tégument et qui est par la suite éliminé avec un lavage excessif. Cependant, les études existantes sur le TGC emploient la méthode thermique en utilisant l'eau bouillante. Cette partie de la graine renferme une teneur intéressante en minéraux dont le Ca, Mg, Fe, Cu et Zn [27,57]. Une étude réalisée par (Albertos et *al.*, 2015) [58] a montré que les téguments des graines de caroube sont très riches en fibres et en polyphénols contribuant à un potentiel antioxydant important permettant son utilisation en tant qu'un naturel additif contre l'oxydation des poissons hachés. Certes, l'étude la plus détaillée a été réalisée par (Patrick Aubin Dakia et *al.*, 2017) [59] montrant ainsi la composition chimique

des TGC dont la majorité sont des carbohydrates (93,29%) suivie de faibles teneurs en protéines (3,71%), cendres (2,34%), lipides (0,54%) et de l'humidité (0,12%).

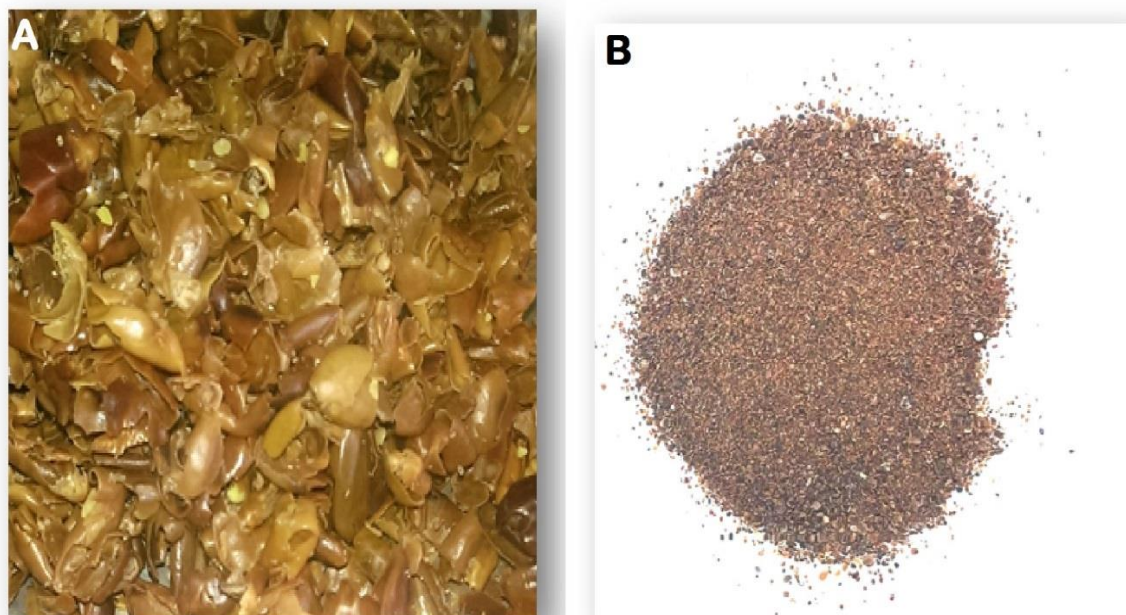


Figure 9 : A : Fraction du tégument après extraction avec l'eau bouillante, B : Fraction du tégument après séchage et broyage

Le TGC est connu par sa dureté, qui rend la possibilité de le détacher du reste de la graine extrêmement difficile. Cette dureté est surtout attribuée à sa composition basée essentiellement sur la cellulose et la lignine.

a) La cellulose

Un constituant végétal qui rentre dans la construction de la paroi cellulaire de la majorité des graines à laquelle elle donne la rigidité, et cela en s'associant à d'autres molécules d'hémicellulose, et de lignine. C'est un polymère linéaire de résidus de glucose (plus de 10 000 résidus de glucose) reliés par des liaisons glycosidiques ($\beta_{1\rightarrow4}$). Par conséquent, l'association de deux monomères de glucose forment une unité cellobiose. Dans la chaîne linéaire de la cellulose, le degré de polymérisation dépend de nombre d'unité de glucose ($C_6H_{12}O_6$)_n [60]. Ainsi, l'hydrolyse de la chaîne de la cellulose dépend de la température, le temps et la concentration d'acide utilisé. Plusieurs travaux ont été réalisés sur la méthode de valorisation des ressources cellulosiques dans la production de l'éthanol ou du bioéthanol avec des optimisations bien détaillées des facteurs de conversion comme le pH, la température et le temps du traitement [61–63].

b) La lignine

La lignine est l'un des principaux constituants de la matière végétale, se définit comme étant un polymère aromatique complexe et hydrophobe. La lignine est un polysaccharide inerte, en raison de la forte liaison intramoléculaire carbone-carbone contenant environ 40 unités phénylpropane oxygénées, ainsi que des alcools coniférylique, sinapylique et de p-coumarylique ayant subi un processus de polymérisation par déshydrogénation [64]. Dans la nature, la majorité de la lignine est mélangée avec les hémicelluloses et la cellulose formant une matrice qui offre à la plante de la protection et la résistance, et évite à la cellulose et les hémicelluloses une exposition à l'hydrolyse enzymatique microbienne [65]. Cependant, l'hydrolyse de la lignine nécessite une température supérieure à 200°C et des conditions acides. C'est juste avec ces conditions que la structure chimique de la lignine est modifiée et agglomérée en des petites particules séparées de la cellulose [66].

2.2. L'endosperme

L'endosperme constitue la matière de base de l'extraction de la gomme de caroube ([Figure 10](#)) présentant ainsi de 40 à environ 60% de la masse totale de la graine de caroube. L'endosperme est composé d'un polysaccharide neutre composé d'unités de mannose et de galactose et appartient donc à la catégorie des galactomannanes [67]. Ce polysaccharide est présent d'environ 80%, le reste correspondant à des protéines et des impuretés. L'extraction de l'endosperme présente une étape essentielle pour la préservation de la qualité et l'intégrité structurale de la GC brute. Après utilisation de l'une des méthodes d'extraction, chaque partie de la graine est récupérée, séchée puis broyée. L'endosperme broyé constitue la gomme de caroube brute (Figure 9.B). Il est à noter que 100 Kg de graines de caroube produisent en moyenne 20 Kg de la gomme de caroube pure [7].

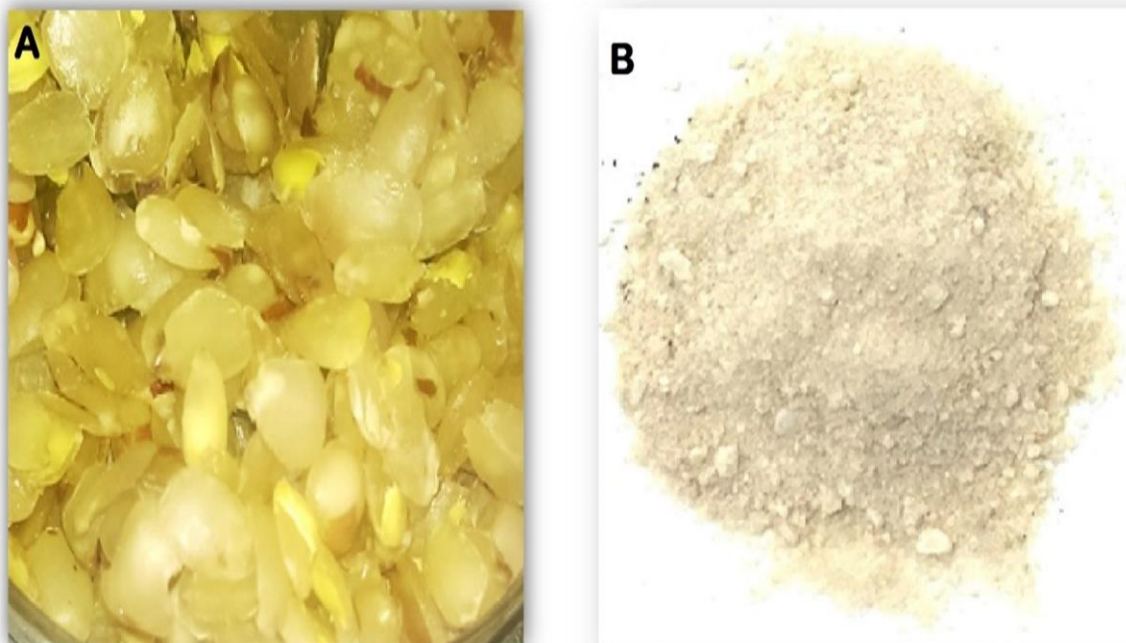


Figure 10 : A : Fraction d'endosperme après extraction avec l'eau bouillante, B : Fraction d'endosperme après séchage et broyage (gomme de caroube brute)

- Composition chimique de la gomme de caroube :

La gomme de caroube est composée essentiellement de galactomannanes, environ 80% en poids de l'endosperme et le reste correspondant aux protéines et aux impuretés. La teneur en protéines de la gomme de caroube comprend l'albumine et la globuline (32%), les 68% restants correspondant à la glutéline [68]. Après, le procédé d'extraction appliqué sur les graines, la gomme de caroube brute subit plusieurs étapes afin d'éliminer les impuretés restantes. Ces dernières sont généralement insolubles même lors du chauffage à une température allant jusqu'à 70°C [69]. La purification avec l'éthanol ou l'isopropanol est efficace pour leurs éliminations. La GC commerciale ou bien la LBG renferme de 80-85% de galactomannane et approximativement 10 à 12% d'humidité, 5% de protéines, 1,0% de cendres, 1,0% de fibres brutes et 0,5% de matières grasses. Le [Tableau 2](#) résume la composition chimique de la gomme de caroube brute et purifiée. Le process de purification par l'éthanol ou l'isopropanol montre que même après traitement, des impuretés restent renfermées dans la GC purifiée mais avec des pourcentages réduits et même avec des traces. Cependant, ces impuretés déterminent la qualité de la gomme obtenue en terme de propriétés fonctionnelles telles que la viscosité et la solubilité [70].

Tableau 2: Composition chimique en (%) de la gomme de caroube brute (GC brute) et la gomme de caroube purifiée (GC purifiée) [67]

	GC brute	GC purifiée
Cendres	0,71 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Protéines	4,66 ± 0,33	0,78 ± 0,01
Lipides	0,92 ± 0,08	Traces
Cellulose et lignine	1,55 ± 0,08	0,19 ± 0,04
Galactomannanes	92,2	98,8

Les galactomannanes sont présents dans l'endosperme de nombreuses plantes, en particulier les légumineuses, et elles ont plusieurs fonctions dont la réserve des carbohydrates [71]. Les galactomannanes comptent parmi les hydrocolloïdes solubles dans l'eau et forment des solutions avec une très haute viscosité et très grande stabilité [72]. En particulier, les galactomannanes de caroube sont composés d'une chaîne principale de D-mannopyranoses liés en β -(1→4) sur laquelle est greffée une unique unité de D-galactopyranoses avec une liaison de type α -(1→6) ([Figure 11](#)). Le poids moléculaire des galactomannanes de caroube est d'environ 310000 Dalton, toutefois des études récentes ont confirmé la variation de ce poids de 0,2 à 3 millions suivant l'origine des graines, les conditions de culture de la plante et le procédé d'extraction [73]. Parmi les galactomannanes les plus fréquentés sont les galactomannanes de *Ceratonia siliqua* (gomme de caroube), *Cyamopsis tetragonoloba* (gomme de guar) et *Caesalpinia spinosa* (gomme de tara). On peut différencier entre les galactomannanes de ces graines par le degré de substitution en galactose DS_G , ou autrement dit en fonction de la distribution des unités de mannose sur les unités de galactose (rapport M/G). En effet, plus le DS_G est grand plus la gomme est soluble dans l'eau et la viscosité augmente. Le ratio M/G pour la gomme de guar est de 3:1 [74], gomme de tara est 2:1 [75] alors que pour la gomme de caroube est de 4:1 [56]. Ces rapports sont toujours désignés comme approximatifs, en raison de leur dépendance aux origines diverses des gommes, du poids moléculaire et de la méthode de solubilisation utilisée [73].

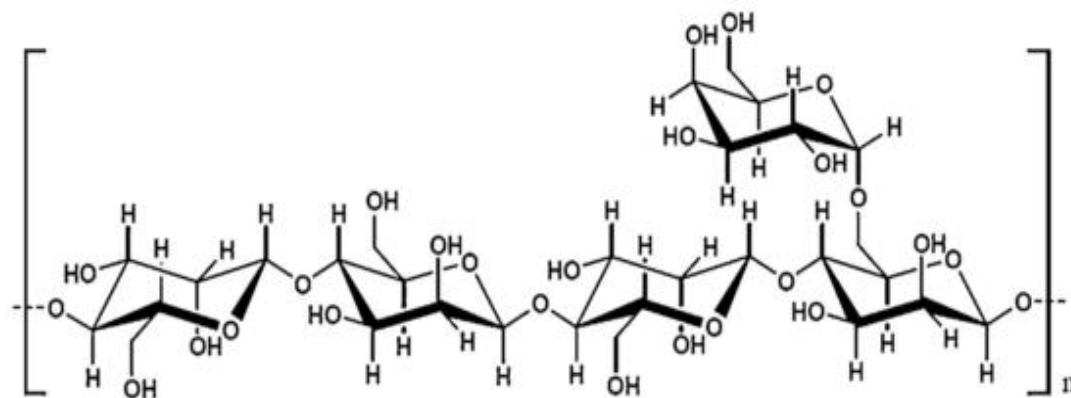


Figure 11 : Structure proposée des galactomannanes de la gomme de caroube d'après (Sittikijyothin et al., 2005) [76]

Les galactomannanes de la GC se présentent sous forme d'une poudre blanche à jaunâtre sans odeur spécifique [76]. Sa solubilité n'est complète qu'à une température de 80-85°C durant 10 min. La GC est utilisée suivant ses propriétés dans divers produits, ainsi comme agent stabilisant et épaississant elle rentre dans la composition des biscuits, des confitures, des boissons alcoolisées et non-alcoolisées ; comme agent aromatisant, humectant, stabilisant et épaississant dans les gâteaux, les produits laitiers, les pâtes, les crèmes glacées, les jus, les sauces, en cosmétiques comme le cosmétique capillaire ; ainsi que dans les applications pharmaceutiques ou pour la fabrication des produits diététiques. Toutefois, ce grand intérêt observé dans le secteur des additifs alimentaires pour la GC est référé non seulement aux différentes propriétés texturantes mais aussi au rapport de biodégradabilité, la faible toxicité et à ses effets médicinaux. En effet, la GC appartient à la catégorie des fibres solubles visqueuses. En raison de son effet sur la viscosité et la structure des aliments, il peut modifier le taux de dégradation des glucides pendant la digestion [73]. Cela est susceptible d'avoir des effets bénéfiques sur la régulation de la glycémie postprandiale et des niveaux d'insuline, qui sont des événements clés dans la prévention et le traitement de l'obésité et du diabète [77]. Des études récentes sur les gommages en tant que fibres alimentaires ont rapporté leur effet protecteur sur les maladies cardiovasculaires [64]. L'incorporation de gommages telles que la gomme de guar et la gomme de caroube en tant que fibres alimentaires dans le régime alimentaire peut être bénéfique pour réduire l'inflammation et les maladies inflammatoires de l'intestin, la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse [37], [64].

2.3. Le germe

Le germe de caroube ([Figure 12](#)), représente environ 25% de la graine, est l'un des sous-produits du caroubier exploité comme produit diététique dans les aliments pour animaux [78].

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Il contient une teneur élevée en protéines estimée à 54,7% et renferme presque tous les acides aminés essentiels environ (33,32%) avec une dominance de l'acide glutamique de (31,44%), suivi de l'arginine (12,2%) et l'acide aspartique de (7,86%), en plus des glucides (environ 23,9%) et des lipides (6,6%) [51]. Toutefois, la présence de l'acide glutamique dans le germe joue un rôle important dans les régimes supplémentés en quantités croissantes d'acide glutamique dont il supporte les fonctions de la barrière intestinale ainsi que les fonctions du système immunitaire [44].

L'arginine est également classée comme acide aminé semi-essentiel. Il joue un rôle important dans la division cellulaire, la cicatrisation des plaies, l'élimination de l'ammoniac corporel, la fonction immunitaire et la libération d'hormones [79].



Figure 12 : A : Fraction du germe après extraction avec l'eau bouillante ; B : Fraction du germe broyée après l'étape de séchage et du broyage

Par ailleurs, grâce à sa teneur relativement faible en matières grasses, le germe de la graine de caroube a une faible valeur calorique, ce qui en fait un aliment sain et intéressant. D'après (Patrick Aubin Dakia et *al.*, 2007a) [78], l'huile du germe de caroube contient environ 19,6% des acides gras saturés (palmitique et stéarique), 34,4% en acides gras mono-insaturés (essentiellement l'acide oléique, 18 :1n-9) et 44,5% en acides polyinsaturés (essentiellement linoléique, 18 : 2n-6, omega-6). Le pourcentage en oméga 3 (acide α -linoléique : possède un effet bénéfique sur le système cardiovasculaire) est très faible environ 0,7% ce qui ne permet pas de classer l'huile du germe de caroube comme huile à haute qualité nutritionnelle.

La présence de la théophylline dans la farine du germe a été aussi reportée par (Custódio et *al.*, 2011) [80]. Cet alcaloïde est un relaxant très utilisé dans le traitement des maladies respiratoires vu son activité antiinflammatoire, et sa combinaison avec les polyphénols conduit à une excellente activité cytotoxique contre les cellules HeLa (cellules cancéreuses). Par conséquent, en raison de sa richesse en molécules bioactives, le germe exerce une activité antioxydante considérable testée avec les méthodes ABTS, DPPH et FRAP [80,81].

III. Métabolites secondaires des plantes : Généralités

Introduction

Le sujet de la phytochimie, ou chimie des plantes, s'est développé au cours des dernières années en tant que discipline distincte, à mi-chemin entre la chimie organique des produits naturels et la biochimie des plantes, tout en y étant étroitement liée [82]. Elle s'intéresse à l'énorme variété des substances organiques élaborées et accumulées par les plantes et traite la structure chimique de ces substances, leurs biosynthèses, leurs métabolismes, leurs distributions naturelles et leurs fonctions biologiques. Cependant, il faudra noter que la richesse des végétaux en différentes substances chimiques dépend de plusieurs facteurs incluant le degré de maturité au moment de la récolte, les conditions environnementales, les conditions de transformation et de stockage [83]. Particulièrement, la filière du caroubier a été sujette de différentes recherches phytochimiques sur presque toutes les parties de l'arbre (racines, écorce, feuilles et fruit) et ont été identifiées riches en substances organiques à haute valeur ajoutée.

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires des végétaux et sont des déterminants importants de la qualité sensorielle et nutritionnelle des plantes, des fruits et des légumes [82]. En outre, l'intérêt porté par les chercheurs pour ces composés dépasse leurs importances nutritionnelles mais il est dû essentiellement à leurs fortes activités antioxydantes et biologiques ainsi qu'à leurs rôles dans la prévention et le traitement de diverses maladies critiques. En effet, les diverses propriétés des polyphénols ont été déjà déterminées dans plusieurs études notamment sur les maladies cardiovasculaires, le vieillissement, l'obésité, le diabète, les troubles cognitifs, le développement des fonctions endothéliales, l'inhibition de l'angiogenèse [84]. Néanmoins, d'autres applications industrielles ont été déclarées. Par exemple ils peuvent être utilisés comme colorants naturels et conservateurs pour les aliments, ou dans la production de peintures, de papier et des produits cosmétiques [85]. De ce fait, un grand effort a été établi pour caractériser les différents composés phénoliques présents dans les tissus des végétaux. Dans cette partie, nous allons se focaliser sur les propriétés de certains

groupes de polyphénols qui ont été révélés dans le profil phytochimique des parties des graines de caroube.

1) Les polyphénols

En général, les polyphénols sont des composés qui incluent dans leurs structures au moins un cycle aromatique à 6 carbones portant plus d'un seul groupe hydroxyle. Les polyphénols comprennent plus de 8000 composés, sont divisés en plusieurs classes en fonction du nombre de cycles aromatiques et aussi des groupes moléculaires liant ces cycles entre eux. Les principaux composés phénoliques sont : les flavonoïdes, les acides phénoliques, les lignanes et les stilbènes [86]. La [Figure 13](#), illustre les structures chimiques de chaque classe des polyphénols.

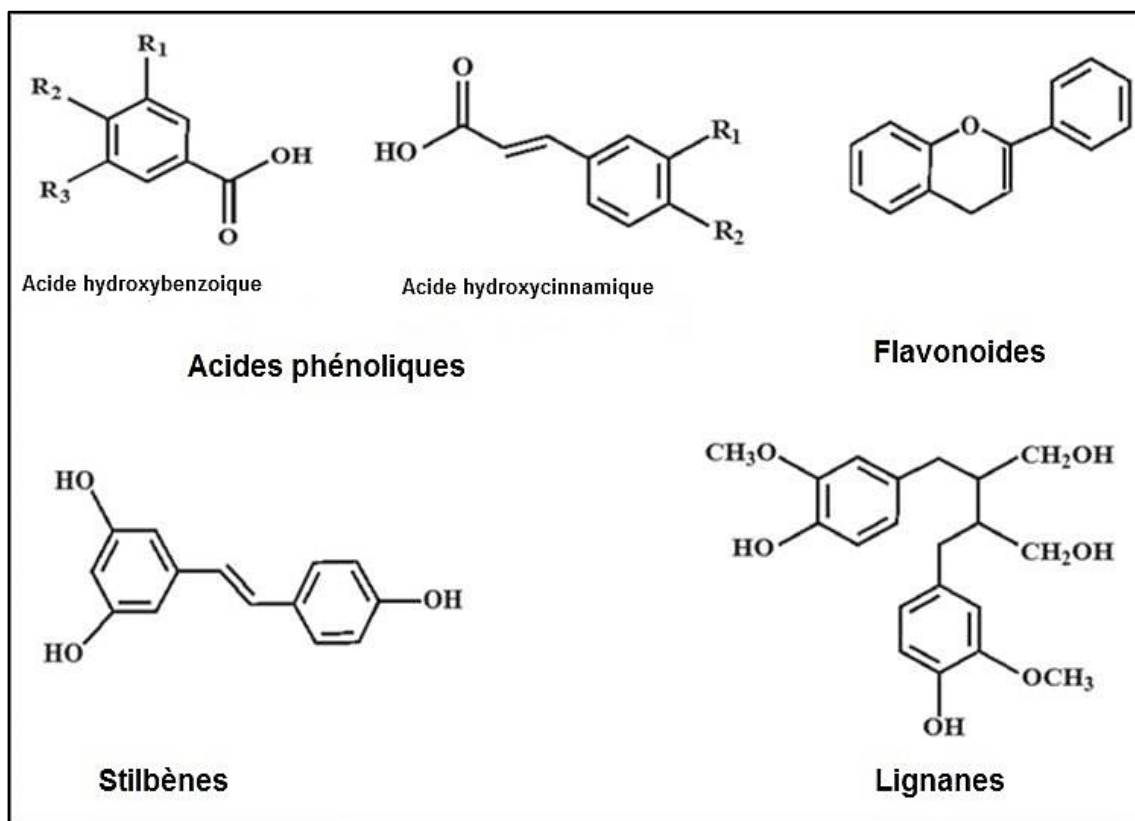


Figure 13 : Structure chimique des polyphénols

L'effet bénéfique des polyphénols sur la santé humaine a beaucoup attiré l'intérêt des chercheurs dans ces dernières années. Effectivement, les groupes phénoliques des polyphénols peuvent accepter un électron pour former des radicaux phénoxyles relativement stables, perturbant ainsi les réactions d'oxydation des chaînes dans les tissus cellulaires. Il est bien prouvé que les aliments et les boissons riches en polyphénols peuvent augmenter la capacité antioxydante du plasma expliqué ainsi soit par la présence de polyphénols réducteurs et de leurs métabolites dans le plasma, soit par leurs effets sur les concentrations d'autres agents réducteurs

(épargnant les effets des polyphénols sur d'autres antioxydants endogènes), ou par leurs effets sur l'absorption de composants alimentaires pro-oxydants, tels que le fer [87]. Notamment, les polyphénols peuvent protéger les constituants cellulaires contre les dommages oxydatifs et par conséquent limiter le risque de diverses maladies dégénératives associées au stress oxydatif. Cet effet antioxydant peut être effectué de façon directe impliquant par piégeage des radicaux libres ou par chélation des métaux ou bien indirectement en modulant l'activité des enzymes du stress oxydatif, par augmentation de l'expression des gènes codant pour des enzymes antioxydantes ou par exécution d'une action protectrice contre les autres antioxydants tels que la vitamine C et les α -tocophérols [83].

1.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont les composés les plus abondants dans les aliments et sont divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque et les dérivés de l'acide cinnamique. La teneur de l'acide hydroxybenzoïque dans les plantes est très faible à l'exception de certains fruits rouges et les oignons avec quelques dizaines de milligrammes par kilogramme du poids frais. Certes, les acides hydroxycinnamiques sont plus abondants et se composent principalement d'acides p-coumarique, caféique, férulique et sinapique [88]. Par ailleurs, ces acides sont rarement trouvés en forme libre, souvent ils sont des dérivés ou esters glycosylés de l'acide quinique, de l'acide shikimique et de l'acide tartrique. Par exemple, la combinaison entre l'acide caféique et la quinique forme l'acide chlorogénique ([Figure 14](#)), qui se trouve dans de nombreux types de fruits et en fortes concentrations dans le café [83].

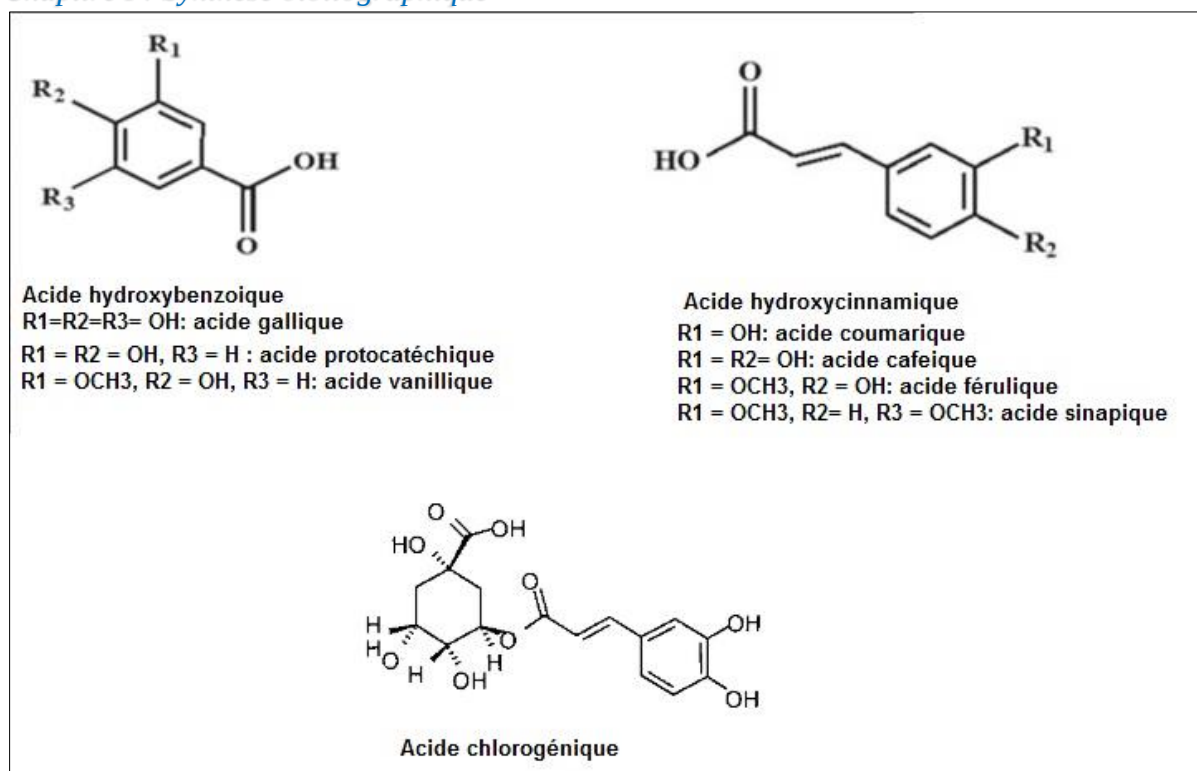


Figure 14 : Structures chimiques des acides phénoliques

1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires essentiels des plantes, qui jouent un rôle fondamental dans la croissance, la régulation et la structure et agissent comme des agents de défense contre les dangers chimiques, physiques et biologiques. Certes, pour les hommes les flavonoïdes ne sont pas parmi les nutriments essentiels, mais puisqu'ils font partie de leurs alimentations, leurs effets sur l'organisme est important au cours de la vie [89]. Dans l'ensemble, nous comptons plus de 9000 structures de flavonoïdes présentes dans divers aliments consommés comme les fruits, les légumes, thé vert et noir, café, et abondamment dans les plantes [90]. Les flavonoïdes sont constitués de deux cycles en 6C (1) et (2) séparés par un hétérocycle de 3C au centre contenant de l'oxygène (3) ([Figure 15](#)). Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes sous-classes en fonction de la connexion entre les cycles (2) et (3), la structure du cycle (2) et les modèles d'hydroxylation et de glycosylation des trois cycles [91].

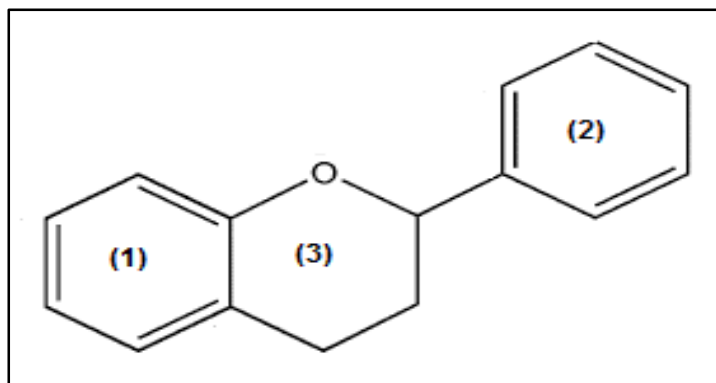
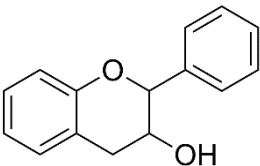
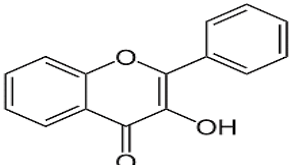
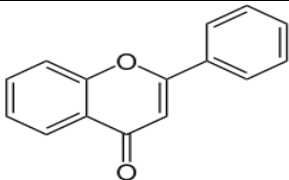
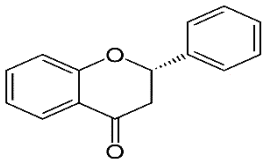
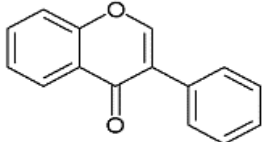
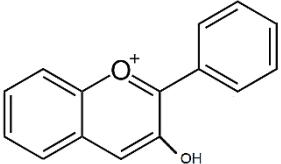


Figure 15 : Structure basique des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont classés en six sous-classes connues sous : flavanols, flavonols, flavones, flavonones, isoflavones et les anthocyanes [91] ([Tableau 3](#)). L'intérêt porté à ses composés dépasse de loin leurs structures ou leurs qualités organoleptiques mais il est essentiellement lié à leurs fonctionnalités et propriétés sur la santé humaine. Par ailleurs, la plupart des études s'appuient fortement sur le développement et l'optimisation de multiples techniques et méthodes analytiques utilisées pour l'analyse des flavonoïdes afin d'améliorer leurs détections et caractérisations dans les aliments. De ce fait, la méthode de préparation et d'extraction des flavonoïdes à partir des sources biologiques nécessite d'adapter une procédure convenable [92]. En bref, après broyage, une étape d'extraction liquide est effectuée. Dans certains cas, d'autres étapes peuvent être réalisées avant comme la filtration, la centrifugation selon la nécessité et la source contenant les flavonoïdes. Néanmoins, la séparation des flavonoïdes des extraits biologiques complexes nécessite des techniques telle que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) qui peut être couplée à des méthodologies de détection, d'identification et/ou de caractérisation telles que la détection électrochimique, la fluorescence, l'UV-visible, la spectrométrie de masse (MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) [93].

Tableau 3 : Les sources des sous-classes des flavonoïdes, structures et leurs types

Classes et sources	Structure	Type
Flavanols (thé vert, fruits : raisins, cerises, fraises, prunes, framboises, abricots, pommes, poires)		Catéchine Epicatechine Gallocatechine
Flavonols (fraises, pommes, épinards, choux fleurs)		Quercétine, kaempférol, myricétine, galangine
Flavone (persil, céleri, Camomille, Rosemarie, thé vert et noir, fenugrec, origan)		Apigénine, Lutéoline, acétine, diosmétine
Flavanones (agrumes, cumin, pois chiche, réglisse, pomme de terre)		Naringinine, Hespérétine, Ériodictyol
Isoflavones (haricot vert, soja, pois chiche, arachide)		Rétusine, génistéine, daidzéine, formononétine
Anthocyanes (fruits)		Cyanidine

Propriétés des flavonoïdes

Depuis de nombreuses années, les propriétés bénéfiques des flavonoïdes contre diverses maladies et les interprétations populaires telles que connu par le « paradoxe français » ou le «

régime méditerranéen » ont été attribuées à leurs activités antioxydantes. Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants capables de piéger les radicaux libres et de diminuer leurs formations [83]. D'autre part, les flavonoïdes ont des propriétés anti-inflammatoires grâce à différents mécanismes tels que l'inhibition des enzymes régulatrices et des facteurs de transcription qui ont un rôle important dans le contrôle des médiateurs impliqués dans l'inflammation [92], [94]. Par conséquent, les flavonoïdes ont un effet important sur plusieurs cellules et mécanismes immunitaires qui sont importants dans les processus inflammatoires [95]. Parmi les multiples activités bénéfiques des flavonoïdes aussi, celles sur le cancer, le cerveau et les maladies cardiovasculaires sont les plus étudiées. En effet, les flavonoïdes ont de remarquables propriétés de lutte contre le cancer étant donné qu'ils peuvent jouer le rôle d'antioxydants ou de pro-oxydants. Ils aident le système de défense antioxydant du corps en inhibant le développement de nouvelles cellules cancéreuses, en prévenant les cancérogènes d'atteindre leurs sites d'activation et en diminuant la toxicité de certains composés par l'inhibition de leurs métabolismes [96]. En plus de ces propriétés déjà citées, d'autres études *in vivo* et *in vitro* ont confirmé que les flavonoïdes jouent un rôle crucial dans la régulation de la glycémie, la neuro-protection, la régulation du profil lipidique, la protection rétinienne, l'hépatoprotection, le contrôle du poids corporel, l'amélioration de la réponse du système immunitaire, et retardent le vieillissement [97]. Certes, la méthode de consommation des flavonoïdes reste une étape primordiale pour garantir leurs efficacités de remédier à certaines pathologies. En effet, leurs faibles solubilités, le métabolisme rapide et la mauvaise absorption des flavonoïdes alimentaires dans le tractus gastro-intestinal entravent leur potentiel pharmacologique. En plus de leurs ingestions avec d'autres composants alimentaires qui augmentent leurs complexations ou leurs précipitations, leurs dégradations par le microbiote réduisent leurs stabilités et leurs biodisponibilités. Par conséquent, les recherches récemment publiées en nanomédecine ont reporté l'importance de la consommation des flavonoïdes sous forme de nanoparticules facilitant ainsi leurs solubilités dans l'eau et leurs biodisponibilités *in vivo* ainsi qu'ils permettent une circulation plus rapide dans le corps [96], [98].

1.3. Les tanins

Les tanins sont parmi les composés naturels les plus intéressants qui peuvent être obtenus à partir des plantes. Ce sont des structures phénoliques naturelles extraites en abondance de l'écorce ainsi que du bois et en moindre quantité des feuilles et des fruits de diverses variétés d'espèces végétales [99]. Le rôle des tanins dans les plantes est la protection contre la lumière (rayons UV et radicaux libres) et la défense en cas des menaces biologiques différentes

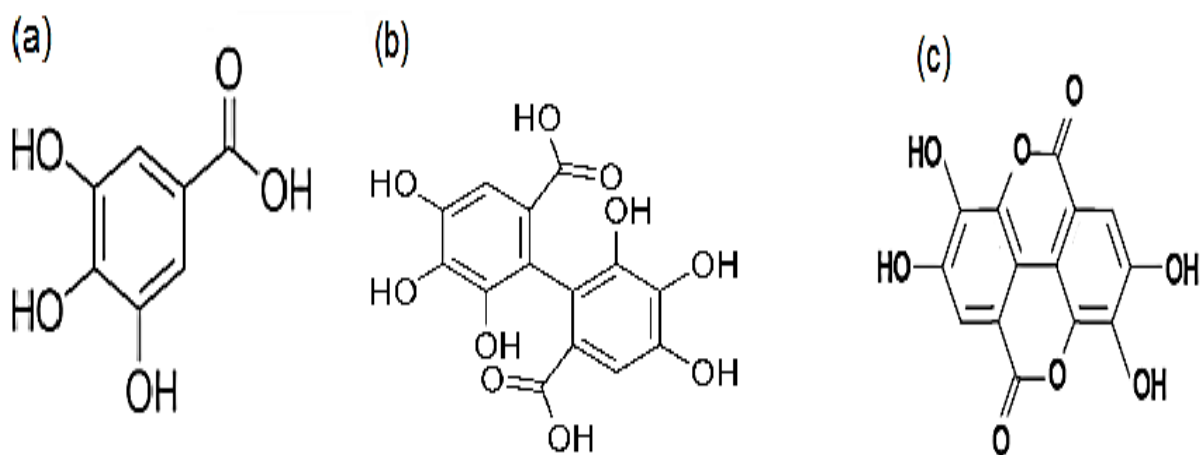
(animaux, insectes, champignons et bactéries). Généralement, les tanins ont un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton ayant la propriété de former des complexes insolubles avec les protéines, les polysaccharides, les alcaloïdes et les acides nucléiques. Ainsi, cette propriété leur confère plusieurs activités antioxydantes et antibactériennes [100], [101]. Par ailleurs, en raison de leurs capacités antioxydantes, les tanins sont largement utilisés dans différents domaines tels que l'industrie pharmaceutique, médicale ou alimentaire [102].

Dans la littérature, les tanins étaient divisés en deux classes principales à savoir les tanins condensés et hydrolysables. Cependant, actuellement un autre type est ajouté : les phlorotanins.

1.3.1 Les tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont les groupes les plus complexes des tanins. Ils sont constitués d'un noyau de polyol (généralement du D-glucose), qui est estérifié avec des acides phénoliques dont principalement l'acide gallique (gallotanins) ou l'acide hexahydroxydiphénique et dans ce cas ils sont appelés les ellagitanins [103].

Les gallotanins sont constitués d'une molécule centrale, comme le glucose, entourée d'unités d'acide gallique alors que les ellagitanins contiennent de l'acide hexahydroxydiphénique ou l'acide ellagique ([Figure 16](#)). La grande variété des structures de ces composés est due aux nombreuses possibilités de formation de liaisons oxydantes. Les réactions d'oxydation intermoléculaires donnent naissance à de nombreux composés oligomères ayant un poids moléculaire compris entre 2000 et 5000 Dalton [104].



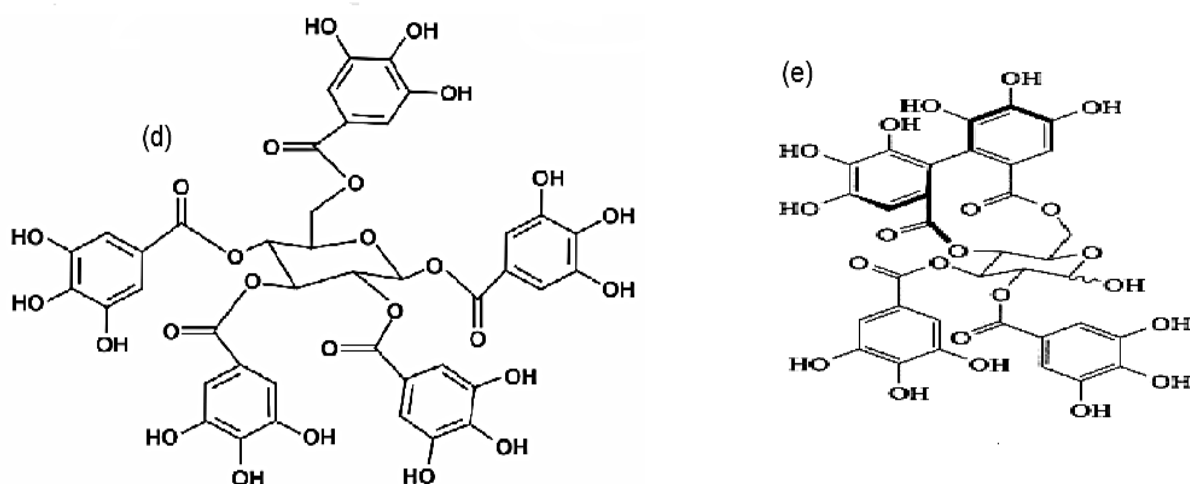


Figure 16 : Les structures des tanins hydrolysables : (a) acide gallique, (b) acide hexahydroxydiphénique, (c) acide ellagique, (d) gallotanins, (e) ellagitanins

1.3.2 Les tanins condensés

Les tanins condensés sont des flavonoïdes oligomères ou des polymères constitués d'unités de type flavan-3-ol. Ils sont également appelés proanthocyanidines, car ils se décomposent en anthocyanidines dans des solutions d'éthanol chauffées (dans les conditions acides). La catéchine, l'épicatéchine, la gallocatéchine et l'épithocatéchine sont les plus trouvés dans la nature. Le thé, le café, les raisins, le vin, la menthe et le basilic sont la source la plus riche des tanins condensés. Non seulement ces produits mais aussi le chocolat noir est également une bonne source de (+) catéchine et (-) d'épicatéchine et possède une forte activité antioxydante. Toutefois, le polymère contenant de 2 à 50 unités de flavonoïdes ou plus liées par une liaison carbone-carbone appelé proanthocyanidines est également un des types les plus importants des tanins condensés ([Figure 17](#)).

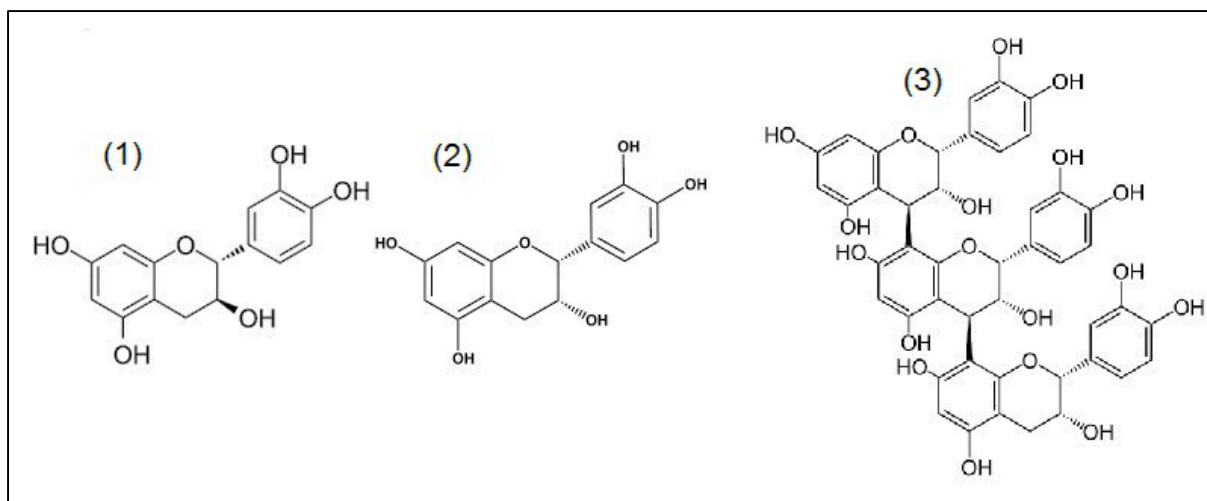


Figure 17 : Les structures des tanins condensés : (1) catéchine, (2) épicatechine, (3) procyanidine.

1.3.3 Les phlorotannins

Les phlorotannins se trouvent en grande majorité dans les algues brunes et sont composés d'unités de phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzène) dont ses unités sont liées différemment et sont considérablement hydrophiles. Leurs poids moléculaires relatifs sont entre 126 et 650 kDa, contenant à la fois des groupes phényle et phénoxy [105]. Sur la base de la condensation des unités, ils peuvent être classés en quatre sous-groupes : les fuhalols, les phloréthols (phlorotannins avec liaison éther), les fucophloréthols (avec liaison éther et connexion phényle) et les eckols (avec éléments structuraux dibenzodioxine) (Figure 18). Les diverses études reportées sur ce groupe ont confirmé que les phlorotannins possèdent des effets antioxydants, anti-cancéreux, inhibent certains systèmes enzymatiques, présentent une activité antibactérienne et anti-VIH, sont des radio-protecteurs et ont des effets antiallergiques [106], [107].

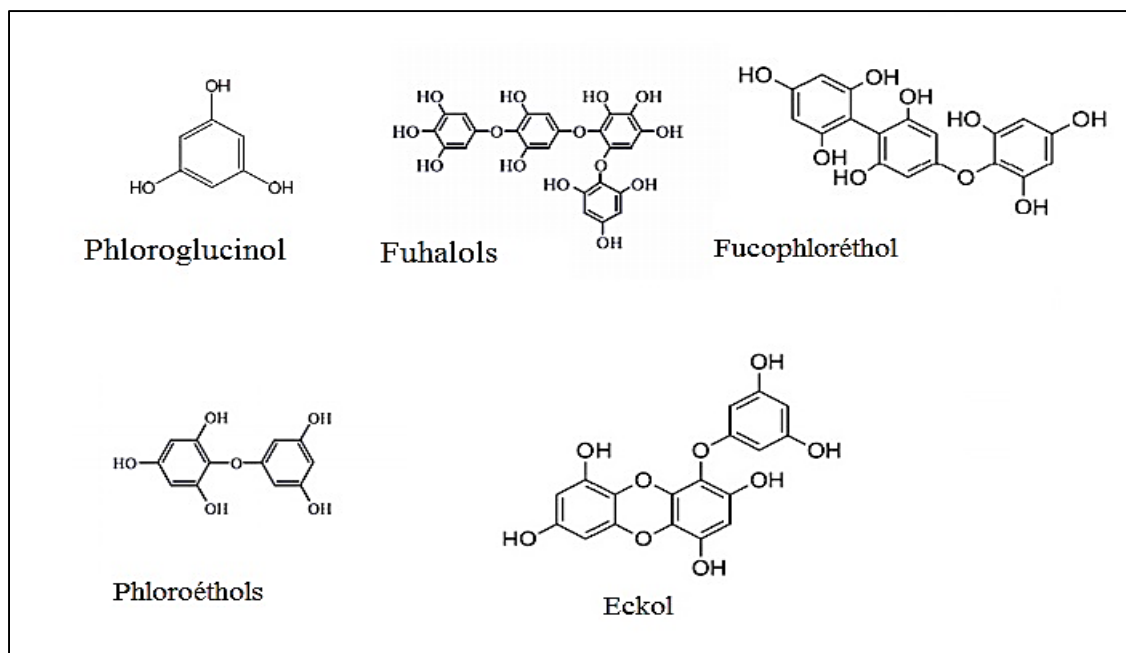


Figure 18 : Les structures de base des phlorotanins isolés des algues

1.4. Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés naturellement présents dans les plantes et font partie de leurs systèmes de défense présentant une structure carbonée particulière en C6-C2-C6 [108]. En effet la majorité des stilbènes sont des dérivés de l'unité de base *trans* resvératrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbène) [109]. En outre, plusieurs recherches ont reporté les activités biologiques de ces composés ainsi que leurs applications pharmacologiques. En particulier, le resvératrol est déclaré avoir des activités anti-cancérogène, antioxydante, anti-inflammatoire ainsi que anti-leucémique même à faible quantité [83], [110], [111]. Vu ces diverses activités, le resvératrol est suggéré de pouvoir ralentir la progression d'une grande variété de maladies, y compris le cancer et les maladies cardiovasculaires, ainsi que prolonger la durée de vie de divers organismes [112].

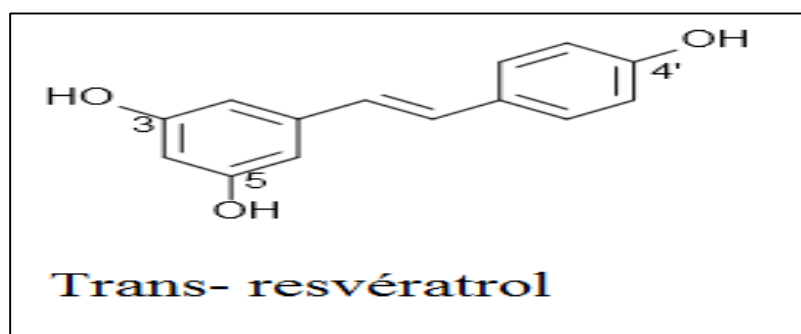


Figure 19 : la structure du stilbène le plus connu des plantes
« le *trans*-resvératrol

1.5. Les lignanes

Les lignanes sont une classe des métabolites secondaires des plantes formés de deux unités phénylpropanoïdes dans lesquels les unités C6-C3 sont liées par le carbone central de leurs chaînes latérales propyle ([Figure 20](#)) [113]. Ils sont trouvés dans les racines, les rhizomes, les tiges, les feuilles, les graines et les fruits. Certes, les lignanes participent à la croissance et au développement des plantes mais aussi ils jouent un rôle important dans le système de défense contre divers pathogènes. En plus de leur fonction dans la nature, les lignanes possèdent également d'importantes activités pharmacologiques, anti-tumorale, anti-inflammatoire, immunosuppressive, cardiovasculaire, antioxydante et antivirale [114]–[116].

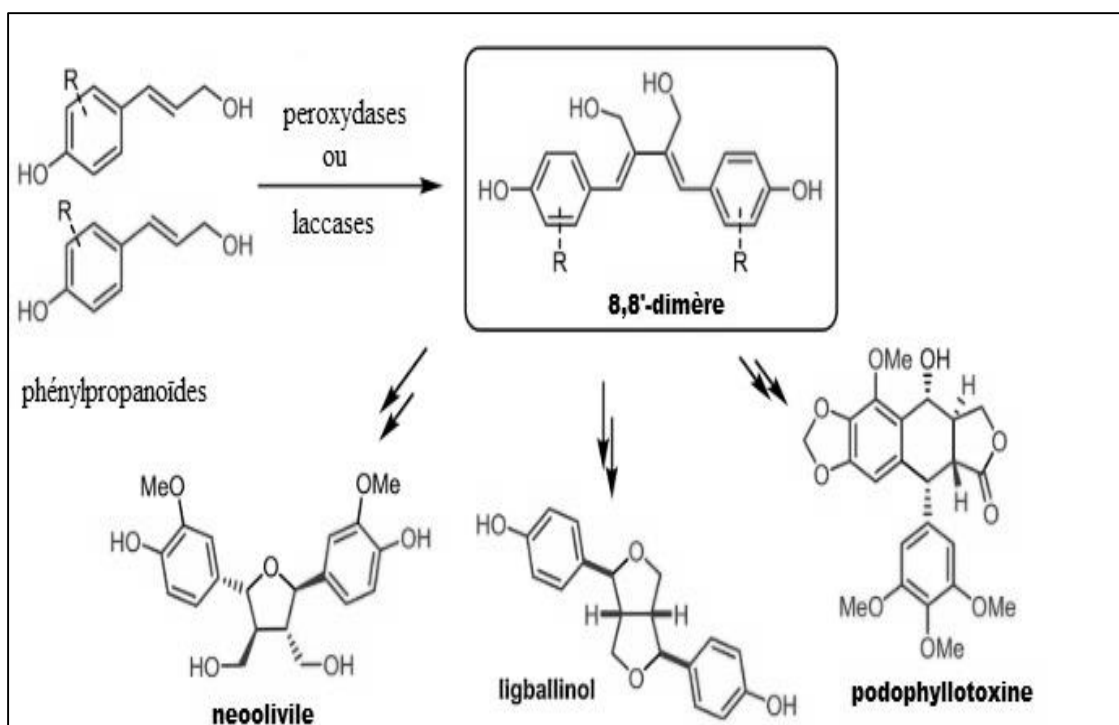


Figure 20 : Dimérisation des phénylpropanoïdes : synthèse des lignanes- structure de divers lignanes [120]

Par ailleurs, la farine des graines de caroubes a été reporté contenir les lignanes ([Figure 21](#)). Les phytostérols détectés étaient le secoisolaricirésinol, le laricirésinol, l'isolaricirésinol et le pinorésinol [117].

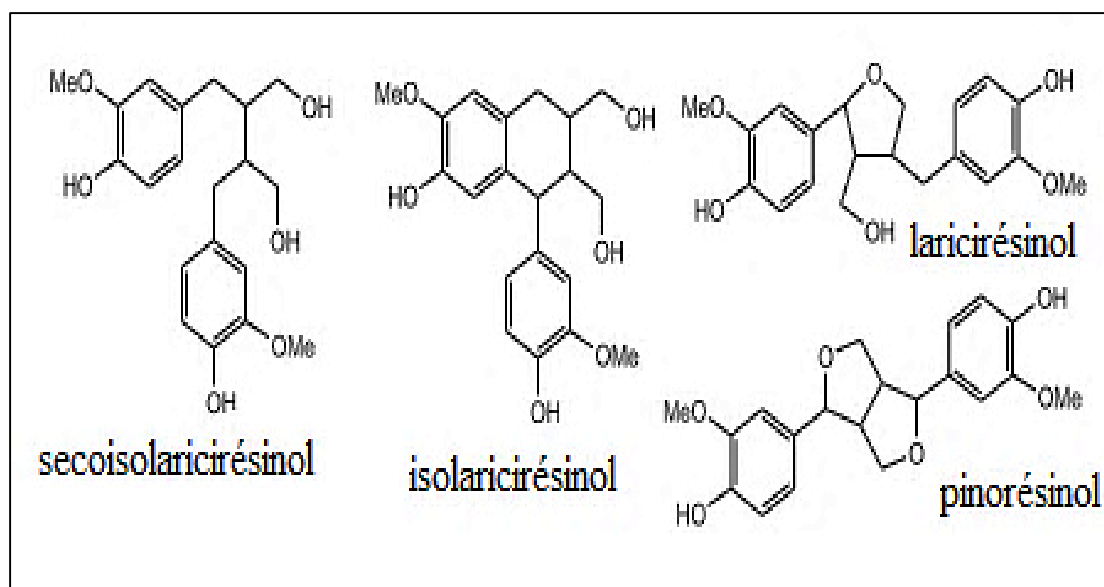


Figure 21: Structures des phytostérols détectés dans la farine de graines de caroubes

2) Les alcaloïdes

2.1. Généralités sur les alcaloïdes

Les alcaloïdes du mot Arabe (القلي) sont présents dans environ 20% des espèces végétales, ils sont généralement extraits des *Renonculacées*, *Papaveraceae*, *Fangke*, *Solanaceae*, *Apocynaceae*, *Rutaceae*, *Leguminosae* et *Polygonaceae* [118], [119]. Ils sont structurellement très diversifiés et leur nombre est vaste comprenant plus que 27 000 structures [120]. En effet, les alcaloïdes sont une classe générale de composés organiques basiques qui contiennent de l'azote dans leur structure de base, et qui possèdent la propriété d'être des composés basiques, hormis que la plupart d'entre eux ont des structures cycliques complexes.

2.2. Classification des alcaloïdes

Les alcaloïdes peuvent être classés en fonction des substances de départ de leurs voies de biosynthèse. Essentiellement les alcaloïdes sont divisés en trois grands groupes, dont les vrais, pseudo- et proto-alcaloïdes et notamment chaque classe renferme des propriétés biologiques spécifiques en fonction de la complexité de leur squelette de base.

2.2.1. Les alcaloïdes vrais

Les alcaloïdes vrais sont les composés qui pendant leurs biosynthèses ont impliqué un ou plusieurs acides aminés et partagent un hétérocycle avec l'azote. Ces alcaloïdes sont des substances hautement réactives avec une activité biologique même à des faibles doses. Les principaux précurseurs des vrais alcaloïdes sont des acides aminés tels que la L-ornithine, la L-lysine, la L-phénylalanine, L-tyrosine, le L-tryptophane et la L-histidine [121]. [La Figure 22](#), élucide des exemples connus des alcaloïdes vrais nous citons : la morphine, la cocaïne, quinine.

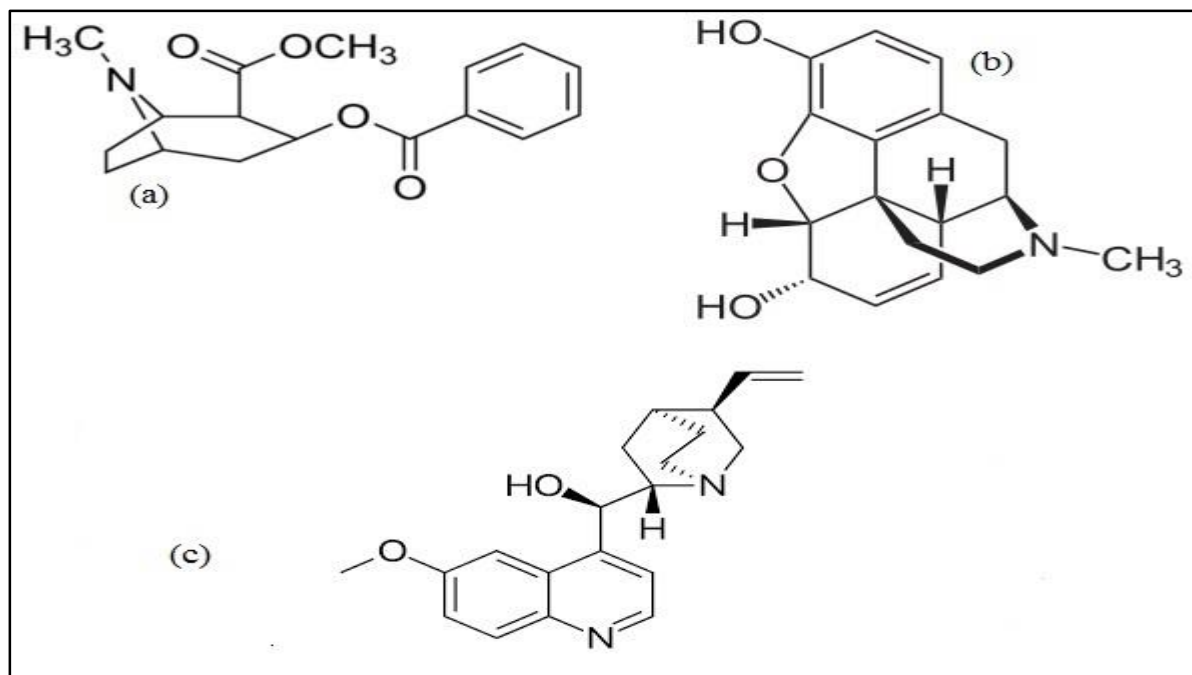


Figure 22: Des exemples de quelques structures des alcaloïdes vrais (a) cocaïne, (b) morphine et (c) quinine.

2.2.2. Les proto-alcaloïdes

Les proto-alcaloïdes sont des composés dans lesquels l'atome d'azote dérivé d'un acide aminé ne fait pas partie du système hétérocyclique. Ces alcaloïdes comprennent des composés dérivés de la L-tyrosine et du L-tryptophane avec un cycle fermé mais généralement leurs structures sont simples. L'hordénine est un proto-alcaloïde, dérivé de la L-tyrosine faisant partie de la classe des phényléthylamines ([Figure 23](#)). La plupart des alcaloïdes de cette classe ont été reportés pour leurs utilisations dans le traitement des maladies mentales et parfois pour lutter contre les douleurs et la névralgie [122], [123].

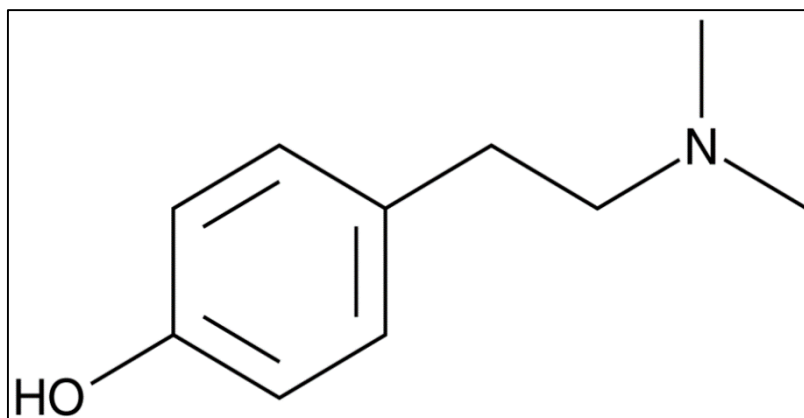


Figure 23 : Structure d'un proto-alkaloïde : l'Hordénine.

2.2.3. Les pseudo-alkaloïdes

Les pseudo-alkaloïdes sont des composés dont les squelettes basiques de carbone ne sont pas dérivés d'acides aminés. Certes, ils sont connectés à la voie d'acides aminés dérivant ainsi des précurseurs ou postcurseurs des acides aminés. Ils peuvent également résulter des réactions d'amination et de transamination des différentes voies liées aux précurseurs ou postcurseurs des acides aminés. Les alcaloïdes stéroïdiens et terpénoïdes sont aussi comptés parmi les pseudo-alkaloïdes, cela est expliqué par l'insertion de l'atome d'azote à un stade tardif dans la molécule ainsi que cette classe peut contenir des dérivés d'acétate et de phénylalanine [82], [124]–[126]. La [Figure 24](#) reporte la structure de quelques pseudo-alkaloïdes tels que : la conine qui est déclarée comme étant un alcaloïde toxique causant les mêmes effets que la nicotine après un empoisonnement sévère, la possibilité de coma ou de mort par insuffisance respiratoire est élevée. De même, l'aconitine est l'un des pseudo-alkaloïdes avec des effets toxiques impliquant même un arrêt cardiaque suite à une exposition à forte dose. Certes, des doses moins concentrées ont été utilisées pour le traitement des maladies du système immunitaire [127], [128].

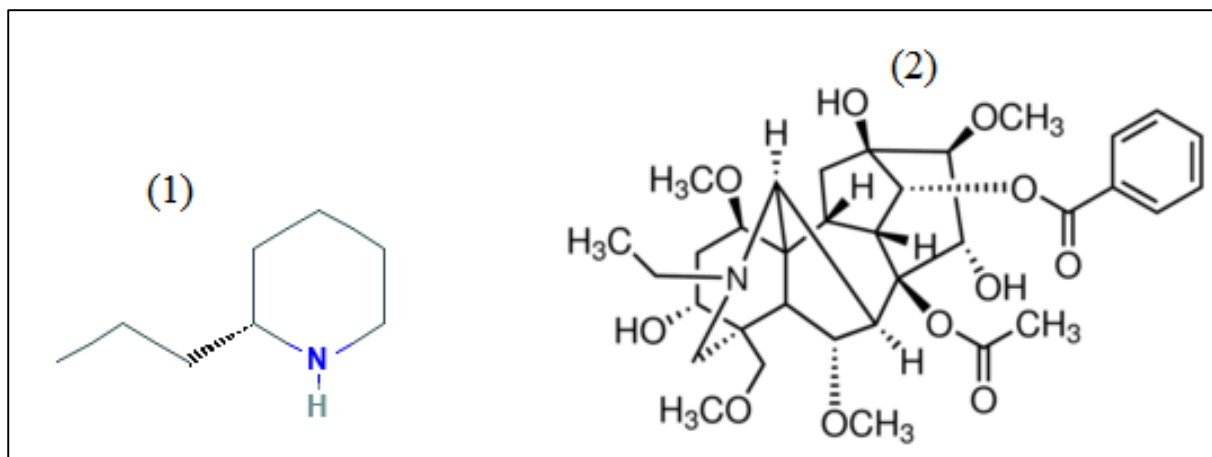


Figure 24 : Exemples des structures de pseudo-alcaloïdes (1) : conine et (2) : aconitine

2.3. Utilisation des alcaloïdes

Actuellement, les alcaloïdes sont très recherchés pour leurs effets médicaux. En effet, dans la médecine moderne, les alcaloïdes ont un large éventail d'applications pharmacologiques. De ce fait, des études ont indiqué que plus de 50 drogues qui sont déjà sur le marché incluent ceux à effet analgésique (par exemple, morphine), antiasthmatique (par exemple, éphédrine), anti-arythmique (par exemple, quinidine), anticancéreux (par exemple, berbérine), antihypertenseur (par exemple, réserpine), antipyrétique (par exemple, quinine), antibactérien (par exemple, ciprofloxacine) et les effets anti-hyperglycémiques (par exemple, la pipérine). D'autres alcaloïdes possèdent des effets psychotropes stimulants (par exemple, la cocaïne, la caféine et la nicotine) et ont été utilisés dans les rituels ou comme drogues récréatives [120], [129]–[131].

2.4. Détection, extraction et identification des alcaloïdes

La détection des alcaloïdes commence par un test de screening phytochimique de la plante qui consiste à révéler la présence des alcaloïdes par des réactifs (réactif de Mayer, réactif de Drangendorff). Ces réactifs contiennent des métaux ou des métalloïdes qui se combinent avec les alcaloïdes. Ainsi, une précipitation en milieu acide permet de témoigner la présence des alcaloïdes dans la plante.

L'extraction des alcaloïdes totaux peut être effectuée en milieu alcalin. La plante délipidée (avec un solvant apolaire) est mélangée avec une solution alcaline qui libère les alcaloïdes de leurs combinaisons avec les sels. La solution alcaline est dans la majorité des cas l'ammoniaque. Les bases obtenues sont après solubilisées dans un solvant organique. Ce dernier contenant les alcaloïdes est ainsi concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait sec obtenu est solubilisé

dans une solution aqueuse acide (HCl, H₂SO₄, etc.) à un pH de 1 à 2, puis délipidé autant de fois jusqu'à épuisement total de la phase organique d'alcaloïdes. Les alcaloïdes sous forme de sels restent dans la phase aqueuse alors que les impuretés neutres passent vers la phase organique. La phase aqueuse acide est rendue alcaline (pH=9) puis les alcaloïdes totaux sont récupérés avec un solvant organique non miscible avec l'eau (CH₂Cl₂, EtOAc, etc.).

Les alcaloïdes totaux ainsi récupérés passent par des étapes de séparation. Pour cela, des techniques chromatographiques (sur silice, résines échangeuses d'ions, etc.) peuvent être utilisées. Actuellement, la chromatographie en phase liquide à haute performance couplée avec un détecteur HPLC-UV/ HPLC-MS/ HPLC-UV-MS ainsi que la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) sont les plus utilisées [132]–[134]. Avec l'avancement de la recherche et la mise à jour des bases de données, ces méthodes sont de nos jours capables d'identifier et d'élucider les structures chimiques des alcaloïdes détectés. Parmi les alcaloïdes qui ont été identifiés dans la filière du caroubier dont les gousses et le germe des graines de caroube est la théophylline ([Figure 25](#)). Cette dernière est connue comme agent relaxant des muscles lisses utilisée dans le traitement des maladies respiratoires ainsi qu'en combinaison avec les polyphénols, la théophylline exerce un effet inhibiteur des ROS et un effet cytotoxique contre les cellules HeLa [80].

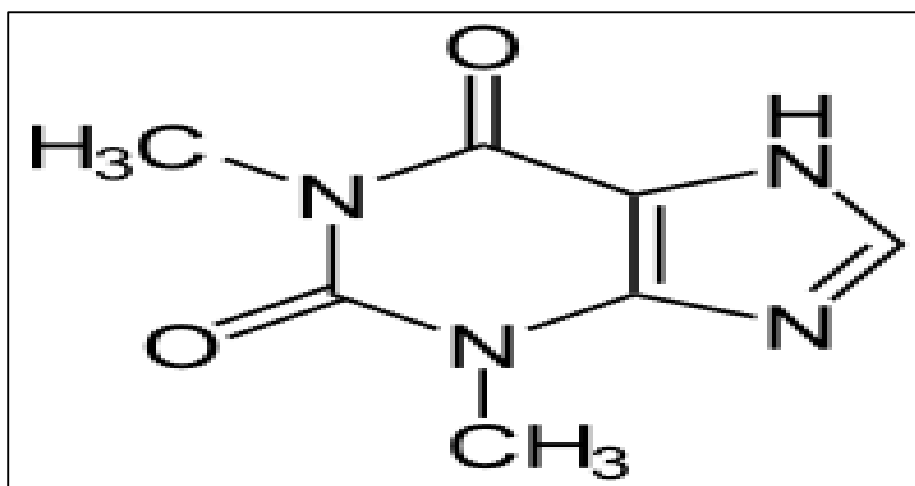


Figure 25 : Structure chimique de la théophylline

IV. Le stress oxydatif

1) Définition et causes

Le stress oxydatif est défini comme étant un déséquilibre entre les espèces réactives de l'oxygène (ERO), telles que l'anion superoxyde (O₂^{•-}), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le

radical hydroxyle ($\text{HO}^\bullet$) et les systèmes antioxydants. Les ERO à faibles concentrations jouent un rôle majeur dans multiples processus physiologiques, y compris la phosphorylation des protéines, l'activation du facteur de transcription, la différenciation cellulaire, l'apoptose, la maturation des ovocytes, la stéroïdogénèse, l'immunité cellulaire et la défense cellulaire contre les micro-organismes [135]. Par conséquent, une accumulation des ERO entraîne des effets néfastes sur les composants cellulaires cibles tels que l'ADN, les protéines et les lipides impliquant une série de pathologies et de maladies graves [136]. Certes, la formation des ERO est due à des facteurs endogènes et d'autres exogènes.

1.1. Facteurs endogènes

En effet, les ERO peuvent être produites par les cellules de notre corps principalement à partir des sources endogènes suivantes :

- ✓ Pendant la respiration par consommation d' O_2 par les mitochondries pour produire du H_2O , les oxydants tels que le radical libre d'oxygène, H_2O_2 et le radical hydroxyle ($\text{HO}^\bullet$) sont des sous-produits générés de ce processus [137].
- ✓ La destruction des bactéries et des cellules infectées par le virus par les cellules phagocytaires libère de l'oxyde nitrique ($\text{NO}^\bullet$), du peroxyde d'hydrogène et des radicaux libres d'oxygène [138].
- ✓ Dégradation des acides gras et d'autres molécules par les peroxysomes, les organites produisent du peroxyde d'hydrogène comme sous-produit, qui est ensuite dégradé par la catalase. Le peroxyde non dégradé pénètre dans d'autres compartiments de la cellule voisine, entraînant ainsi des dommages oxydatifs de l'ADN [139].

1.2. Facteurs exogènes

Tant que les ERO peuvent être produites par des processus physiologiques, des facteurs exogènes peuvent donner lieu davantage à la production excessive des ERO. On cite l'exposition aux radiations (l'irradiation par les rayons gamma et X) et aux polluants incluant la fumée et les toxines. Ajoutant aussi, la contamination métallique de l'eau et de l'environnement due aux activités humaines, notamment l'utilisation d'engrais, l'exploitation minière industrielle et la fusion, ainsi que la production de déchets urbains [84], [138].

2) Les antioxydants

Le terme « antioxydant » désigne toute substance qui lorsqu'elle est présente à faible concentration par rapport à un oxydant peut retarder ou empêcher la réaction d'oxydation [140].

Comme déjà cité, le stress oxydatif joue un rôle majeur dans l'initiation et la progression d'un certain nombre de maladies humaines telles que le cancer, l'hyperlipidémie, le diabète, les troubles métaboliques, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires (hypertension, cardiopathie ischémique, insuffisance cardiaque chronique) et les maladies neurodégénératives [141]. Effectivement pour empêcher l'oxydation ainsi que pour réguler ou inhiber la production excessive des ERO, il existe des antioxydants appelés endogènes dont les enzymes antioxydants, et les antioxydants exogènes apportés par les aliments et les boissons, ces antioxydants sont liés à la protection du substrat d'un type d'oxydation spécifique [138]. Toutefois, tous les antioxydants suivent l'un des sept mécanismes d'action qui varient selon le type d'oxydant : la séquestration des radicaux libres du milieu, la chélation des ions métalliques, l'inhibition des enzymes produisant des radicaux libres, l'activation des enzymes antioxydantes endogènes, la prévention de la peroxydation lipidique, la prévention des dommages de l'ADN ou bien prévention de la modification des protéines et la destruction des sucres [142].

2.1. Les antioxydants endogènes

Afin de lutter contre les effets nocifs des radicaux libres qui interagissent avec des cellules biologiques, des membranes ou des organes, le corps humain a un ensemble de molécules antioxydantes endogènes. Le mécanisme d'action des antioxydants endogènes passe par trois lignes préventives dont la première ligne de défense est la prévention des réactions qui conduisent à la formation des ERO, ensuite l'étape de réparation dont les molécules antioxydantes endogènes interrompent les réactions d'oxydation radicalaires et enfin, vient la troisième ligne avec des désactivateurs des produits des réactions radicalaires en réparant ou en éliminant les dommages [143]. La première lignée est composée à la fois de molécules enzymatiques et non enzymatiques, citant ainsi la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion peroxydase, les peroxyrédoxines (enzymatiques), mais aussi la céruloplasmine, la ferritine, la transferrine et l'albumine (non enzymatique). La deuxième lignée est strictement non enzymatique qui inactive rapidement les réactions, y compris les vitamines, les cofacteurs enzymatiques, les composés organosulfurés et les composés azotés non protéiques. Par ailleurs, la troisième lignée implique des mécanismes de réparation causés par les ERO et les espèces réactives de l'azote (ERN). Cela implique des antioxydants enzymatiques qui réparent l'ADN et les protéines endommagés, et combattent davantage les lipides oxydés et la propagation des chaînes radicalaires de lipides peroxydes dans les cellules et les membranes [142], [144]. Les principales enzymes antioxydantes contre les radicaux superoxyde comprennent la superoxyde dismutase (SOD ; EC 1.15.1.1), la catalase (CAT ; EC 1.11.1.6) et la glutathion peroxydase

(GSH-Px ; EC 1.11.1.9) [145]. Ces enzymes agissent en coordination, la glutathion peroxydase qui donne deux électrons réduit les peroxydes en formant des sélénoles (Se-OH) et élimine également les peroxydes comme substrat potentiel pour la réaction de Fenton. La [Figure 26](#) décrit les différentes réactions connues de la détoxification des ERO par les enzymes antioxydantes. La superoxyde dismutase convertit le radical-anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui est transformé par la suite en eau par l'enzyme CAT. Ainsi que le peroxyde d'hydrogène peut être transformé en eau grâce à la réaction de H_2O_2 avec la GSH-Px qui oxyde la GSH (glutathion) en GSSG (glutathion oxydé). Néanmoins, la GSSG n'est pas toxique et peut être réduite en GSH par la glutathion réductase et la NADPH [144], [146]. En outre, la catalase convertit le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire et possède l'un des taux de renouvellement les plus élevés connus de l'homme, permettant à une seule molécule de catalase de convertir 6 milliards de molécules de peroxyde d'hydrogène ; et enfin, la superoxyde dismutase convertit les anions superoxyde en peroxyde d'hydrogène comme soustraction pour la catalase [143]. La défense enzymatique secondaire comprend la glutathion réductase et la glucose-6-phosphate déshydrogénase. La glutathion réductase réduit le glutathion (antioxydant) de sa forme oxydée à sa forme réduite, la recyclant ainsi pour continuer à neutraliser davantage de radicaux libres [147]. Le glucose-6-phosphate déshydrogénase régénère le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate - coenzyme utilisé dans les réactions anaboliques) créant un environnement réducteur. Certes, ces deux enzymes ne neutralisent pas directement les radicaux libres, mais ont un rôle de soutien vis-à-vis des autres antioxydants endogènes [135], [136], [148].

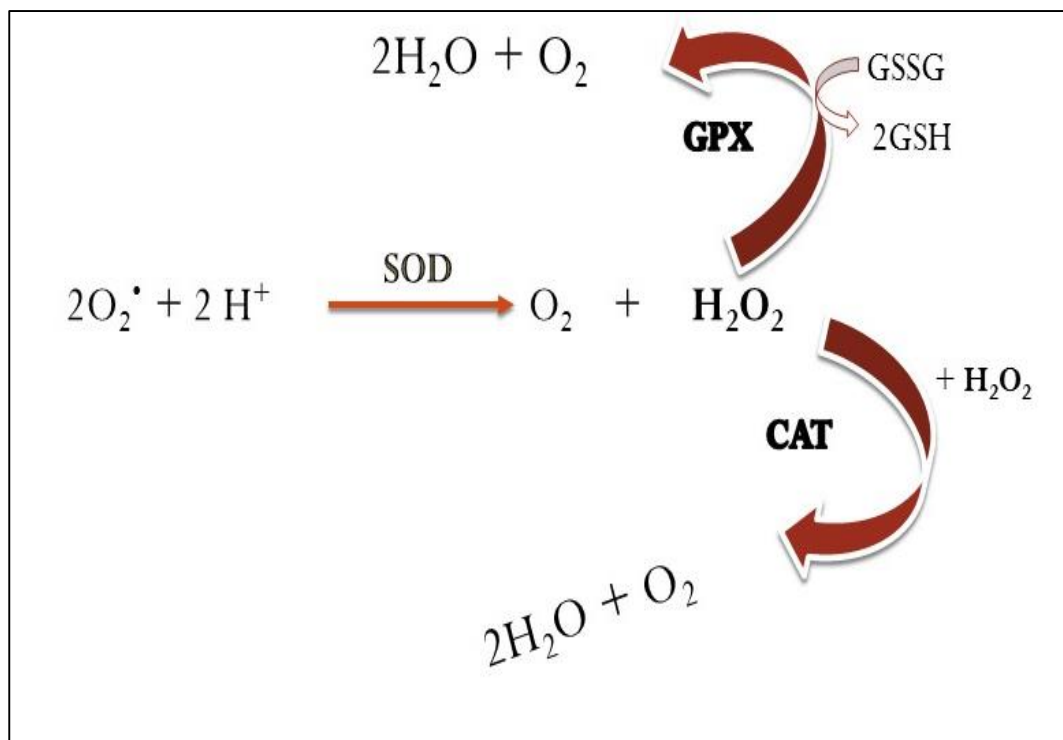


Figure 26 : Les réactions d'inhibition des ROS par les enzymes antioxydants (SOD : superoxyde dismutase, CAT : Catalase, GPX : Glutathion peroxydase).

2.2. Les antioxydants exogènes

Bien que le système antioxydant endogène est extrêmement important pour faire face aux dommages oxydatifs, il n'est pas assez efficace pour éliminer les ERO. Cependant, le renforcement est apporté par des antioxydants dits exogènes et qui sont ramenés par une consommation équilibrée des aliments qui stoppent la production excessive de radicaux libres dans le corps humain. Par ailleurs, ces antioxydants exogènes sont des composés ayant les principales sources : les plantes, les fruits et légumes et sont généralement les acides phénoliques, les flavonoïdes, les vitamines, les caroténoïdes, les minéraux et les composés organosulfurés [86], [140], [148], [149].

3) Le stress oxydatif et les maladies neuropsychiatriques

Différents tissus sont très susceptibles aux dommages oxydatifs, le cerveau est particulièrement le plus vulnérable à ces dommages en raison de niveaux relativement faibles d'antioxydants, de niveaux élevés d'acides gras polyinsaturés, de la teneur élevée en métaux et de la consommation d'oxygène pendant le processus naturel de la respiration [150]. Cependant, il est bien reporté qu'il y a une grande corrélation entre l'augmentation du stress oxydatif et le développement des maladies neuropsychiatriques. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les maladies

neuropsychiatriques sont définies comme étant l'ensemble des « problèmes de santé mentale », qui se caractérisent par des anomalies qui affectent la pensée, les émotions, le comportement et les relations avec les autres personnes de son cercle. Les facteurs à l'origine de ces troubles sont essentiellement d'origine génétiques, sociaux, environnementaux ou liés aux drogues psychotropes [151]. Cependant, plusieurs études ont reporté une dérégulation dans le système antioxydant de la plupart des maladies neuropsychiatriques telles que la dépression, l'anxiété, la schizophrénie, etc. [149], [152–154]. La médecine moderne, utilise des traitements par des molécules synthétiques incluant les neuroleptiques, anxiolytiques, les antidépresseurs pour le traitement des maladies neuropsychiatriques comme la schizophrénie. Ces traitements présentent des effets secondaires graves tels que l'insomnie, obésité, agitation, etc., qui peuvent être dangereuses dans certains cas [155]. Pour toutes ces raisons, la récente hypothèse de la corrélation du SO et des maladies neuropsychiatriques vient remédier à ces inconvénients et suggère l'utilisation des plantes aromatiques et médicinales pour le traitement de ces maladies. De ce fait, plusieurs plantes ont été étudiées pour leurs activités antioxydantes et leurs phytoconstituants liés à un fort effet régulant des troubles neuropsychiatriques. Par exemple, le genre *Chrysanthellum* a été testé pour son activité neurologique, *Ginkgo biloba* pour le traitement de la schizophrénie, *Tamarindus indica* L. pour les troubles mentaux et *Clitoria ternatea* L. a été reportée efficace pour améliorer les troubles cognitifs [156–158].

4) Méthodes d'analyse de l'activité antioxydante

Afin d'avoir une estimation précise de la capacité de réduction et d'inhibition des ERO d'un antioxydant, la méthode de l'évaluation doit être bien adaptée. A cet effet, les méthodes de mesure ou d'analyse de l'activité antioxydante sont classées en deux catégories entre les méthodes basées sur la réaction de transfert d'atomes d'hydrogène (HAT) et les méthodes basées sur la réaction de transfert d'électrons (ET) [145]. Selon ces deux catégories, de multiples méthodes in vitro ont été développées comme la méthode du piégeage des radicaux libres 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) qui est la plus utilisée vu que c'est une méthode simple, rapide et peu coûteuse, le test de réduction du Fer (FRAP), le test de phosphomolybdène (PM) et le test du β -carotène, etc. [159]. Il existe d'autres méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante mais ce ne que ces quatre méthodes qui ont été utilisées dans ce travail.

4.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

Le test de piégeage du radical libre DPPH est basé sur une réaction de transfert d'un atome d'hydrogène. En effet, la molécule 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ([Figure 27](#)) est considérée comme étant un radical libre stable en raison de la délocalisation de l'électron libre

de la molécule, de sorte que la molécule ne se dimérise pas, comme c'est le cas des autres radicaux libres [159]. En outre, le radical libre DPPH en solution d'éthanol ou méthanol est caractérisé par une couleur violette donnant une bande caractéristique autour de 517 nm. Pratiquement, lorsqu'un antioxydant (une molécule ou extrait donneur d'hydrogène) est mélangé avec le radical libre DPPH, celui-ci est réduit à la forme hydrazine clairement observée par un changement de la couleur du violet au jaune en fonction de la concentration et de la capacité de l'antioxydant testé [160–162].

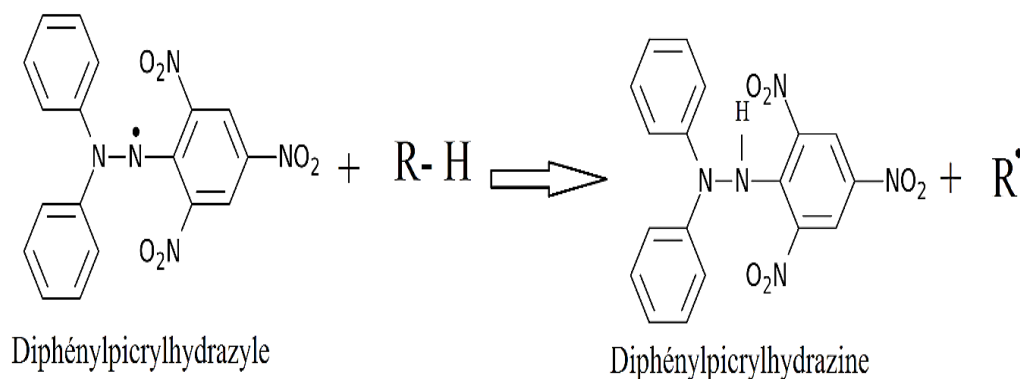
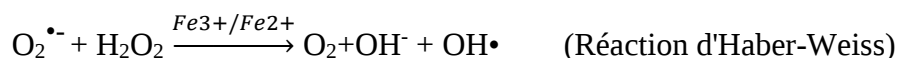


Figure 27 : Réaction de réduction du radical DPPH par un antioxydant (R-H)

4.2. Test de la réduction du fer (FRAP)

Le test de la réduction du Fer (FRAP) est basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en Fer ferreux (Fe^{2+}). Le test FRAP est qualifié d'être un test robuste et potentiellement utile, utilisant des réactifs et du matériel peu coûteux et une réaction rapide applicable sur une large gamme de concentrations. Ce test est basé sur une réaction de transfert d'électrons (ET) dont un donneur d'électrons (antioxydant) réduit le complexe ferrique (Fe^{3+}) à la forme ferreuse (Fe^{2+}) à un faible pH et dont l'absorbance est mesurée à 700 nm avec un spectrophotomètre UV-visible [163]. Il a été initialement appliqué pour mesurer la capacité antioxydante du plasma, cependant il a prouvé son efficacité pour mesurer la capacité antioxydante des extraits et des composés purs aussi des végétaux [164]. Toutefois, il faut noter que les ions ferriques génèrent in vivo le radical hydroxyle par les mécanismes de réaction d'Haber-Weiss et de Fenton. Sachant bien que les radicaux hydroxyles sont des ERO très fortes dans les systèmes biologiques et vu qu'il n'y a pas d'enzyme spécifique pour se défendre contre eux dans les organismes vivants, un considérable intérêt est porté à la recherche des antioxydants naturels qui peuvent complexer les ions du fer et bloquer leurs activités redox

[165]. En conséquence, les flavonoïdes sont bien connus par leurs capacités à séquestrer ces ions métalliques [166].



4.3. Test du phosphomolybdène

Le test du phosphomolybdène (PM) est basé sur la réduction du $\text{Mo}^{(\text{VI})}$ au $\text{Mo}^{(\text{V})}$ par un antioxydant en formant un complexe vert du $\text{Mo}^{(\text{V})}$ à un pH acide. C'est une réaction de transfert d'électrons. Ce test a été reporté par [167], et est réalisé à une température de 95°C générant une auto-oxydation thermique pendant une période d'incubation prolongée formant ainsi le complexe $\text{Mo}(\text{V})$. L'absorbance de la solution aqueuse composé du $\text{Mo}^{(\text{V})}$ est mesurée à 695 nm par rapport au blanc dans un spectrophotomètre UV-visible et la capacité antioxydante de l'échantillon testé peut être exprimée en équivalent d'acide ascorbique. Toutefois, il faudra mentionner que ce test peut être utilisé quel que soit le solvant (miscible ou non miscible tel que l'hexane), une simple agitation peut être appliqué afin de solubiliser la partie réductrice de l'échantillon dans la partie aqueuse permettra de former le complexe vert du $\text{Mo}^{(\text{V})}$ [168].

4.5. Test du β -carotène

La vitamine A, une vitamine essentielle, est impliquée dans plusieurs processus physiologiques tels que la vision, le développement embryonnaire, la différenciation et la fonction du système immunitaire et le métabolisme énergétique. Toutefois, la β -carotène ([Figure 28](#)), appelée aussi « provitamine A » est l'unique enzyme responsable de la formation de cette vitamine dans le foie et les muqueuses de l'intestin grêle [138], [169]. Non seulement une provitamine A, mais la β -carotène est aussi un antioxydant qui a confirmé son potentiel de protéger contre le cancer, les maladies cardiovasculaires, la dégénérescence maculaire ainsi que le vieillissement [170]. Donc, vu l'importance biologique du β -carotène, ce test est classé parmi les méthodes les plus utilisées pour estimer l'activité antioxydante des composés. Pratiquement, le test du β -carotène appelé aussi test de l'inhibition de la peroxydation des lipides, est un test basé sur le pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène qui réagit avec les radicaux libres résultant de l'oxydation de l'acide linoléique [171], [172]. Plus précisément, la méthode consiste à effectuer une émulsion aqueuse de l'acide linoléique et du β -carotène, qui est décolorée par les radicaux générés par l'oxydation spontanée de l'acide linoléique, favorisée par induction thermique, typiquement à 50°C. La quantification est basée sur la variation de la vitesse à laquelle

l'absorbance de la β -carotène diminue (470 nm) en présence de concentrations croissantes de l'antioxydant testé [173].

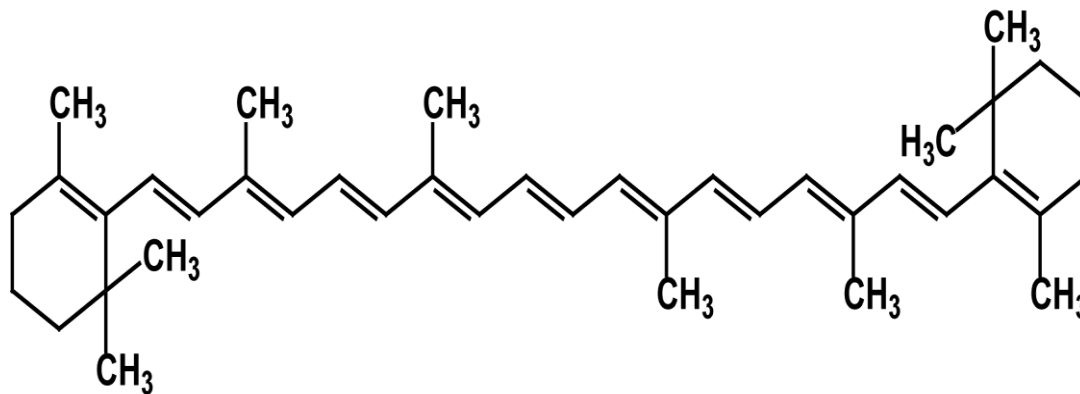


Figure 28 : Structure chimique de la β -carotène [93]

Conclusion

Dans la première partie de ce chapitre nous avons effectué une synthèse bibliographique afin d'éclaircir certaines notions de base sur la filière étudiée ainsi que pour démontrer la richesse et les propriétés bénéfiques des différentes parties de l'arbre du caroubier. En effet, ce travail est consacré principalement à la valorisation de la graine de caroube du fait que les gousses incluant la pulpe sont largement étudiées et valorisées dans différents domaines. Certes, la graine a été aussi sujette à différentes études mais par défaut de perfectionner son utilisation et préserver ses propriétés fonctionnelles et nutritionnelles de toutes les parties de la graine, une nouvelle méthode de décorticage des graines et d'extraction de la gomme de caroube a été élaborée et optimisée. De ce fait, des données bibliographiques vont être détaillées dans les prochains chapitres en fonction des travaux qui ont été réalisés.

Une deuxième partie a été consacrée à la présentation des différentes familles des métabolites secondaires des plantes. La plupart de ces familles sont présentes dans la filière du caroubier et ont une activité antioxydante extrêmement attrayante. Toutefois, les différentes méthodes utilisées pour l'évaluation de l'activité antioxydante surtout celles pratiquées dans ce travail ont été minutieusement exposées.



Chapitre II

Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décorticage des graines de caroube



I. Introduction

La tendance mondiale est actuellement orientée vers l'innovation de procédés dits durables qui optent principalement au développement de produits par des voies biotechnologiques en utilisant des enzymes dans le secteur industriel. Ce concept est défini comme étant l'un des principes de la chimie verte et c'est dans ce cadre que notre innovation est inscrite. Dans le présent chapitre nous allons évoquer les étapes réalisées pour la mise en place d'un nouveau procédé de décortilage des graines de caroube en utilisant un prétraitement par hydrolyse enzymatique. En effet, initialement nous allons présenter les différentes méthodes existantes de décortilage de la graine de caroube, on décrira ensuite le nouveau procédé élaboré pour l'extraction de la gomme de caroube à partir des graines de caroube broyées et la méthode innovée pour le décortilage de la graine de caroube entière. En 1987, le premier procédé destiné au décortilage des graines dures dont les graines de caroube a été publié par (Vacher, 1987) [174]. Ce brevet consiste à irradier les graines dans un four alimenté par rayonnement infrarouge. En 2008, la publication de (Patrick Aubin Dakia et *al.*, 2008) [56] a reporté deux méthodes simples et moins coûteuses de décortilage des graines de caroube spécifiquement : la méthode chimique avec l'acide sulfurique (Ac) et la méthode thermique d'eau bouillante. Le but général de l'utilisation de ces prétraitements est la récupération de la gomme de caroube avec une qualité et quantité supérieure vu que la qualité, la composition et le rendement de la gomme de caroube sont étroitement liés à la méthode d'extraction employée. Par conséquent, il faut mentionner que chaque prétraitement de l'ensemble des méthodes d'extraction de la GC réalisées jusqu'à ce jour présentent des inconvénients écologiques et même économiques. Le développement d'une nouvelle méthode innovante obviant à tous les inconvénients posés est plus que nécessaire. Un schéma général décrivant les étapes de récupération de la GC sont présentées sur la [Figure 29](#).

Les étapes générales de décortilage des graines de caroube seront évoquées en premier lieu et en deuxième lieu nous allons présenter la nouvelle méthode innovée. Le nouveau procédé a été utilisé en première partie sur les graines entières et donc c'est un procédé de décortilage de la gomme de caroube et non d'extraction de la gomme seulement. Dans la deuxième partie, le procédé a été réalisé sur la graine broyée permettant principalement d'extraire la gomme de caroube. Les détails sur la méthode enzymatique et sur la détermination des facteurs influençant la réaction d'hydrolyse enzymatique des graines broyées ainsi que la méthodologie poursuivie pour réaliser le prétraitement sur les graines broyées ont été déterminées et optimisées par la

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

méthodologie de plan d'expériences par surface de réponses. Ainsi, un aperçu sur les plans d'expériences sera présenté dans cette partie avec les différentes étapes réalisées pour réussir l'optimisation avec la présente méthodologie sans oublier la présentation de la méthode d'hydrolyse enzymatique avec les différents facteurs influençant.

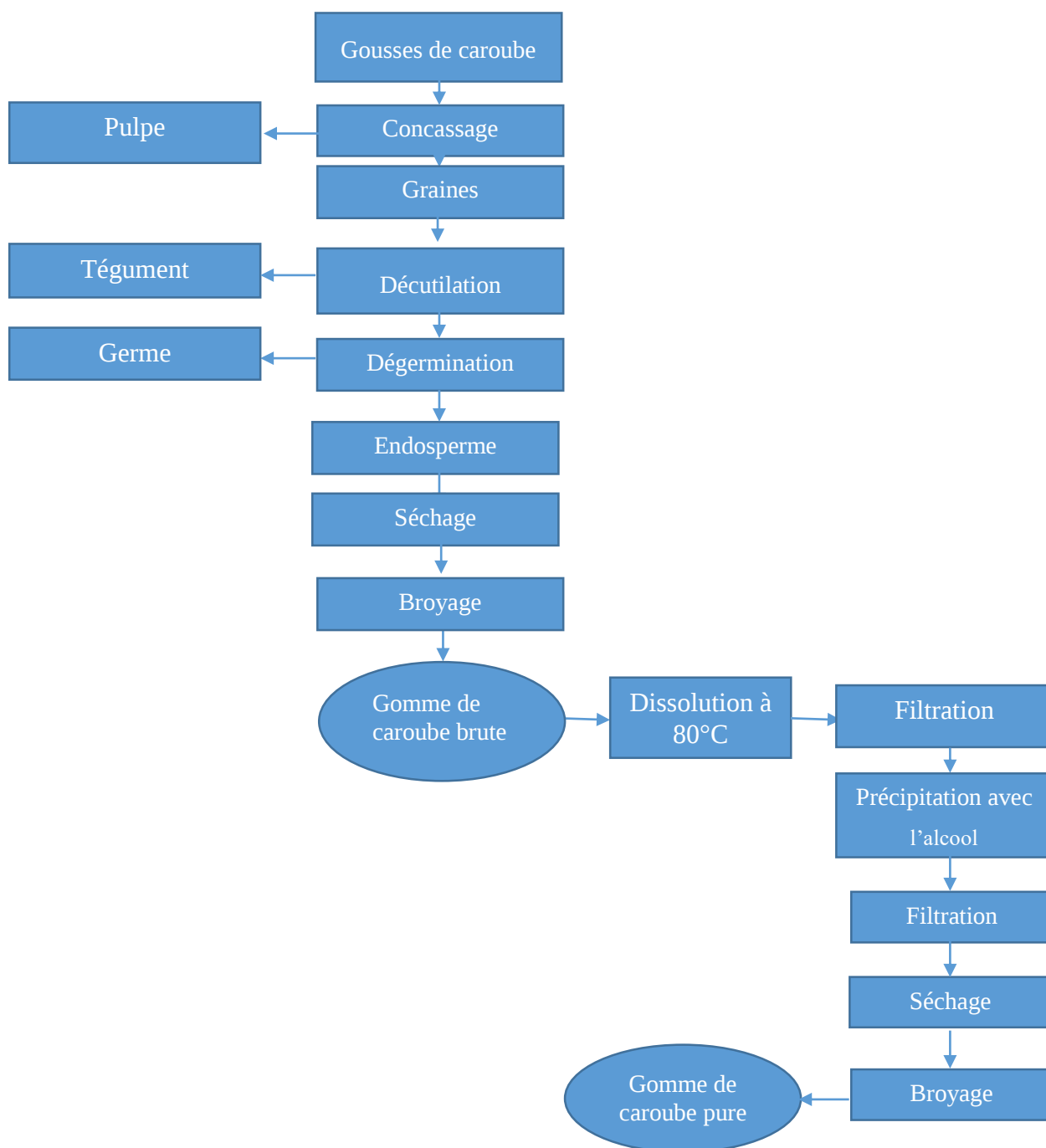


Figure 29 : Schéma du processus d'extraction et de purification de la gomme de caroube [77]
- Process of extraction and solubilisation of the Locust bean gum.

II. Les étapes d'extraction de la gomme de caroube

1. La décultation

C'est l'étape essentielle du procédé d'extraction de la GC et du germe. Cette première étape de prétraitement des graines de caroube vise la séparation ou l'élimination du tégument dur du reste de la graine. Pour cela différentes méthodes de prétraitement des graines ont été développées. Notamment, la méthode mécanique, la méthode chimique, la méthode thermique et une récente méthode par cuisson thermique.

1.1.Méthode mécanique

La méthode mécanique consiste à effectuer un prétraitement thermique par irradiation au moyen d'un rayonnement infrarouge d'une intensité d'au moins 100 Kw/m² dans un four tunnel dans lequel circule un tapis roulant alimenté en graines dures [174]. L'irradiation infrarouge des graines de caroube pendant un certain temps provoque un effet thermique brutal sur l'enveloppe permettant d'établir à l'intérieur de la graine un gradient de température qui entraîne une dilatation différentielle de ses constituants et qui facilite leur séparation ultérieure. Les graines sont par la suite recueillies dans une trémie puis elles sont soumises à un décortilage mécanique selon des moyens connus en soi, soit de suite, soit après une durée de stockage plus ou moins prolongée. Ce procédé présente l'avantage de renoncer à l'utilisation des produits chimiques et de récupérer une fraction d'endosperme de bonne qualité. Par contre, ce procédé demande un équipement spécial et très onéreux.

1.2. Méthode chimique

La méthode chimique de décortilage des graines de caroube a été introduite depuis 1935 par (Ruter et al) [175] et puis optimisée en 2008 par (Patrick Aubin Dakia) [56]. Cette méthode chimique optimisée consiste à carboniser le tégument des graines de caroube en utilisant un acide tel que l'acide sulfurique (le plus utilisé) à 60% ou l'acide chlorhydrique (rarement utilisé) à 60 °C pendant une heure [56,176]. Le tégument carbonisé est ensuite éliminé par un lavage avec l'eau. Ainsi, les autres parties de la graine de caroubes (endosperme et germe) sont récupérées et immergées dans l'eau distillée une nuit afin de faciliter la séparation du germe de l'endosperme. L'étape suivante consiste à séparer manuellement les deux parties par une spatule. Le germe et l'endosperme sont ainsi séchés à 103 ± 2°C puis broyés et stockés pour

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

usage ultérieur. Bien que cette méthode donne une gomme blanche et de haute viscosité, mais l'attaque acide altère partiellement la qualité chimique et physique de l'endosperme.

1.3.Méthode thermique

La méthode par trempage consiste en l'immersion des graines de caroube entières dans l'eau bouillante pendant une heure (100 g de graines dans 800 mL d'eau bouillante), la graine se gonfle et le tégument devient facile à détacher du reste de la graine. Le tégument est séparé de l'endosperme manuellement à l'aide d'une spatule [56]. Les trois parties de la graine de caroube sont récupérées, séchées à $103 \pm 2^{\circ}\text{C}$, broyées et stockées à 4°C . Bien que le rendement en GC est élevée, cette méthode consomme de l'énergie et la GC obtenue est d'une faible qualité.

1.4.Méthode par cuisson thermique

Cette méthode est la plus récente des méthodes de valorisation des graines de caroube. En effet, c'est un procédé qui consiste à effectuer un traitement hydraulique des graines de caroube en autoclave sous pression de 4,5 bars et à température de 100°C pendant une durée de deux à quatre heures. Le tégument des graines est facilement épluché grâce à une grille métallique munie d'une presse rotatoire en inox. Les graines de caroube décortiquées, subissent un frottement mécanique sous agitation des deux composants de la graine : le germe et l'endosperme. Ainsi, après récupération de l'endosperme, ce dernier subit un blanchiment par l'eau oxygénée pendant 24 h [177]. Bien que ce procédé soit écologique, les hautes températures employées altèrent l'endosperme ainsi que le blanchiment par l'eau oxygénée ne permet pas de conserver la GC pour une longue durée de stockage.

Dans notre laboratoire, nous avons réalisé les deux méthodes de prétraitement les plus utilisées : la méthode chimique avec l'acide sulfurique et la méthode thermique avec l'eau bouillante. Dans ce sens nous avons réalisé des essais d'optimisation sur les deux méthodes. Pour la méthode chimique, nous avons varié la concentration d'acide sulfurique de (20 à 50%) en fonction du temps, mais il s'est avéré que 60% est la concentration la plus convenable. Pour la méthode de décortiquage avec l'eau bouillante, nous avons effectué plusieurs essais du blanchiment de la gomme de caroube brute obtenue. Certes, les résultats ont été satisfaisant avec un blanchiment avec l'eau oxygénée mais pas pour une longue durée de stockage. De ce fait, nous avons opté pour l'élaboration d'un nouveau procédé biologique et écologique.

2. Etape de dégermination

Cette étape consiste à séparer l'endosperme du germe. Ce dernier est soit récupéré en broyant les deux fractions de la graine (l'endosperme et le germe). Après, avec un simple tamisage l'endosperme est récupéré et broyé en fines particules pour obtenir la gomme de caroube et puis le germe pour obtenir ce qu'on appelle la farine du germe de caroube. Une deuxième méthode peut être appliquée consiste à séparer manuellement l'endosperme du germe à l'aide d'une spatule [78]. Ainsi chaque partie extraite séparément est séchée, broyée puis stockée pour usage ultérieur.

3. Etape de purification

Après extraction de la gomme de caroube brute, d'autres étapes peuvent être effectuées afin d'éliminer les impuretés qui sont essentiellement la cellulose, la lignine et les lipides, ainsi que pour diminuer considérablement les quantités de minéraux et de protéines [178,179]. Cette étape est appelée : étape de purification ou de clarification. Cette dernière consiste à disperser la poudre de gomme brute dans l'eau puis la solubiliser à 80°C/30 min avec agitation. Il faut noter par conséquent que plus la température est élevée plus la solubilisation augmente (matière solubilisée) et plus le rendement en GC est meilleur. La solution de GC est ensuite centrifugée et puis le surnageant est récupéré. En outre, la GC solubilisée est récupérée par précipitation dans l'isopropanol ou l'éthanol. La précipitation avec l'éthanol a été révélée être mieux relativement au taux des impuretés persistants dans la gomme de caroube purifiée [69]. Finalement, la GC dite purifiée ou clarifiée est obtenue après filtration, séchage et broyage [76].

III. Hydrolyse enzymatique des graines de caroube

1. Principe de la méthode d'hydrolyse enzymatique

Le principe d'hydrolyse enzymatique date de la seconde guerre mondiale lorsqu'un champignon a hydrolysé des vêtements et des équipements en coton. Depuis lors, *Trichoderma reesei* a été découvert et s'est avéré produire des enzymes : les cellulases [180]. En effet, l'hydrolyse enzymatique est devenue aujourd'hui l'une des technologies les plus étudiées et les plus utilisées surtout dans le domaine de production des biocarburants et en particulier l'éthanol. Par conséquent la production d'éthanol implique deux étapes principales : l'hydrolyse enzymatique et la fermentation. Les enzymes cellulases dans ce cas sont utilisées pour convertir la biomasse cellulosique en sucres réducteurs fermentables. Pour ce faire, plusieurs facteurs interviennent dans cette conversion comme la nature du substrat, la structure cristalline

complexe, l'efficacité de l'enzyme, interaction enzyme-substrat, etc. [180]. Dans notre cas, nous nous sommes focalisés sur l'effet des cellulases dans la dégradation de la cellulose constituant les téguments des graines de caroube. Donc, le principe général de la présente méthode repose essentiellement sur l'hydrolyse de la cellulose formant la structure des téguments de graines de caroube en sucres réducteurs fermentables (glucose). Toutefois, la cellulose peut être hydrolysée en monomères de glucose en utilisant des catalyseurs chimiques (communément utilisés avec un acide fort) ou biologiques (par des enzymes) [181]. Certes, vu les multiples inconvénients de la méthode chimique, l'hydrolyse enzymatique répond à ces limitations et présente plusieurs avantages écologiques et économiques.

2. Enzymes utilisées

Outre la cellulase par *Trichoderma reesei*, divers mécanismes ont été étudiés en utilisant d'autres organismes pour dégrader la biomasse cellulosique. Cependant, les seuls organismes employant trois actions couplées pour dégrader la cellulose sont les enzymes cellulases. Le choix des cellulases repose justement sur cette action et sur l'efficacité et la vitesse d'atteindre l'objectif voulu qui est l'hydrolyse de la cellulose et la réduction de la dureté des téguments en les rendant facile à séparer des autres parties de la graine. En outre, les pectinases par *Aspergillus aculeatus* ont été aussi utilisées considérant la composition des téguments. Or après plusieurs essais, l'utilisation des pectinases seules n'était pas efficace. Par conséquent, l'utilisation des cellulases en synergie avec les pectinases permettaient d'avoir de bons résultats mais avec l'augmentation des concentrations des cellulases/pectinases.

2.1. Cellulase de *T. reesei*

Les cellulases les plus étudiées sont celles produites par les champignons et notamment ceux de *Trichoderma reesei* [182–184]. L'intérêt porté à ce microorganisme est lié surtout à sa stabilité et sa résistance aux inhibiteurs et à son efficacité de dégradation de la biomasse cellulosique [185]. La synergie est un phénomène très important observé dans la dégradation de la cellulose et l'activité synergique du mélange de quatre à six enzymes peut être jusqu'à 15 fois plus que celle d'une seule enzyme [186]. Différents types de synergie ont été étudiés parmi différentes enzymes dont les plus utilisées : synergie (1) endo-cellulases (EC 3.2.1.4), (2) exo-cellulases ou cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91), (3) β -glucosidase (EC 3.2.1.21) [187]. Cette synergie peut être simplement comprise en considérant que ces différents enzymes attaquent différentes régions de la cellulose et produisent des sites catalytiques les uns pour les autres. Les endo-glucanases agissent de manière aléatoire pour produire de nouvelles extrémités de

chaîne pour l'exo-cellulase, et l'exo-cellulase hydrolyse les chaînes de glucose de manière processuelle et ramène les chaînes inférieures à la surface pour une action enzymatique endo-glucanase [181]. La synergie exo- β -glucosidase se manifeste en raison du fort effet inhibiteur de la cellobiose, principal produit de l'action de l'exo-cellulase sur la cellulose. La β -glucosidase convertit la cellobiose en glucose de manière très efficace et évite cet effet d'inhibition qui entraîne un fort rendement en sucre et une forte synergie.

3. Facteurs influençant l'hydrolyse enzymatique

En général, l'hydrolyse enzymatique de cellulose est effectuée en deux étapes. Dans la première étape, les longues chaînes sont découpées en des courts oligomères solubles (chaînes de moins de sept molécules de glucose), qui sont hydrolysées en monomères de sucre dans la solution au cours de la deuxième étape d'hydrolyse. La première étape de l'hydrolyse est considérée comme étant l'étape limitante du processus global [181,187]. Cependant, plusieurs facteurs sont responsables de la diminution du taux d'hydrolyse au cours de la deuxième étape. Ces facteurs influant l'efficacité de l'hydrolyse peuvent être classés en trois groupes principaux : la composition chimique de la biomasse, la nature des enzymes, les interactions enzyme + substrat. En plus de la composition du substrat (pourcentage de cellulose, hémicellulose, lignine), les propriétés physiques telles que la cristallinité, degré de polymérisation et l'accessibilité au substrat impacte l'accessibilité des enzymes à la cellulose [184,188].

3.1. Structure du substrat

La cristallinité est connue comme étant le facteur clé influençant l'hydrolyse enzymatique de la cellulose [181]. En effet, les enzymes sont moins accessibles dans les régions cristallines que dans les régions amorphes [189,190]. Par contre, d'autres études ont montré que le degré de polymérisation est plus influençant que la cristallinité et cela revient à ce que le taux d'hydrolyse enzymatique est initialement lié à l'interaction entre l'enzyme et les fibrilles constituant la surface de la cellulose. Effectivement, [189] a confirmé que le degré de polymérisation surtout pour les exo-cellulases joue un rôle important dans l'hydrolyse, étant donné que les exo-cellulases agissent dans l'extrémité de la chaîne. Donc plus la chaîne est longue avec un degré de polymérisation élevée, plus il va y avoir peut d'extrémités donnant moins de sites accessibles aux exo-cellulases et entraînant par la suite la diminution du taux d'hydrolyse. Un autre facteur aussi à prendre en considération, la lignine. Effectivement, des études ont montré que la lignine influence négativement le taux de l'hydrolyse enzymatique du substrat lignocellulosique, cela revient à ce que la lignine se comporte comme une barrière

empêchant l'accessibilité à la cellulose. En outre, une étape de délignification peut avoir lieu mais les inconvénients de cette dernière peuvent influencer la réaction d'hydrolyse de la cellulase. Par exemple, lors de la délignification les résidus de la lignine bloquent l'avancement de la cellulase dans la chaîne de cellulose [65].

3.2. La nature des enzymes

Malgré la grande variété de bactéries et de champignons qui produisent des enzymes cellulosiques capables d'hydrolyser la cellulose [186], peu d'espèces produisent des taux élevés de cellulase extracellulaire capables de solubiliser la cellulose cristalline de manière extensive [180]. En effet, les cellulases d'origine fongique sont les plus industriellement utilisées, et cela revient essentiellement à l'efficacité de la sécrétion de ces enzymes. Particulièrement, les microorganismes du genre *Trichoderma* produisent des quantités relativement importantes d'endo- β -glucanase et d'exo- β -glucanase, mais de faibles taux de β -glucosidase, alors que ceux du genre *Aspergillus* produisent des quantités relativement importantes d'endo- β -glucanase et β -glucosidase mais un faible taux de production d'exo- β -glucanase [183].

Bien que les cellulases de *T. reesei* soient largement disponibles et sont commercialisées par Celluclast 1,5 L de Novozymes et Genencor International's Spezyme, pour diverses applications (les détergents et les industries textiles), leurs prix d'achat sont onéreux. En effet, des solutions peuvent être utilisées afin de réduire le coût, par exemple en adaptant des approches convenables pour la production d'enzymes et de mélanges d'enzymes plus efficaces et l'utilisation de substrats lignocellulosiques peu coûteux pour la production de l'enzyme [191]. Par conséquent, malgré que *Trichoderma reesei* soit l'un des systèmes cellulosiques fongiques les mieux étudiés [192], le procédé détaillé de l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique par les enzymes *Trichoderma reesei* n'a pas été complètement élucidé. En présence de cellulose disponible, *Trichoderma reesei* sécrète un large spectre d'activités enzymatiques cellulosiques, notamment les cellobiohydrolases (CBH) et les endo-1,4-glucanases (EG). En outre, il sécrète plus de 30 autres composants enzymatiques mineurs encore inconnus et qui pourraient jouer un rôle important pour faciliter la décomposition des substrats cellulosiques cristallins.

3.3. Interaction Enzyme-Substrat

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose repose sur le contact de l'enzyme soluble avec un substrat insoluble. Il faut bien prendre en compte que l'hydrolyse de la cellulose est un phénomène de surface basé sur un système complexe et hétérogène entre enzyme-substrat [180]. Avant la réaction d'hydrolyse, l'enzyme doit être liée au substrat par l'adsorption du

biocatalyseur par le substrat insoluble [193]. La sensibilité de la cellulose à l'hydrolyse enzymatique est largement déterminée par l'accessibilité des sites de liaison à l'enzyme qui détermine l'adsorption ultérieure de l'enzyme sur le substrat solide.

Généralement, l'hydrolyse est considérée comme un processus lent car la structure cristalline de la cellulose et le nombre de sites de liaison actifs disponibles sont limités. La plupart des cellulases fongiques sont des protéines modulaires contenant un domaine catalytique (DC) et un module de liaison aux glucides (MLG) [194,195]. Ces modules dans la plupart des cellulases fongiques sont situés aux deux extrémités du domaine catalytique et sont connectés à celui-ci par un lien souvent fortement glycosylés [196]. L'efficacité de la cellulase est renforcée par la présence de MLG et ce dernier est clairement corrélé avec une meilleure activité hydrolytique vis-à-vis de la cellulose insoluble [197]. Les MLG permettent aux cellulases d'agir sur la cellulose cristalline en déstabilisant les liaisons hydrogènes de la structure de la cellulose, ce qui rend les chaînes polysaccharidiques plus accessibles au domaine catalytique [198]. Ce n'est que par la coopération avec des modules de liaison spécifiques non catalytiques que les enzymes sont capables de perturber la surface des cristaux au niveau de l'interphase solide-liquide, afin de rendre des fibres de cellulose uniques accessibles à l'hydrolyse. En général, il est connu qu'un MLG dans une molécule de cellulase améliore l'activité hydrolytique d'un domaine catalytique adjacent au MLG en augmentant la concentration d'enzyme à la surface d'un substrat insoluble [199] ou en fournissant le catalyseur avec un substrat plus facilement dégradable, à savoir la cellulose amorphe [197,200].

4. Activité enzymatique

La performance des enzymes (pures et mixtes) est mesurée sur la base de leurs activités [201]. Le terme "Unité" (U) est largement utilisé pour définir l'activité des enzymes. En général, l'unité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer l'équivalent d'une micromole de sucres réducteurs par minute dans des conditions environnementales contrôlées (température, pH, charge de substrat, etc.). Cette activité est convertie en unités par masse pour les enzymes pures (généralement U/mg d'enzymes). L'activité (unités/mg) d'une enzyme est spécifique à un substrat et est indiquée en termes d'activité spécifique à un substrat. Pour les enzymes mixtes, l'activité est définie en (U/mL) du mélange.

IV. Optimisation de l'hydrolyse enzymatique des graines entières

Dans cette section nous allons présenter la méthode suivie pour la mise en place d'une nouvelle méthode de décortilage des graines de caroube par hydrolyse enzymatique. Le but de la méthode d'hydrolyse enzymatique est le décortilage de la graine de caroube pour l'extraction des trois parties de la graine à savoir le tégument, l'endosperme et le germe. Les procédés classiques veillent sur le principe d'extraction de la gomme de caroube en un minimum d'étapes sans tenir compte de l'utilité des autres parties de la graine et surtout celle du tégument.

L'idée principale de cette étude est d'utiliser les enzymes cellulases pour hydrolyser la cellulose de la graine de caroube, rendant le tégument fragile, facile à détacher et à valoriser. Les paramètres étudiés ont été optimisés en utilisant la méthode classique de la variation d'un seul facteur à la fois, en maintenant les autres facteurs constants. Les facteurs choisis sont : le pH, la concentration d'enzyme et la charge du substrat. Ces paramètres ont été contrôlés en variant le temps de traitement. Il faut noter que la température a été fixée à une température moyenne de $T = 50^{\circ}\text{C}$ afin de garder l'intégralité structurale de toutes les parties de la graine pendant tout le temps du prétraitement. Les expériences de la réaction d'hydrolyse ont été effectuées dans l'étuve. Toutefois, en raison des différents avantages du bain ultrason, nous avons continué les expériences dans celui-ci.

1. Matériel et méthodes

a. Matériel végétal

Les graines de caroube sont collectées du Nord et Sud du Maroc et ont été utilisées sans aucun prétraitement initial et sans tenir compte de la taille des graines.

b. Enzyme cellulase

L'enzyme utilisée est cellulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (product from Denmark) et fourni par @ Sigma-Aldrich codé C2730. La densité de la solution aqueuse jaunâtre d'enzyme cellulase est de 1,2 g / mL à 25°C . La solution aqueuse a une activité de 700 Unités/G.

c. Mesure des sucres réducteurs

La mesure des sucres réducteurs a été réalisée suivant la méthode de DNS (acide dinitrosalicylique) [201]. Un réactif avec la DNS a été préparé (annexe 1). On place dans un tube un mélange de substrat-DNS équivalent à une dilution 1 :2. Les tubes sont ensuite placés à 100°C durant 10 minutes, puis refroidis dans un bain glacé pour suspendre la réaction.

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

L'absorbance est mesurée à 540 nm. Pour traduire les valeurs d'absorbance en concentration de sucres réducteurs (exprimée en g/L), il faut utiliser une courbe de calibrage. Celle-ci se prépare avec une solution de D (+) glucose, donc la linéarité est bonne entre 0,2 g/L et 1 g/L (coefficient de corrélation de 0,99). L'équation établie de la droite de la courbe standard du glucose est : $y = 2,7096x + 0,0433$; $R^2 = 0,9959$.

d. Traitement dans un bain ultrason

L'objectif de l'utilisation d'un bain ultrason, est de réduire la durée de traitement et de faciliter le détachement des différentes parties de la graine. Appareil utilisé : Branson Ultrasonic modèle SM35E-DTH, Danbury, USA. Au cours de l'hydrolyse enzymatique, les flacons du mélange (graines + enzyme) ont été placés dans le bain ultrason à une température de 50°C pendant 30 min à 3 h de traitement. Chaque 30min, un volume de 1 mL du mélange hydrolysé liquide a été placé dans un tube contenant la DNS afin de mesurer le taux de sucres réducteurs produit.

e. Paramètres de l'optimisation de l'HE des graines entières

L'hydrolyse des graines de caroube a été réalisée dans des flacons en verres avec bouchons de 100 mL. L'enzyme cellulase a été diluée dans un tampon citrate fraîchement préparé à des pH variés. Les graines de caroube ont été placées ensuite dans les flacons appropriés avec le volume dilué de l'enzyme dans l'étuve à une température fixée de 50 °C.

✓ Variation du pH

Le pH est l'un des facteurs primordiaux pour l'activation de l'enzyme, c'est pourquoi nous avons varié le pH de l'enzyme de 4,6 à 5,6 durant cette optimisation. La durée de traitement était prolongée à plus de 24 h dans une étuve de type (Binder - Classic.Line FD 23) à 50°C. Le suivi de l'hydrolyse a été évalué en mesurant le taux des sucres réducteurs par la méthode DNS ainsi que par rapport à la facilité de détacher le tégument des graines. Nous avons utilisé pour le suivi du pH des masses de 1 g de graines de caroube et la concentration de cellulase a été fixée à 1 U/mL.

✓ Variation de la concentration d'enzyme

Différents volumes d'enzyme cellulase diluées ont été appliqués pour déterminer le volume et la concentration d'enzyme adaptés avec une charge de substrat fixée à 5g. Une gamme de

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortilage des graines de caroube

concentration a été réalisée de 1U à 10U dilué dans le tampon Na-citrate. La température a été fixée à 50°C et le pH adéquat a été fixé en se basant sur les résultats précédents de la variation du pH.

f. Analyse par microscope électronique à balayage MEB

Le microscope électronique à balayage (MEB) permet l'analyse de surfaces des matériaux solides. Le MEB fournit des images de la surface en relation avec le mode de diffusion des électrons par l'échantillon. Cette méthode a été réalisée sur les graines de caroube avant et après traitement avec la cellulase afin de déterminer les changements repérés suite à l'hydrolyse enzymatique de la cellulose sur la surface des graines de caroube. Cette étude a été effectuée au Centre Universitaire Régionale d'Interface (CURI) de Fès, par un Microscope Electronique à Balayage de type QUANTA 200 FEI, équipé d'une sonde EDAX.

g. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier – FTIR

C'est une technique spectroscopique des plus utilisées pour déterminer les groupements fonctionnels des molécules organiques et inorganiques. Par conséquent, c'est une méthode spectroscopique simple (nécessitant une quantité minimale des échantillons), rapide, peu coûteuse et non destructive. Cette technique a été utilisée précédemment pour identifier les groupements fonctionnels de la gomme de caroube commerciale ainsi que du galactomannane (gomme de caroube purifiée). De ce fait, les groupes fonctionnels de la gomme de caroube obtenue par hydrolyse enzymatique des graines de caroube en entier ont été analysés par FTIR dans le domaine des fréquences compris entre 4000 et 400 cm^{-1} . Le spectre obtenu a été comparé avec celui déjà publié de la gomme commerciale. L'analyse FTIR (VERTEX 70 – BRUKER) a été effectuée au centre CURI de Fès, Maroc.

h. Test de solubilité de la gomme

Les gommes obtenues par hydrolyse enzymatique et par procédé chimique ont été préparées à une concentration de 0,1% (p/p) sur une base de poids sec à la température ambiante (23 à 25°C) pendant 0,5 ; 1 ; 2 et 3 h sous agitation. D'autres préparations ont été faites dans les mêmes conditions mais à 80°C pendant 5, 10, 30 et 60 min. Ensuite, la solution correspondante a été prélevée et centrifugée 6000 rpm pendant 30 min pour éliminer le matériel insoluble. Le surnageant est récupéré et les concentrations finales en polymère sont déterminées en tant que matières solides totales séchées à 105°C. Le pourcentage de solubilité est calculé comme suit :

$$(\%) \text{ solubilité} = \frac{\text{concentration du surnageant } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}{\text{Concentration initiale } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)} \times 100$$

2. Résultats de l'optimisation des graines entières

2.1. Effet du pH

Le pH du traitement enzymatique des graines de caroube entières a été optimisé en fonction du temps de traitement à 50°C. Cependant, il faut mentionner que le suivi de l'effet du pH et de la concentration d'enzyme a été effectué dans l'étuve en fonction du temps. La charge de substrat et la concentration d'enzyme ont été fixées au seuil minimum pour contrôler la réaction d'hydrolyse. La [Figure 30](#) reporte la variation du pH de la réaction d'hydrolyse durant 24h.

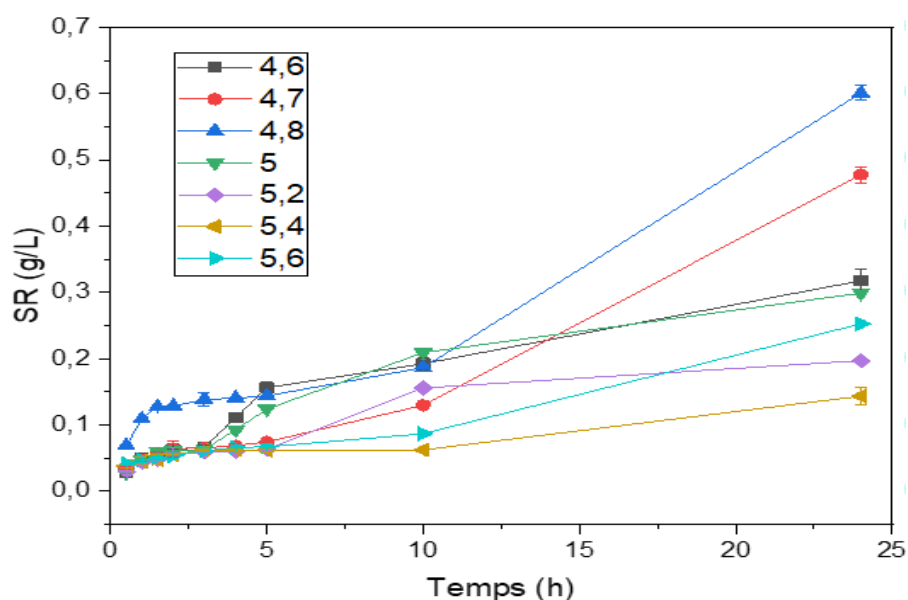


Figure 30 : Effet du pH sur le taux de sucres réducteurs produits pour l'hydrolyse de 1g de graines pour 1U d'enzyme à 50°C.

Le suivi de l'effet du pH a été non seulement évalué par le taux de sucres réducteurs mais aussi avec la facilité de détachement des téguments de graines de caroube. Donc, chaque demi-heure, la quantité de sucres réducteurs a été estimée par la méthode de DNS ainsi qu'une vérification manuelle du décortiquage des graines a été réalisée. Le taux des sucres réducteurs au bout de 48h a été constant à 1,78 g/L et n'était mesurable que pour certains pH de 4,6 à 5. Toutefois, au bout de 24 h avec le pH de 4,8 toutes les graines ont été faciles à décortiquer ce qui n'étaient pas possible avec la totalité des graines des autres pH. Pour cette raison, le pH 4,8 a été sélectionné comme le pH optimum pour l'hydrolyse enzymatique des graines de caroube entières. Certes, d'autres études, ont reporté l'adéquation du pH=5,0 ou plus pour l'hydrolyse enzymatique avec

des enzymes cellulases, mais la plupart des études d'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique par la cellulase applique un pH de 4,8 conformément à ce que nous avons trouvé [62,202,203]. Par ailleurs, la réaction a été réalisée au bout de 48 h, cependant au bout de 24 h avec le pH de 4,8 toutes les graines ont été faciles à décortiquer de ce fait, nous n'avons continué le traitement que pour les autres pH dont on a remarqué une détérioration de la texture des graines.

2.2. Effet de la concentration d'enzyme

Différentes concentrations de cellulase de *Trichoderma reesei* ont été évaluées. La dilution de l'enzyme cellulase est faite dans un tampon Na-citrate à pH 4,8. La [Figure 31](#) reporte l'effet de la concentration d'enzyme sur le taux de production de sucre réducteurs. 5 g de graines de caroube ont été suffisants pour estimer l'effet de la concentration d'enzyme sur l'hydrolyse de la cellulose des graines de caroube. En plus de trouver la concentration d'enzyme à appliquer, cette étude a permis d'analyser le rapport substrat/enzyme.

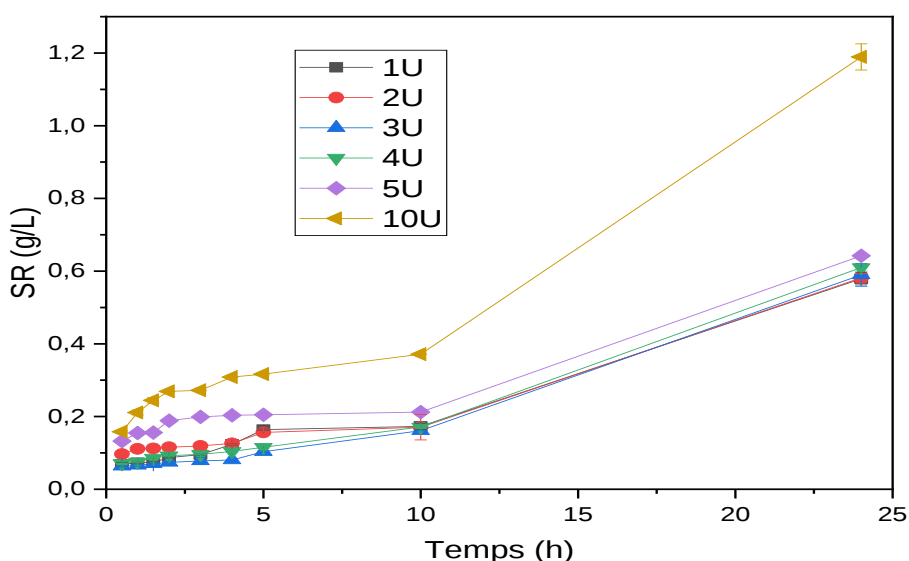


Figure 31 : Effet de la concentration d'enzyme sur le taux de sucres réducteurs produits de l'hydrolyse enzymatique des graines de caroubes entières

Effectivement au cours de cette étude nous avons remarqué que plus la concentration en enzyme augmente et le temps de traitement est long, plus la quantité des sucres réducteurs est élevée. Au bout de 24 h de traitement à 50°C la quantité en sucres réducteurs a doublé pour toutes les concentrations d'enzyme cellulase. Cependant, les résultats ont été plus satisfaisants à partir d'une concentration de 5 jusqu'à 10U. Par conséquent, nous sommes bien d'accord que pour hydrolyser tout le substrat disponible, nous avons besoin d'une durée de traitement plus longue surtout que ce traitement est réalisé sans agitation préalable pour faciliter et améliorer le

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

rendement en sucres réducteurs. Ceci peut avoir une signification si on voulait valoriser les sucres réducteurs produits, mais le but de cette étude est le décortiquage des graines de caroubes/ détachement des téguments. Par ailleurs, au bout de 4 h pour les concentrations de 5 et 10 U, les graines commençaient à se décortiquer mais ce n'est que juste après 10 h de traitement que toutes les graines ont été décortiquées. La conclusion de ce suivi est pour un décortiquage total de 5 g de graines de caroube nous avons besoin d'une concentration de 5U à 10U à un pH de 4,8 durant 10 h de traitement. Toutefois, pour obvier à la longue durée de traitement, nous avons opté pour la réalisation des essais dans un bain ultrason.

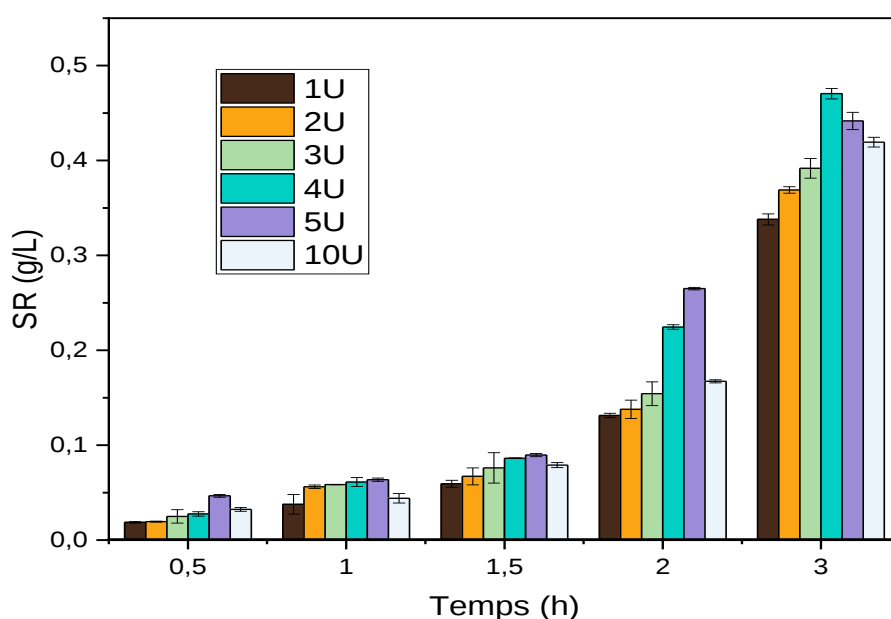


Figure 32 : Effet de la concentration d'enzyme sur l'hydrolyse enzymatique des graines de caroubes dans un bain ultrason avec $P = 20\%$, $pH = 4,8$ et $T^\circ = 50^\circ C$.

Les avantages du bain ultrason sont plusieurs mais les plus importants sont : la présence des vibrations à hautes fréquences qui libèrent de l'énergie permettant de détacher les différentes parties de la graine et le maintien de la température nécessaire pour la réaction d'hydrolyse enzymatique. En pratique, les mêmes conditions du suivi de l'effet de la concentration d'enzyme dans l'étuve sur le décortiquage de la graine de caroube ont été réalisées dans un bain ultrason. La température a été fixée à $50^\circ C$, la puissance a été réglée sur $P = 20\%$ et le pH à 4,8. Nous remarquons d'après la [Figure 32](#) que le temps du suivi de l'hydrolyse dans un bain ultrason a été réduit à juste 3 h au lieu de 24 h dans l'étuve. En effet, au bout de 3 heures toutes les concentrations ont permis de décortiquer les graines de caroube en entier. Cependant, à partir de la concentration de 5U, au bout de 2 h, toutes les graines de cette expérience ont été

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

facilement décortiquées avec un rendement de 100 %. Même si nous avons un décortiquage complet au bout de 3 h pour les autres concentrations plus faibles, nous optons pour une réduction de la durée de traitement pour avoir une préservation de la qualité structurale de la graine et donc l'hydrolyse enzymatique pendant 2 h à 5 U sera plus adéquate.

2.3. Rendement

Le rendement obtenu des différentes parties de la graine de caroube est présenté dans le [Tableau 4](#). Concernant la méthode acide, vu que l'acide carbonise le tégument, le rendement en tégument est très faible par rapport à la méthode à l'eau bouillante et l'hydrolyse enzymatique. Il est à noter aussi que le rendement en tégument est faible aussi par rapport aux études publiées précédemment par [204]. Le rendement du germe est presque le même utilisant les trois méthodes et comparable avec les études déjà publiées sur le germe des graines de caroube [44], [204]. Concernant l'endosperme, la matière de base de la gomme de caroube, nous observons presque le même rendement pour les méthodes de prétraitement avec l'eau bouillante et par hydrolyse enzymatique. Cependant, le prétraitement par méthode chimique donne un rendement relativement faible par rapport aux autres méthodes, cela peut être dû essentiellement à une hydrolyse de l'endosperme provoquée par l'attaque acide (acide sulfurique à 60%) [19], [70].

Tableau 4 : Rendement du tégument, endosperme et du germe (%) des graines de caroube extraite par méthodes acide (Ac), à l'eau bouillante (Aq) et par hydrolyse enzymatique (HE).

	Traitement Ac%	Traitement Aq %	Traitement HE %
Endosperme	34-42	55-59	55-60
Germe	17-20	19-23	19-22
Tégument	06 - 10	16-18	18-20

2.4. Analyse MEB

L'analyse de la microstructure de la surface des graines de caroube avant et après hydrolyse enzymatique par la cellulase a été effectuée par un microscope électronique à balayage (MEB). Cette technique permet de donner les détails du changement structural de la surface d'un échantillon avec des grossissements de l'ordre de (250 à 4000 fois). La [Figure 33](#), montre les microstructures des graines non-traitées (a-c) et traitées (d-f). Les changements des microstructures ont été bien illustrés et détaillés avec un grandissement de ($\times 4000$). Avant traitement, la dureté de la structure des téguments des graines de caroubes surtout dans l'image

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

(c) montre l'absence totale de pores indiquant ainsi l'uniformité et la dureté de l'enveloppe tégumentaire des graines de caroube. Avec un grandissement de ($\times 1000$), nous observons dans l'image (d) le développement de fissures et l'augmentation de la porosité du tégument. De plus, le grandissement ($\times 4000$) montre l'efficacité de l'hydrolyse enzymatique.

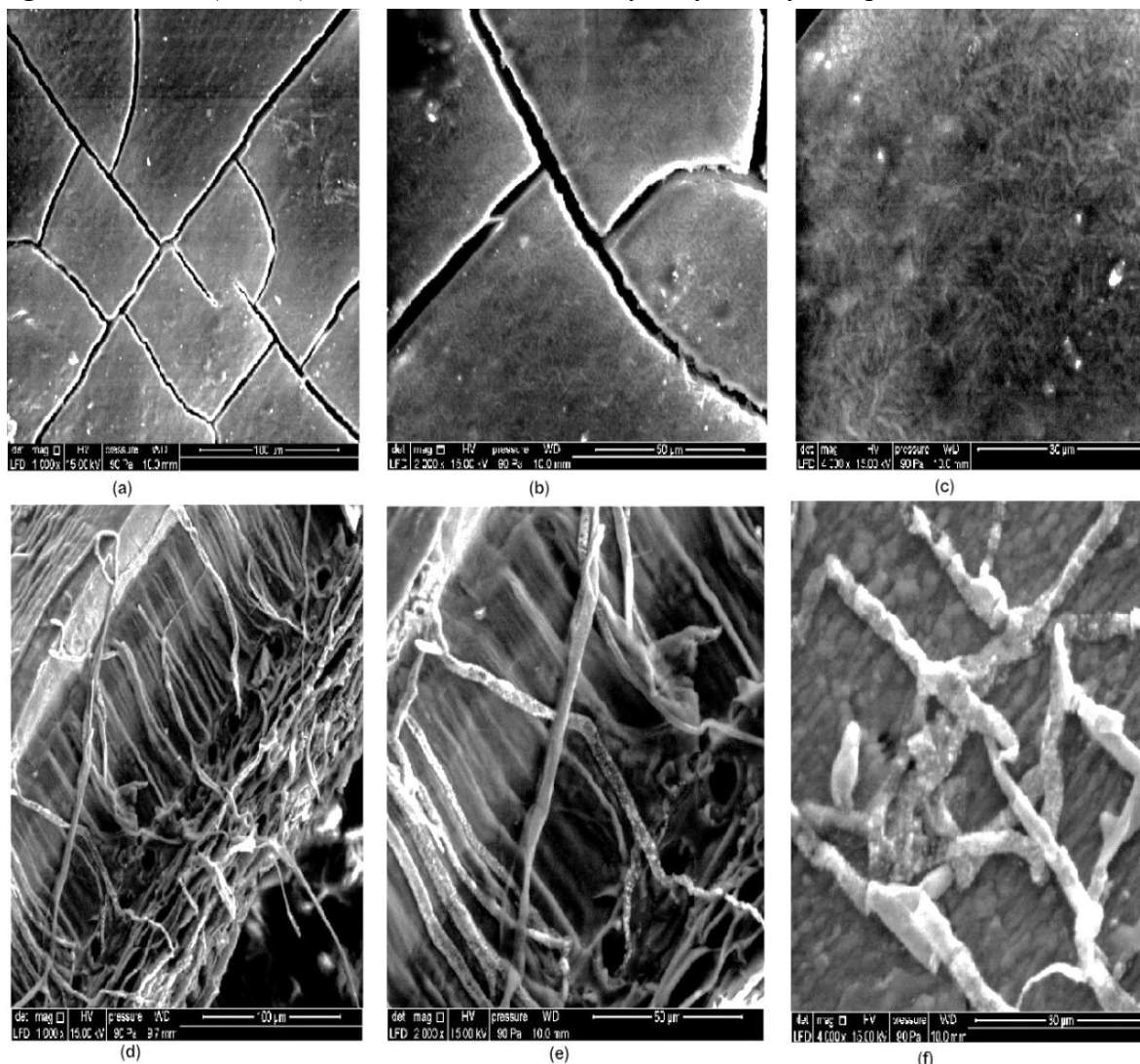


Figure 33 : Structure du tégument des graines de caroube avant ((a), (b), (c)) et après hydrolyse enzymatique ((d), (e) et (f))

2.5. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Un autre outil bien efficace pour s'assurer de l'intégralité de la structure de la gomme de caroube obtenue est l'analyse par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) sur la région située entre 4000 et 400 cm^{-1} . Les résultats obtenus confirment la présence de tous les groupes fonctionnels constituant la structure de la GC (Figure 34.A) en comparaison avec le spectre de la gomme commerciale (LBG) ainsi reporté dans la Figure 34.B. En effet, nous remarquons la présence d'une bande large et intense à environ 3300 cm^{-1} dans les deux structures qui correspond au groupement d'élongation O-H. Les bandes à 2923 et 2926 cm^{-1} du

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

spectre (A) et (B) sont attribuées au groupe d'élongation des liaisons C-H. Par ailleurs, les bandes observées à environ 3300 et 1637 cm^{-1} sont attribuées aux modes de vibrations de la molécule d'eau [205]. Les bandes vers 1013, 1052 et 1033 cm^{-1} correspondent généralement aux modes d'élongation asymétrique et symétrique C-O du groupe des cycles pyranoses. Les bandes caractéristiques observées à 869 et 812 cm^{-1} sont attribuées aux liaisons β -galacosidiques et β -mannosidiques, respectivement pour la LBG (B). Dans le spectre A, la bande correspondante à 873 cm^{-1} est attribuée β -D-mannopyranose [206] et 810 cm^{-1} aux unités D-galactopyranose [207]. Les résultats ainsi obtenus sont en cohérence avec ceux de la LBG confirmant ainsi l'efficacité de la méthode d'hydrolyse enzymatique à extraire la gomme de caroube avec une qualité élevée.

2.6. Test de solubilité

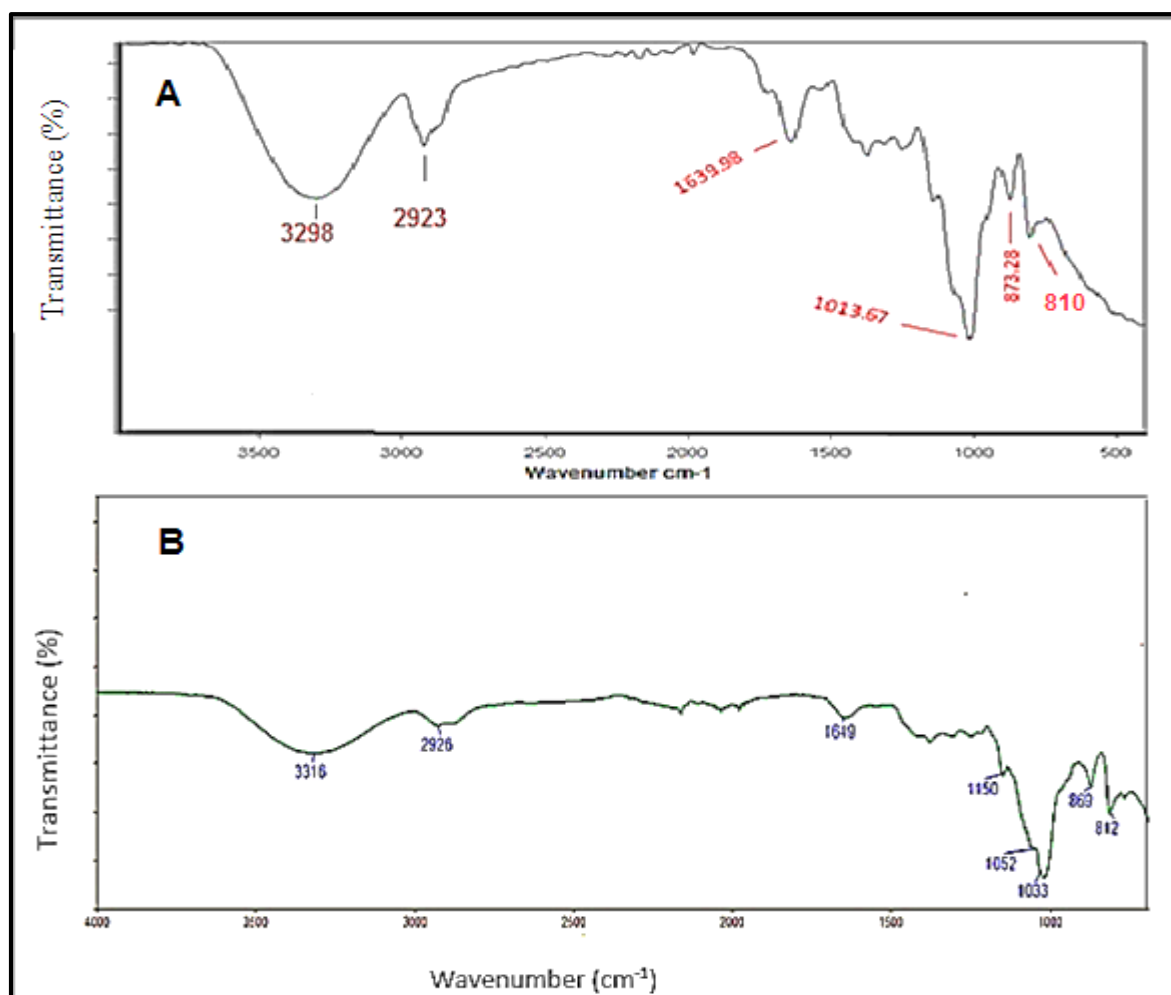


Figure 34: Spectres infrarouges de la gomme de caroube obtenue par différentes méthodes. (A) Par la méthode d'HE, (B) spectre IR de la gomme commerciale (LBG) [209]

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortilage des graines de caroube

Le test de solubilité a été réalisé pour les deux échantillons de gomme de caroube obtenues avec méthode chimique et avec hydrolyse enzymatique. La [Figure 35](#) reporte la variation de la solubilité de la gomme en fonction de la température (A) à 25°C et (B) à 80°C. La solubilité de la gomme de caroube dépend essentiellement de la température appliquée, du temps de la solubilisation et de la pureté de la gomme testée (les fragments de téguments ou du germe qui restent attachés à l'endosperme). D'autres paramètres peuvent influencer la solubilité de la GC aussi, notant bien le poids moléculaire ainsi que le DS_G [70]. A 25°C, une solubilité de 48% est observée pour la gomme obtenue par procédé d'HE alors que pour la gomme du procédé Ac elle est de 40% seulement. En outre, il est bien connu que plus la gomme est soluble dans l'eau plus son DS_G est élevée. Ceci montre que relativement le procédé HE préserve la structure des galactomannanes de la GC plus que le procédé acide. D'autres part, avec l'augmentation de la température la solubilité augmente, effectivement à 80°C durant 30 min la gomme de caroube obtenue par HE est solubilisée presque à 73% contre 66% du procédé Ac. Il est bien noté que la solubilité de la LBG ne dépasse jamais les 90%. Avec la méthode d'HE, nous remarquons que la solubilité est à environ 88% pendant 1 h indiquant ainsi la pureté et la haute qualité de la gomme obtenue par rapport au procédé chimique. Nos résultats sont en accord avec les résultats déjà publiés sur la solubilité de la gomme de caroube obtenue par procédé chimique précisant ainsi atteindre 70-85% pendant un traitement de 30 min à 80°C [56], [67].

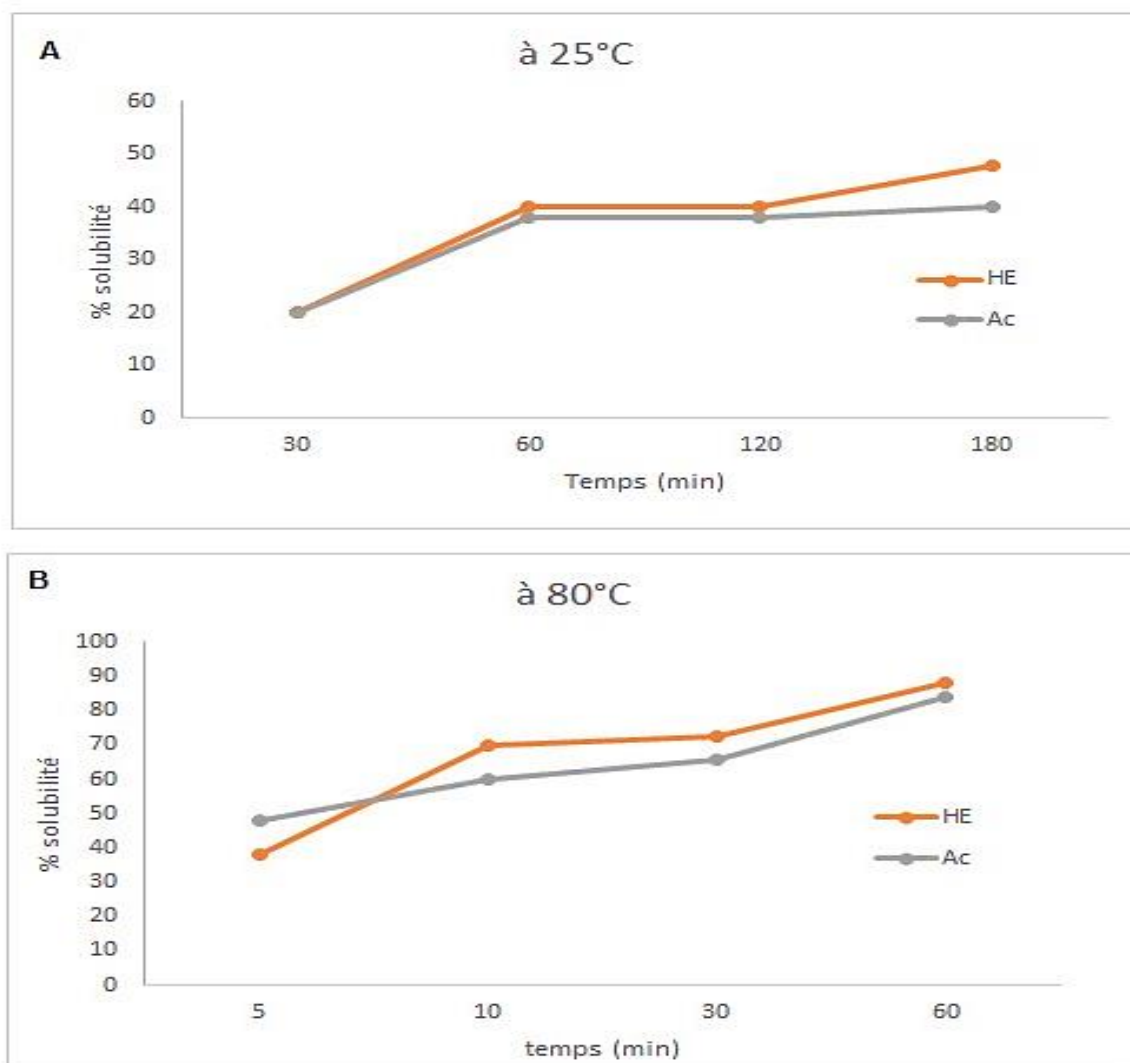


Figure 35 : Variation de la solubilité de la gomme de caroube en fonction de la température (A) 25°C et (B) à 80°C entre la gomme obtenue par la méthode chimique (Ac) et par hydrolyse enzymatique (HE)

Conclusion de l'HE des graines entières

La méthode d'hydrolyse enzymatique est une méthode prometteuse. En plus d'être une méthode écologique, elle permet de réaliser des optimisations et d'avoir des rendements élevés. Un pH de 4,8 et une concentration de 5 à 10 U pour 5 grammes de graines durant un traitement dans un bain ultrasons à 50°C/2h permettent de réaliser un décortiquage complet des graines de caroubes et d'extraire une gomme de caroube avec une qualité élevée. Par ailleurs, il existe différentes méthodes de prétraitement des graines de caroubes qui visent à maximiser le rendement et de récupérer les différentes parties des graines avec une bonne qualité/quantité telles que la méthode acide et la méthode thermique avec l'eau bouillante. Toutefois, cette dernière demande une température élevée qui nuit à la qualité et la texture de la fraction

d'endosperme obtenue observée par la couleur de la gomme obtenue. D'autre part, le prétraitement chimique est non-écologique et reporté d'altérer partiellement la structure de la gomme obtenue. En définitive, la présente méthode d'hydrolyse enzymatique permet de pallier tous les inconvénients déjà cités des méthodes classiques et permet d'obtenir les différentes parties de la graine de caroube avec une qualité et quantité supérieures.

Les graines de caroube entières passent par un prétraitement par hydrolyse enzymatique en utilisant un bain ultrasons. Le temps de traitement est réduit à 2 h avec un substrat de 5 g et une concentration d'enzyme de 5-10U. Les graines récupérées après hydrolyse sont ensuite décortiquées et chaque partie de la graine est isolée à part, séchée et broyée. La fraction d'endosperme nous a permis ainsi d'obtenir la gomme de caroube brute.

V. Optimisation de l'HE des graines broyées par plan d'expériences

1. Aperçu sur les plans d'expériences

Les plans d'expériences sont une méthode élaborée afin de remédier à plusieurs problèmes rencontrés surtout dans le domaine industriel. Cette méthode permet la minimisation du nombre nécessaire d'expériences permettant ainsi un gain en temps et en coût financier. Leur utilisation dans différents domaines vise essentiellement la détermination des facteurs clés dans la conception d'un nouveau produit ou d'un nouveau procédé, l'optimisation des réglages d'un procédé de fabrication ou d'un appareil de mesure et aussi la prédiction par modélisation du comportement d'un procédé. Néanmoins, elle ne permet en aucun cas d'expliquer un phénomène physico-chimique étudié.

La méthode des plans d'expériences a été initialement introduite en 1925 par Ronald Fisher, un mathématicien britannique, en relation avec les expérimentations dans le domaine de l'agriculture publiées dans un ouvrage en 1935 [208]. Par ailleurs, Yates a largement reporté l'application de la méthode dans l'agriculture et dans d'autres domaines comme la biologie et notamment en industries. Puis, en se référant aux travaux de Yates, Box et Wilson ont développé des modèles mathématiques adaptés aux contextes industriels [209]. Les applications industrielles récentes ont été particulièrement associées au nom de l'ingénieur japonais G. Taguchi, qui a élaboré les tables d'expériences (criblage) adaptées aux problèmes industriels en coordination avec les études publiées de Box associé à Wilson (1952) et Beveridge (1952) sur la conception expérimentale introduisant ainsi les modèles de surfaces de réponses tels que les plans composites centrés [210–212]. Après les années 50, multiples statisticiens ont développé des modèles des plans d'expériences adaptés aux différentes situations et domaines

[213]. De ce fait, il existe plusieurs plans d'expériences, nous trouvons ainsi : les plans factoriels complets à 2 niveaux, plans factoriels fractionnaires à 2 niveaux, d'autres plans à 2 niveaux (dont les tables de Taguchi), plans à plus de 2 niveaux (dont les carrés latins), plans pour surfaces de réponse (dont les Plans composites), etc.

La base de la méthodologie des plans d'expériences repose sur l'étude d'un système (un problème) en déterminant les différents facteurs qui peuvent l'influencer. Par conséquent, une réponse est établie suite à cette influence permettant d'établir la relation cause à effet entre les réponses et les facteurs.

2. Les étapes de l'optimisation du procédé d'HE par plan d'expériences

2.1. Définir le problème

Avant de procéder à l'application des plans d'expériences il faut premièrement commencer par savoir c'est quoi le problème posé. Afin de définir ce problème, il est utile de se référer à la méthode QQCOQP en répondant sur les différentes questions : en **Quoi** consiste le problème ? **Qui** est le demandeur du problème ? **Combien** ça coûte ? **Où** cela se passe-t-il ? **Quand** cela arrive-t-il ? **Pourquoi** est-ce un problème ?

Dans notre cas la problématique posée est de déterminer les facteurs influençant le procédé d'hydrolyse enzymatique des graines de caroube broyée sachant bien que tout expérimentateur au début de l'étude d'un phénomène quelconque ignore la faisabilité des expériences et la méthode à adapter aussi. L'utilisation de la méthode classique qui consiste à varier un facteur tout en fixant les autres ou aussi appelé essais –erreurs est en générale une méthode qui demande beaucoup d'expériences, un coût élevé et aussi la longue durée. En plus, cette méthode ne met pas en considération l'effet d'interactions entre les facteurs étudiés. Donc, il est nécessaire de s'appuyer sur des outils pratiques, simples et qui donnent une multitude d'informations avec un minimum d'expériences.

2.2. Détermination de la réponse

Les plans d'expériences s'inscrivent dans une démarche générale d'amélioration de la qualité. Le succès de la démarche originale des plans d'expériences réside dans la possibilité d'interprétation des résultats expérimentaux avec un effort minimal sur le plan expérimental : la minimisation du nombre nécessaire d'expériences permettant un gain en temps et en coût financier. Par conséquent, L'étude doit avant tout avoir un but précis : minimiser un coût de fabrication, chercher les paramètres influents, réduire le calibre d'un produit fini, etc. Donc la réponse Y doit être préalablement une réponse représentative et quantitative [214, 215]. De ce

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

fait, nous avons pris comme réponse cherchée : le taux des sucres réducteurs produit suite à l'hydrolyse enzymatique des graines de caroube broyées (téguments contenant la cellulose et qui reste attaché en fragments aux endospermes).

2.2.1. Mesure des sucres réducteurs

La mesure des sucres réducteurs a été réalisée suivant la méthode de DNS (acide dinitrosalicylique) décrite dans la section d'élaboration de la méthode de décortiquage des graines de caroube.

2.2.2. Enzyme cellulase

L'enzyme utilisée est cellulase de *Trichoderma reesei* ATCC 26921 (product from Denmark) et fourni par @ Sigma-Aldrich codé C2730. La densité de la solution aqueuse jaunâtre d'enzyme cellulase est de 1,2 g / mL à 25°C. La solution aqueuse a une activité de 700 Unités/G.

2.3. Détermination des facteurs influents

Un facteur est une variable susceptible de varier la réponse Y. La détermination des facteurs influents est faite essentiellement à partir d'un brainstorming des différentes causes pouvant influencer le problème posé. Ainsi une classification de toutes les causes posées est faite et par ordre de priorité elles sont étudiées. Dans cette étape le diagramme d'Ishikawa ou de causes-effets est largement utilisé pour trier toutes les causes suivant la classe dont ils font partie ([Figure 36](#)).

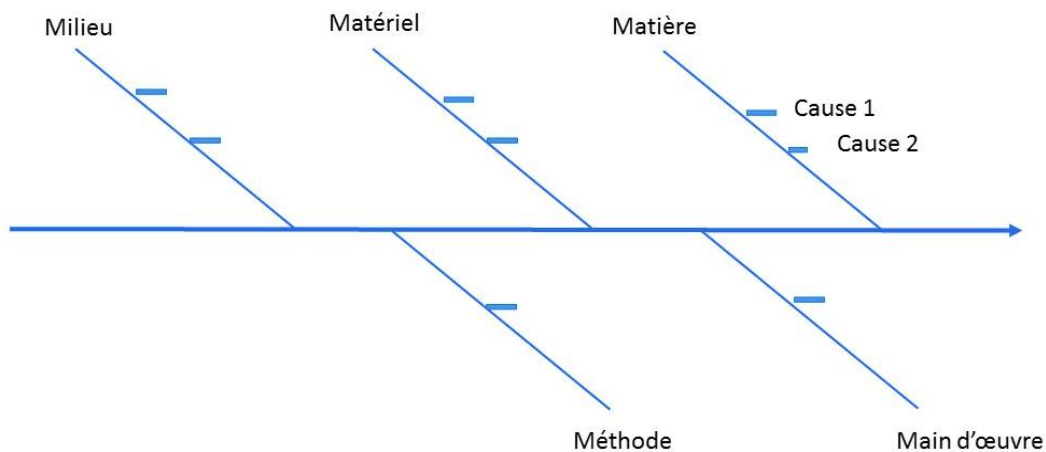


Figure 36 : Diagramme d'Ishikawa ou de causes – effets.

En général, il n'existe pas une manière définitive et précise pour déterminer les facteurs influençant une réponse Y. Le choix des facteurs et des modalités est laissé à l'expérimentateur. Toutefois, une justification de ce choix doit être expliquée en fonction des besoins

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortilage des graines de caroube

d'informations nécessaires en termes d'influence du facteur. Dans l'ensemble, le facteur prend des valeurs continues ou discrètes appelées niveaux. Le plan d'expérience choisi et les facteurs utilisés définissent le nombre de niveaux à choisir.

Nous avons choisi trois facteurs comme potentiellement influençant sur la production des sucres réducteurs suite à l'hydrolyse enzymatique des graines de caroube broyées par les cellulases. La charge en substrat est notée (S) en pourcentage de substrat/eau (m/v %). La concentration d'enzyme (E) est mesurée en tant que concentration (U/mL) par rapport aux tampon citrate-Na et le temps de prétraitement (t) en (heure). La température a été fixée à 50°C et le pH à 4,8 suites aux résultats de l'étude précédente sur les graines entières. Le [Tableau 5](#) présente les niveaux des facteurs utilisés. Vu que les procédés d'extraction classiques ne dépassent pas 2 h de traitement avec une température de 100°C, nous avons opté pour une durée de 3 heures mais à une température moyenne fixée à 50°C. Les valeurs de la concentration enzymatique ont été prises arbitrairement avec la charge du substrat vu qu'à notre connaissance les études sur le même substrat n'existent pas. Les niveaux de chaque facteur peuvent apparaître faibles, mais vu que c'est la première fois qu'on réalise le plan d'expériences sur un substrat tel que les graines de caroube broyées, nous ignorons l'effet de ces facteurs et de leurs interactions. De ce fait nous avons opté pour la réalisation des expériences à petite échelle permettant ainsi de contrôler les facteurs d'une part et d'analyser la réponse d'une autre part.

Tableau 5 : Récapitulatif des niveaux de facteurs et leurs unités pour l'étude du plan à surface de réponse

	Facteurs	Unité	Niveau (-1)	Centre	Niveau (+1)
U1	S	%	5	10	15
U2	E	U	1	3	5
U3	t	h	1	2	3

2.4. Choix d'un modèle

Nous avons opté pour une optimisation par surface de réponses avec un plan composite centré avec 3 facteurs et un point au centre. Le choix du modèle dépend de l'objectif de l'étude. En effet, Les plans d'expériences dits factoriels utilisent tous le modèle mathématique suivant qui

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

relient la réponse y aux facteurs $x_1, x_2, \dots, x_i \dots x_n$ $y = f(x)$. Dans notre cas il s'agit d'un modèle polynomial de deuxième degré.

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_nx_n + \sum_{i,j=1;i \neq j}^n b_{ij}x_ix_j + \sum_{i,j,k=1;i \neq j \neq k}^n b_{ijk}x_ix_jx_k$$

Où $b_0, b_1, \dots$; sont les coefficients du polynôme.

Les termes produits de type par exemple $b_{ij}x_ix_j$ correspondent aux interactions. Prenant exemple de notre plan avec 3 facteurs x_1, x_2 et x_3 on obtient un modèle polynomial comme suite : $Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + \sum b_{ii}x_i^2 + \sum b_{ij}x_ix_j$

En bref, l'optimisation avec le plan composite centré avec 3 facteurs et un point au centre permet la réalisation de 30 expériences. A priori, le nombre d'expérience est égal à 15 expériences ($2^3 + d'autres points + 1$ point au centre = 15) mais avec les répétitions le nombre d'expériences est de 30.

2.5. Réalisation des essais

Après le choix du modèle et du plan, le logiciel Nemrodw© exécute le choix et opte pour une matrice d'expériences dont nous avons pour tâche de réaliser les essais et d'insérer par la suite le résultat obtenu pour chaque expérience exécutée. Un soin tout particulier doit être porté à l'exécution des essais. Si on ne réalise pas personnellement les essais, il faut notamment vérifier que les facteurs contrôlables mais non étudiés soient bien fixés à des valeurs précises. Toutefois, puisque nous avons réalisé les essais avec répétition, ces essais répétés ont été réalisés dans les mêmes conditions afin de minimiser le plus possible les erreurs qui peuvent y avoir lieu.

2.6. Interprétation des résultats des essais

Comme première approche, le plan d'expériences peut être conçu comme un moyen de déterminer quels sont les facteurs ou les interactions qui ont une influence statistiquement significative sur la réponse étudiée. Toutefois, l'exploitation des résultats expérimentaux est souvent assez rapide avec un logiciel. Le principe de l'exploitation est simple : il consiste à calculer les coefficients du modèle polynomial ; plus la valeur absolue du coefficient est élevée, plus le terme correspondant (facteur simple ou interaction) sera influent sur la réponse étudiée. En conclusion de l'étude on fournit la liste des facteurs influents la plupart du temps l'expression du modèle, en retenant que les coefficients jugés statistiquement significatifs. La matrice d'expériences est établie suivant le [Tableau 6](#).

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

Tableau 6 : Matrice d'expériences de l'hydrolyse enzymatique des graines de caroubes broyées

N° Exp	S	E	t
1	-1,00000	-1,00000	-1,00000
2	-1,00000	-1,00000	-1,00000
3	1,00000	-1,00000	-1,00000
4	1,00000	-1,00000	-1,00000
5	-1,00000	1,00000	-1,00000
6	-1,00000	1,00000	-1,00000
7	1,00000	1,00000	-1,00000
8	1,00000	1,00000	-1,00000
9	-1,00000	-1,00000	1,00000
10	-1,00000	-1,00000	1,00000
11	1,00000	-1,00000	1,00000
12	1,00000	-1,00000	1,00000
13	-1,00000	1,00000	1,00000
14	-1,00000	1,00000	1,00000
15	1,00000	1,00000	1,00000
16	1,00000	1,00000	1,00000
17	-1,00000	0,00000	0,00000
18	-1,00000	0,00000	0,00000
19	1,00000	0,00000	0,00000
20	1,00000	0,00000	0,00000
21	0,00000	-1,00000	0,00000
22	0,00000	-1,00000	0,00000
23	0,00000	1,00000	0,00000
24	0,00000	1,00000	0,00000
25	0,00000	0,00000	-1,00000
26	0,00000	0,00000	-1,00000
27	0,00000	0,00000	1,00000
28	0,00000	0,00000	1,00000
29	0,00000	0,00000	0,00000
30	0,00000	0,00000	0,00000

Après réalisation des essais, les valeurs expérimentales obtenues pour l'hydrolyse enzymatique des graines de caroubes broyées ont été ajustées à un modèle polynomial et utilisées pour étudier les corrélations entre les variables indépendantes et les réponses correspondantes, ainsi que pour déterminer les conditions optimales pour maximiser l'hydrolyse des graines de caroubes broyées afin de pouvoir détacher les fragments de téguments des endospermes broyés et extraire la totalité de la gomme de caroube avec une qualité supérieure. Les 30 expériences ont été réalisées suivant le plan d'expérimentation décrit dans le [Tableau 7](#) avec Les taux de sucres réducteurs (SR) en (g/L) obtenus pour chaque expérience.

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortilage des graines de caroube

Tableau 7: Ensemble des expériences réalisées avec les taux de sucres réducteurs produits en (g/L)

N° Exp	S	E	t	SR
	%	U	h	g/L
1	5,00	1,00	1,00	0,48
2	5,00	1,00	1,00	0,46
3	15,00	1,00	1,00	0,12
4	15,00	1,00	1,00	0,10
5	5,00	5,00	1,00	0,08
6	5,00	5,00	1,00	0,09
7	15,00	5,00	1,00	0,78
8	15,00	5,00	1,00	0,84
9	5,00	1,00	3,00	0,39
10	5,00	1,00	3,00	0,38
11	15,00	1,00	3,00	0,12
12	15,00	1,00	3,00	0,11
13	5,00	5,00	3,00	0,02
14	5,00	5,00	3,00	0,03
15	15,00	5,00	3,00	0,07
16	15,00	5,00	3,00	0,09
17	5,00	3,00	2,00	0,38
18	5,00	3,00	2,00	0,44
19	15,00	3,00	2,00	0,53
20	15,00	3,00	2,00	0,51
21	10,00	1,00	2,00	0,39
22	10,00	1,00	2,00	0,29
23	10,00	5,00	2,00	0,45
24	10,00	5,00	2,00	0,48
25	10,00	3,00	1,00	0,51
26	10,00	3,00	1,00	0,53
27	10,00	3,00	3,00	0,94
28	10,00	3,00	3,00	1,02
29	10,00	3,00	2,00	0,86
30	10,00	3,00	2,00	0,83

2.6.1 Analyse des coefficients

Le calcul des coefficients est une analyse statistique basée sur l'hypothèse nulle suivante :

$$H_0 = \text{le coefficient } b_i \text{ est nul}$$

La probabilité associée à cette hypothèse nous permet d'obtenir le pourcentage associé à l'hypothèse nulle avec t_{exp} exprime la valeur Student associée à chaque coefficient. Le [Tableau 8](#) d'analyse des coefficients permet de définir si nous pouvons choisir un modèle inférieur. Nous observons ainsi que nous ne pouvons pas choisir un modèle de degré 1 puisque les coefficients du modèle de ce degré ont un pourcentage d'être nul élevé (54,5 % pour b_2) et les coefficients de deuxième degré sont aussi significatifs dans cette étude que ceux du degré 1.

Tableau 8 : Tableau d'analyse des coefficients

Nom	Coefficient	t. exp.	Signif. %
b0	0,834	64,37	< 0,01 ***
b1	0,026	4,18	0,109 **
b2	0,004	0,62	54,5
b3	-0,110	-16,20	< 0,01 ***
b1-1	-0,368	-23,83	< 0,01 ***
b2-2	-0,430	-27,83	< 0,01 ***
b3-3	0,224	13,15	< 0,01 ***
b1-2	0,176	25,66	< 0,01 ***
b1-3	-0,073	-10,62	< 0,01 ***
b2-3	-0,089	-13,00	< 0,01 ***

2.6.2 Validité du modèle

L'analyse de la variance est une étape essentielle pour s'assurer de la validité du modèle et des erreurs associées à la réponse fournie. Un tableau d'analyse des variances ([Tableau 9](#)) est établi et permet d'estimer la significativité des variables. Le niveau de confiance est fixé à 5 %. Le test de la variance doit répondre aux deux questions suivantes : Est-ce que le modèle nous rapporte quelque chose ? la régression est-elle significative ? et est-ce que le modèle représente bien le phénomène ?

La valeur de R^2 égale à 0,917 est très proche de 1. Cela confirme qu'il y a une grande corrélation entre les valeurs expérimentales et calculées. La R^2 ajusté (R^2_A), appelée aussi le coefficient de détermination ajusté traduit la contribution du modèle dans la restitution de la variation de la réponse observée. Lorsque cette valeur est proche de 1 (100%) nous pouvons conclure que la qualité du modèle est satisfaisante. Nous avons une valeur de (R^2_A) égale à 0,873 qui est une valeur proche de 1 et donc nous pouvons dire que toutes les réponses ont une qualité descriptive satisfaisante.

Tableau 9: Qualité descriptive du modèle

Ecart Type de la réponse	0,027365756
R^2	0,917
R^2_A	0,873
R^2 pred	0,772
Nombre de degrés de liberté	13

Le pourcentage mentionné dans la rubrique de (signif) est calculé par le test de Fisher-Snedecor et les étoiles estiment la qualité du pourcentage obtenu dont ***< 0,1%, **< 1% et *< 5%. Par

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

ailleurs, comme indiqué dans le [Tableau 10](#) la probabilité ou (signif %) est ($< 0,01\%$). Par conséquent, cela indique que la réalité est bien expliquée par le plan, donc on valide le modèle pour les valeurs de la réponse des SR obtenues.

Tableau 10 : Tableau d'analyse de la variance

Source de variation	Somme des carrés	Degrés de liberté	Carré moyen	Rapport	Signif
Régression	1,9084	9	0,2120	283,1519	$< 0,01$ ***
Résidus	0,1726	17	0,0102		
Validité	0,1629	4	0,0407	54,3710	$< 0,01$ ***
Erreur	0,0097	13	0,0007		
Total	2,0810	26			

2.6.3 Analyse graphique des résultats

Etant donné que nous avons trois facteurs (la charge du substrat, la concentration d'enzyme et la température), il est difficile de déterminer la variation de la réponse. C'est pour cela nous réalisons des projections en fixant un facteur et variant les deux autres.

Nous observons dans la [Figure 37](#) les graphiques des surfaces de réponses en trois dimensions (3D). Nous aurons une multitude de réponse en fonctions des deux facteurs ($X_1 = S\%$ et $X_2 = E$), avec le troisième facteur fixé à deux heures de traitement à 50°C . Le temps était fixé à $t=2$ h pour une première raison de réduire le temps du traitement et deuxièmement pour la conservation d'intégralité de la structure des composants de la graine de caroube. Une augmentation de la charge de substrat et de la concentration d'enzyme permet d'hydrolyser la cellulose des graines des caroubes et produire un maximum de sucres réducteurs arrivant à $0,83$ g/L.

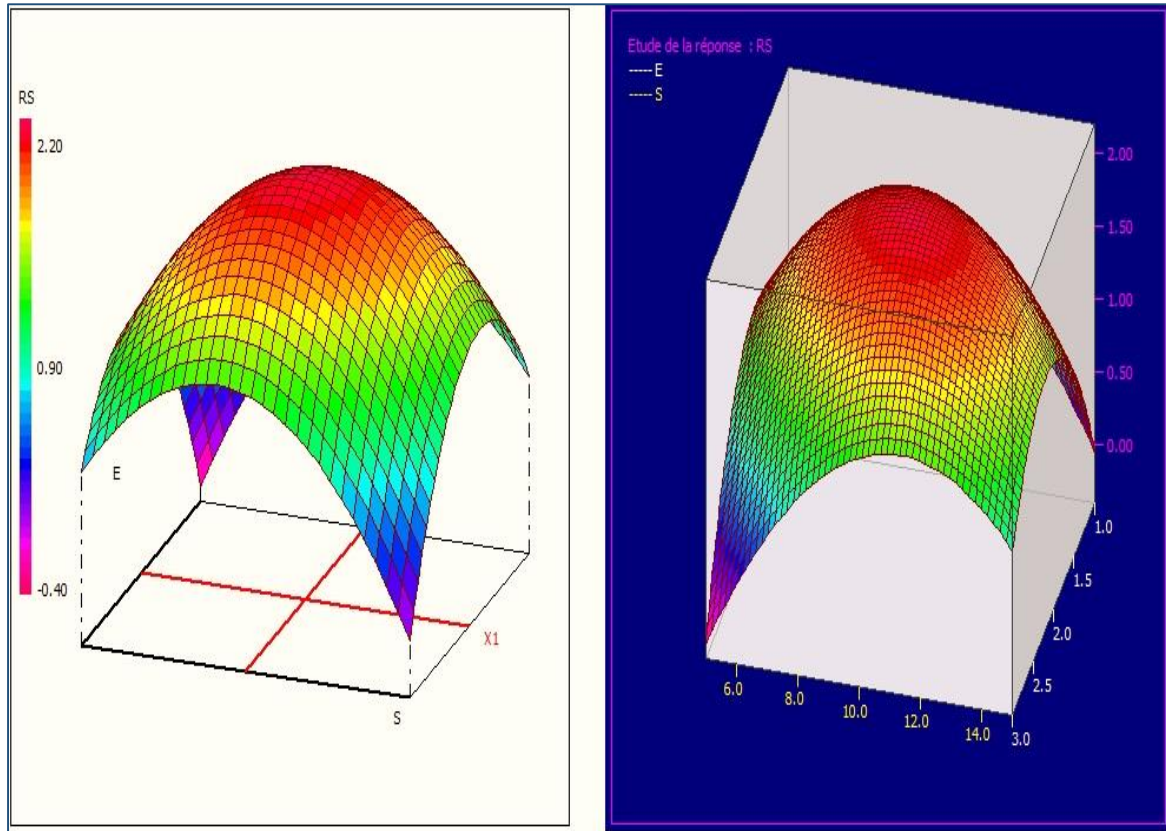


Figure 37 : Surface de réponses (RS = sucres réducteurs) avec $t = 2h$, $X1$ = charge substrat et $X2$ = concentration d'enzyme (analyse graphique 3D)

Les courbes isoréponses donnent une projection de surface de réponses dans un plan horizontal ([Figure 38](#)). Elles sont appelées des courbes de niveaux dont chaque niveau représente une réponse bien déterminée. Dans cette représentation, nous fixons un facteur et nous varions les deux autres facteurs. Comme précédent, le temps a été fixé à 2h à 50°C. Les deux représentations graphiques permettent de définir les surfaces de réponses en fonction de la variation des deux facteurs de (% S et [E]).

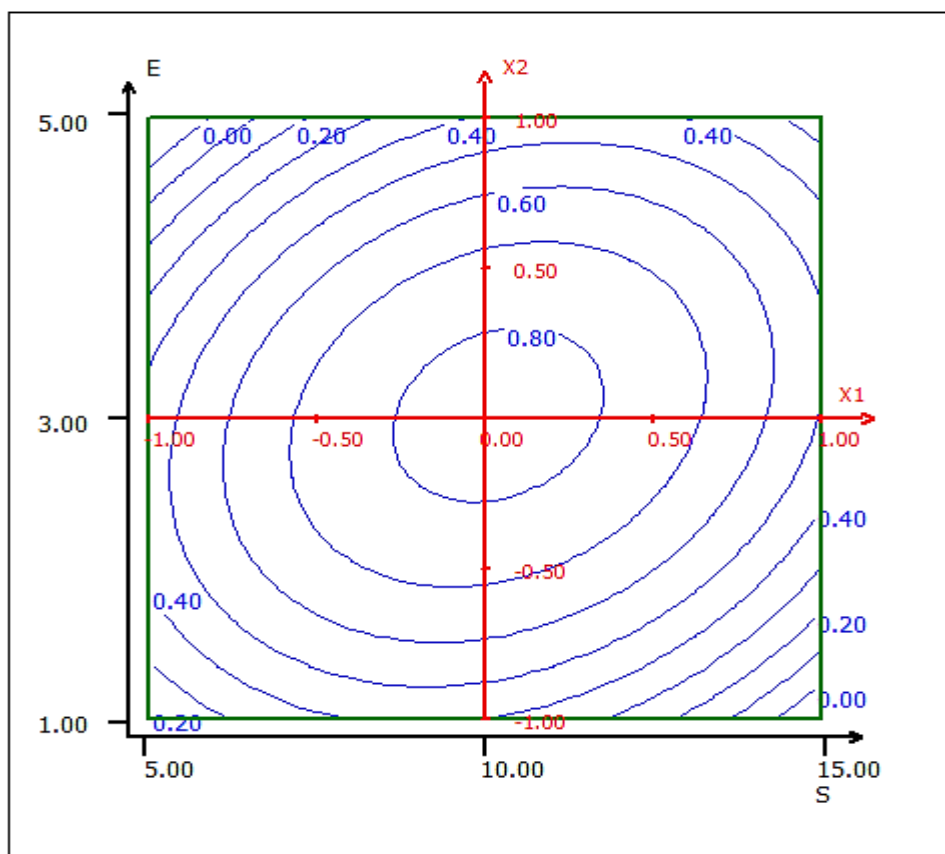


Figure 38 : Courbes d'isoréponses (2D) du taux des sucres réducteurs produits par hydrolyse enzymatique des graines de caroube broyées durant 2 h de traitement à 50°C

2.6.4 Fonction de désirabilité

Les fonctions de désirabilité permettent de trouver à partir de la sélection de la réponse cible voulue les niveaux de facteurs optimisés afin d'atteindre le minimum ou le maximum d'une réponse bien choisie à l'avance.

La désirabilité estime le degré de satisfaction des expérimentateurs en fonction de la valeur désirée à obtenir de la réponse modélisée. 100% est affiché lorsque la réponse voulue est possible à atteindre. La présente fonction donne une multitude de combinaisons de facteurs afin d'obtenir la réponse désirée. Le [Tableau 11](#) indique l'un des résultats obtenus avec un fort pourcentage de désirabilité de (di) de 100%.

Tableau 11 : Tableau de résultat de recherche d'optimum obtenu pour une réponse cible maximum de 1,00 g/L en SR

Facteur	Valeur	Réponse SR	di %
S	9,20	1,00	100,00
E	2,98		
t	3,00		

Les résultats de la fonction de désirabilité permettent d'hydrolyser les graines de caroube broyées (substrat) de 9,20 % en appliquant une concentration enzymatique de 2,98 U/mL durant 3 h d'obtenir un taux de sucres réducteurs de 1,00 g/L. Après centrifugation et séparation des phases, la lyophilisation de la partie d'endosperme obtenue permet de récupérer une gomme de texture très acceptable.

2.7. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier dans la région située entre 4000 et 400 cm^{-1} pour confirmer la qualité de la gomme de caroube obtenue par hydrolyse enzymatique (GCH) en comparaison avec le spectre IR de la gomme de caroube obtenue par la méthode classique (GCa). Les résultats de l'analyse ont confirmé la présence de tous les groupements fonctionnels dans la gomme de caroube récupérée par hydrolyse enzymatique des graines broyées ([Figure 39](#)). La bande à environ $\approx 2927 \text{ cm}^{-1}$ correspond à la vibration d'élongation de la liaison C-H. La bande d'absorption à haute fréquence, à environ $\approx 3300 \text{ cm}^{-1}$, correspond à la vibration d'élongation de la liaison O-H de la molécule d'eau. En outre, la bande à environ $\approx 1640 \text{ cm}^{-1}$ est attribuée à la vibration de déformation de la molécule d'eau. Les bandes communes des galactomannanes observées entre 1245 et 1000 cm^{-1} correspondent au cycle pyranose du monosaccharide [206]. Les bandes observées à $\approx 869 \text{ cm}^{-1}$ et $\approx 812 \text{ cm}^{-1}$ sont respectivement attribuées aux liaisons β -galactosidiques et β -mannosidiques [206], [216].

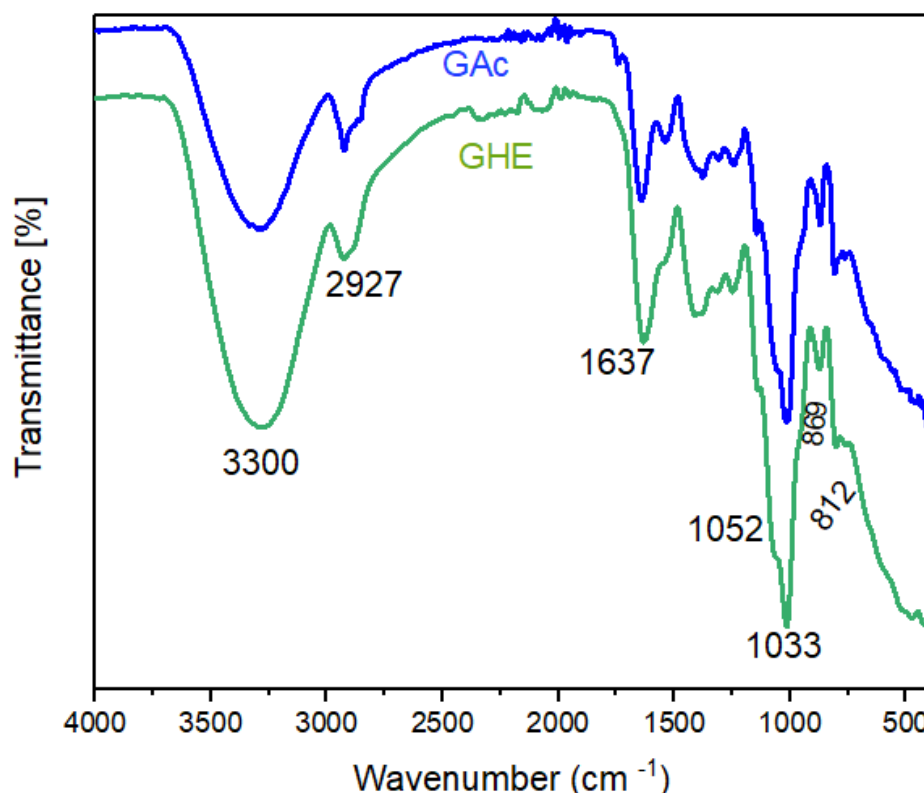


Figure 39 : Spectre infrarouge de la gomme de caroube obtenue par hydrolyse enzymatique (GHE) et par la méthode acide (GAc)

2.8. Rendement

Le rendement de chaque partie de la graine traitée par les trois méthodes a été calculé en se basant sur la formule suivante :

$$(\%) \text{ rendement} = \frac{\text{masse de la fraction récupérée après traitement (endosperme, germe ou tégument)}}{\text{masse initiale des graines avant traitement}} \times 100$$

La gomme obtenue est d'une apparence ou texture blanche de haute qualité. Le rendement obtenu est de (51- 54%), ce dernier est similaire au rendement obtenu par les autres méthodes classiques de prétraitements ($\approx 37\text{-}61\%$).

3. Les étapes du procédé d'HE

a. Etape de prétraitement

La première étape du procédé d'extraction de la gomme de caroube consiste à effectuer un broyage des graines dures de caroube. Cependant, même après broyage, le tégument reste attaché à l'endosperme. L'utilisation des facteurs optimisés d'HE a permis d'hydrolyser la

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

cellulose du tégument et de fragiliser ce dernier permettant le détachement de celui-ci et l'extraction de la fraction d'endosperme. Avec une charge de substrat de 9,2%, concentration d'enzyme de 2,98 U/mL et pendant 3 heures à 50°C, les différentes phases ou parties de caroube ont été récupérés séparément. La [Figure 40](#) illustre les étapes d'hydrolyse enzymatique des graines broyées permettant d'obtenir une gomme de caroube blanchâtre de bonne qualité.

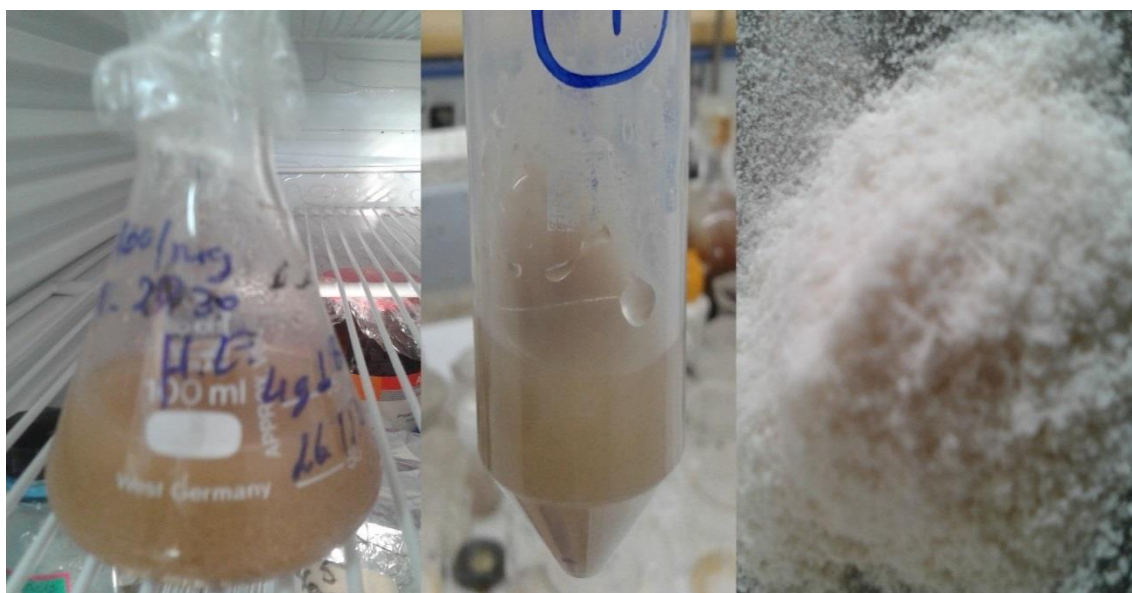


Figure 40: Hydrolyse enzymatique des graines de caroube broyées par la cellulase

b. Etape de centrifugation

Après 3 heures de prétraitement, le mélange est centrifugé à 6000 rpm pendant 30 min (Centrifugeuse Weswox). Cette étape permet de séparer le mélange en fonction de la densité de chaque partie. Effectivement, la partie endosperme a été séparée suivant la couleur blanche apparente de la couche supérieure du mélange.

c. Etape de précipitation

La partie d'endosperme est précipitée dans l'éthanol/isopropanol. Cette étape permet de purifier les galactomannanes de la GC. Ainsi après précipitation, le solide est récupéré par filtration.

d. Etape de lyophilisation

La fraction de GC purifiée obtenue est congelée à -80°C, puis lyophilisée par un lyophilisateur de type Telstar Lyo Quest. La durée de la lyophilisation dépend essentiellement de la masse de

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortilage des graines de caroube

graines utilisée et de la performance de l'étape de filtration sous-vide. Ainsi, on obtient une poudre de GC purifiée et de couleur blanchâtre.

L'aspect général de la poudre de GC extraite constitue un critère essentiel d'appréciation et de commercialisation. Visuellement, la gomme obtenue par hydrolyse enzymatique est plus blanchâtre que celle obtenue par le protocole chimique. La différence de couleur est clairement visionnée sur la [Figure 41](#) et permet de détecter la présence des impuretés dans la gomme obtenue par le protocole chimique.



Figure 41 : Comparaison visuelle entre la gomme du protocole acide (a) et la gomme d'hydrolyse enzymatique (b)

Conclusion de l'optimisation par plan d'expériences

Le prétraitement par méthode d'hydrolyse enzymatique a été réalisé sur les graines de caroube broyées dans pour vérifier la possibilité d'extraire la gomme de caroube d'une qualité supérieure en utilisant une méthode biologique saine et respectueuse de l'environnement. Par ailleurs, l'utilisation des plans d'expériences nous a permis de déterminer et de réduire le nombre d'expériences maximum possible de réaliser tout en conservant la structure et la texture de la gomme de caroube obtenue. L'optimisation a été réalisée suivant un plan composite contré. C'est un plan basé sur un modèle polynomial de second degré : plan composite avec un point au centre. L'optimisation des réponses des 30 expériences réalisées nous a permis de tirer les conclusions suivantes :

Chapitre II : Elaboration d'un nouveau procédé d'extraction et de décortiquage des graines de caroube

- Le maximum de taux de sucres réducteurs a été produit avec une charge de substrat élevée et une concentration d'enzyme élevée soit environ (10% et 3U) en une durée de 3 h à une température de 50°C.
- Le temps de traitement fixé à 2 h permet d'hydrolyser les graines de caroube broyées avec un taux de sucres produits arrivant à 0,83 g/L.
- En réduisant la charge de substrat et maintenant une concentration d'enzyme élevée, la cellulase hydrolyse la cellulose des graines de caroube broyées et produit un taux de SR atteignant 1,00 g/L mais pendant une durée de prétraitement de 3 h.
- Le rendement en gomme de caroube purifiée obtenue après application des différentes étapes du procédé est de (51- 54%).

In fine, les deux méthodes de prétraitement des graines de caroube mises en place sont efficaces et industriellement faciles à appliquer permettant ainsi de récupérer toutes les parties de la graine avec une qualité et un rendement irréprochables et de donner l'opportunité de contrôler la réaction d'hydrolyse enzymatique et d'apporter plus d'optimisations en fonction de la réponse voulue.



Chapitre III :

Profils phytochimiques et activités antioxydantes du tégument et du germe des graines de caroube



I. Introduction

Les substances phytochimiques antioxydantes des plantes et les produits alimentaires agricoles sont récemment devenus un sujet attrayant pour les scientifiques de l'alimentation, de la biomédecine, de la nutrition et pour les producteurs d'aliments. Des milliers d'articles dans ce domaine sont publiés chaque année, et de nombreux projets de recherche connexes sont menés dans des instituts et des entreprises. Comparés aux antioxydants alimentaires synthétiques, les antioxydants des sources naturelles sont généralement reconnus comme sûrs pour les applications alimentaires. De plus, il a été confirmé que la plupart des substances phytochimiques ont des fonctions intéressantes sur la santé soit pour la prévention soit pour la thérapie de diverses maladies telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, les cancers, l'obésité et le diabète.

Après décorticage par méthode d'hydrolyse enzymatique des graines de caroube, les trois parties de la graine ont été récupérées, séchées et broyées dont le tégument. En effet, il existe très peu d'études sur la fraction de téguments en raison de la méthode employée pour l'extraction de la gomme : la méthode chimique. Effectivement, cette méthode comme précédemment détaillée se base sur la carbonisation de l'enveloppe tégumentaire qui est éliminée par lavage. Cependant, avec l'application de la nouvelle méthode de décorticage des graines entières, le tégument est récupéré avec un rendement de (18-20%).

Dans cette étude et afin de bien valoriser cette partie de la graine de caroube, nous avons établi son profil phytochimique, son activité antioxydante et antibactérienne. Par conséquent, ce chapitre est consacré à la détermination des différents métabolites secondaires présents dans le tégument et surtout les polyphénols, les flavonoïdes, les alcaloïdes et les tannins. En outre, l'activité antioxydante a été confirmée par quatre méthodes différentes : méthode de piégeage du radical libre de DPPH, le test de réduction de Fer (FRAP), le test de phosphomolybdène (PM) ainsi que le test de β -carotène. L'activité antibactérienne a été évaluée sur quatre souches : *Bacillus subtilis* ILP1428B, *Staphylococcus aureus* CIP543154, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27653 et *Escherichia coli* CIP5412.

Non seulement le tégument a été analysé, mais aussi la fraction du germe. Certes, le germe a été sujet de plusieurs recherches antérieures vu sa richesse en protéines. De ce fait, un criblage phytochimique des extraits du germe a été réalisé afin d'avoir un profil phytochimique plus détaillé de sa composition. Les teneurs en polyphénols, flavonoïdes totaux et tanins condensés ont été estimées. D'autre part, l'activité antioxydante a été évaluée grâce aux quatre tests déjà

cités. En outre, la dernière partie de ce chapitre présente les différentes étapes effectuées pour l'isolement et l'identification des molécules bioactives du TGC.

II. Matériels et méthodes

Les téguments et les germes des graines de caroube récupérés par traitement enzymatique avec les cellulases ont été soumis à une extraction par macération en utilisant trois solvants avec différentes polarités (acétate d'éthyle, acétone et méthanol). Après récupération des extraits, nous avons procédé à une analyse qualitative en effectuant un screening phytochimique afin de détecter les différentes familles phytochimiques présentes dans chaque extrait. Une analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes totaux et des tannins condensés a été aussi réalisée. En plus, nous avons testé l'activité antioxydante de chaque extrait en utilisant quatre méthodes différentes (DPPH, FRAP, TAC et β -carotène).

1. Préparation des extraits

Des extraits du tégument et du germe des graines de caroube ont été préparés selon un protocole standard de macération. 5 g du matériel végétal ont été mélangés avec 100 mL d'un mélange de solvant/eau à 70/30. Différents solvants de polarités croissantes ont été utilisés. Ainsi, les solvants qui ont été retenus pour la réalisation de notre étude sont : l'acétate d'éthyle (EtOAc), l'acétone et le méthanol (MeOH). Après macération pendant 24 h du mélange (5 g du matériel végétal + 100 mL EtOAc), le mélange a été filtré à travers un papier filtre Whatman (#1) et le résidu a été extrait à nouveau avec un volume égal du même solvant d'EtOAc. Après 48 heures, les deux extraits obtenus de l'EtOAc ont été regroupés, le solvant a été évaporé sous vide en utilisant un évaporateur rotatif puis stocké à 4°C. Le résidu a été récupéré et le même processus de macération a été répété pour les deux autres solvants d'acétone et de MeOH à 70%. Les deux extraits ont été évaporés sous vide en utilisant un évaporateur rotatif à la température d'évaporation de chaque solvant organique utilisé (T= 40-50°C). Les extraits secs obtenus ont été conservés dans des tubes et stockés à 4°C.

2. Screening phytochimique

Les tests de screening phytochimique des extraits d'EtOAc, d'acétone et de MeOH des téguments de graines de caroube ont été effectués selon des méthodes phytochimiques connues [217,218]. Différentes familles chimiques ont été recherchées en faisant les tests directement sur les téguments en poudre brute ainsi que sur les extraits obtenus après macération.

Chapitre III : Profils phytochimiques et activités antioxydantes du tégument et du germe des graines de caroube

a. Révélation des flavonoïdes

5 g du matériel végétal placés dans un Erlenmeyer sont infusés dans 50 mL d'eau distillée pendant 30 minutes. Après filtration, 2 mL d'infusé ont été prélevés et introduits dans 3 tubes à essai. Après dans chaque tube à essai on ajoute, 1 mL de NaOH, 1mL d'eau distillée et 1 mL de HCl concentré et des copeaux de Magnésium. En présence des flavonoïdes, les colorations suivantes rose-rouge ou bleu-mauve, jaune-rouge, rouge à rouge-violacé, rouge-foncé au violet ou bleu peuvent être observées. Ces couleurs correspondent respectivement aux anthocyanes, flavones, flavonones et isoflavones.

b. Révélation des alcaloïdes

20 g de poudre des téguments ont été mouillés dans 150 mL d'eau distillée pendant 24 h dans un bécher. Après filtration, le filtrat a été reparti dans différents tubes à essai pour être testé par deux réactifs.

- Réactif de Dragendorff (solution d'iodobismuthate de potassium) : après ajout de quelques gouttes du réactif dans le tube à essai, un précipité de couleur orange-rouge apparaît qui témoigne de la présence des alcaloïdes.
- Réactif de Mayer (solution de tétraiodomercurate de potassium) : après ajout de quelques gouttes du réactif dans le tube à essai, un précipité blanc apparaît qui témoigne de la présence des alcaloïdes.

c. Révélation des tannins

À 2 mL d'extrait brut sont additionnés quelques gouttes d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 2%. L'apparition d'une coloration bleue-noire ou verte-noire indique la présence de tannins.

d. Révélation des stéroïdes

1 mL d'extrait est mélangé avec 10 mL de chloroforme et un volume égal d'acide sulfurique. Une couche rouge apparaît et l'acide sulfurique forme un liquide jaune avec la fluorescence qui indiquent la présence des stéroïdes.

e. Révélation des terpénoïdes

Dans un tube à essai on introduit, 2 mL d'extrait et on ajoute 2 mL d'acide acétique anhydre et un volume l'acide sulfurique H_2SO_4 concentré. La formation d'une couleur bleu-vert indique la présence des terpénoïdes.

f. Révélation des saponines

Dans un tube à essai : 2 mL de l'extrait ont été mélangés avec 5 mL d'eau distillée puis agité vigoureusement. La formation d'une mousse (hauteur supérieure à 1 cm) stable, persistant pendant 1 h indique la présence abondante de saponines.

3. Dosages quantitatifs

3.1. Dosage des polyphénols totaux

Les polyphénols totaux des différents extraits du TGC et du germe de caroube ont été déterminés en utilisant la procédure de Folin-Ciocalteu [219]. En effet, le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué de l'acide phosphotungstique $H_3PW_{12}O_{40}$ et l'acide phosphomolybdique $H_3PMo_{12}O_{40}$. La réduction de ces acides en présence des phénols conduit à la formation d'un mélange d'oxyde bleu du complexe de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}) qui absorbe à 764 nm. Le protocole consiste à mélanger 20 μ L de chaque extrait avec 1,58 mL d'eau distillée et 100 μ L de réactif Folin-Ciocalteu. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex puis 300 μ L de carbonate de sodium saturé à 7,5% (m/v) ont été ajoutés. Après 30 min de repos à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 764 nm. La teneur en composés phénoliques totaux a été exprimée en mg équivalent d'acide gallique (EAG)/g d'extrait sec.

3.2. Dosages des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux a été réalisée selon la méthode décrite par (Brighente et *al.*, 2007) [220]. Cette méthode consiste à mélanger 1 mL de chaque extrait avec 1 mL de solution de $AlCl_3$ (2%). Les échantillons ont été incubés pendant 1 heure à une température ambiante. L'absorbance a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à $\lambda = 415$ nm. Les flavonoïdes totaux ont été exprimés en mg équivalent de quercétine par rapport à la courbe d'étalonnage standard de la quercétine (mg EQc/g d'extrait sec).

3.3. Dosage des tannins condensés

Les tanins condensés ont été déterminés par la méthode de la vanilline en milieu acide, comme indiqué par (Price et *al.*, 1978) [221]. 200 μ L de chaque échantillon ont été ajoutés au réactif de la vanilline (8% HCl, 37% méthanol et 4% de vanilline méthanolique). Ensuite, les tubes ont été placés dans un bain-marie à 30°C pendant 20 min. Cette méthode repose sur la capacité de la vanilline à réagir avec les tanins condensés en présence d'acide pour produire un complexe coloré dont l'absorbance est mesurée à 500 nm. Les résultats ont été exprimés en mg équivalent du catéchol /g d'extrait sec (mg ECAT/g d'extrait).

4. Activité antioxydante

4.1. Méthode de piégeage des radicaux libres DPPH

Cette méthode consiste à inhiber le DPPH un radical stable de couleur violette qui vire en couleur jaune lorsqu'il est réduit par un antioxydant. La méthode utilisée pour tester la capacité d'inhibition ou de piégeage du radical libre du DPPH est celle développée par (Brand-Williams et *al.*, 1995) [222]. En effet, 100 µL de chaque extrait du TGC et du germe de caroube à différentes concentrations (0 à 1 mg/mL) ont été ajoutés à 10 mL de la solution méthanolique du DPPH à 0,004%. Le mélange de 100 µL du méthanol avec 10 mL de la solution du DPPH est utilisé comme contrôle négatif. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard le BHT. Après 30 min, l'absorbance est mesurée à 517 nm. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH de chacune des extraits est calculé suivant [l'équation 1](#).

$$\% \text{ d'inhibition} = [(A_B - A_S)/A_B] \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

A_B est l'absorbance du contrôle et A_S l'absorbance de chaque concentration des extraits utilisés.

4.2. Méthode de la réduction du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur des extraits du TGC et du germe de caroube est déterminé par la méthode de FRAP. Cette technique est basée sur la réduction du fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en (Fe^{2+}) mesurée par spectrophotométrie à une absorbance de 700 nm. Brièvement, 0,5 mL de chaque extrait à différentes concentrations de (0 à 1mg/ mL) est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de potassium hexacyanoferrate $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. Après incubation du mélange pendant 20 min à 50°C, 2,5 mL d'acide trichloracétique à 10% ont été ajoutés. 2,5 mL de la couche supérieure ont été combinés avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1%. Un blanc en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée est préparé dans les mêmes conditions. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard (acide ascorbique ou acide gallique) dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [223].

4.3. Test de phosphomolybdène

La capacité antioxydante de chaque extrait du TGC et du germe de caroube a été évaluée par la méthode de phosphomolybdène [167,224]. Le test est basé sur la réduction du Mo(VI) en Mo(V) par un antioxydant et la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/Mo(V)) à pH

acide. 0,3 mL de chaque extrait à différentes concentrations (0,125 à 1 mg/mL) a été combiné avec 3 mL de la solution de réactif (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Les tubes contenant la solution de réaction ont été bouchés et incubés à 95°C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance de la solution a été mesurée à 695 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-visible (de double faisceau-Camspec-M550). La capacité antioxydante de chaque extrait a été exprimée en mg/mL équivalent d'acide ascorbique (AA).

4.4. Test du β -carotène

Le test de blanchiment du β -carotène est un test simple et direct permettant d'évaluer le pouvoir antioxydant d'un échantillon. La méthode suivie est celle reportée par (Taga et al., 1984 ; Barros et al., 2008) [172], [225] avec quelques modifications. Brièvement, 1 mg de β -carotène est mélangé avec 10 mL de chloroforme. Puis, 25 μ L d'acide linoléique et 200 mg de tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été évaporé à 40°C. 100 mL d'eau distillée sont ajoutés à la solution avec agitation pour former une émulsion. Un volume de 5 mL de l'émulsion avec 200 μ L de chaque extrait du TGC et du germe de caroube à différentes concentrations (0,125 à 1 mg/mL) ont été mélangés et incubés à 50°C. Le BHT a été utilisé comme un antioxydant standard. L'absorbance est mesurée à 470 nm à l'aide du spectrophotomètre UV-visible. Après 120 min, les résultats obtenus ont été comparés avec ceux du BHT. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique est calculé comme suit :

$$\% \text{ inhibition} = \left(1 - \frac{Abs_0 - Abst}{Abs_0' - Abst'} \right) \times 100$$

Dont Abs_0 et Abs_0' sont les absorbances au temps zéro de l'échantillon et du contrôle respectivement et abs_t et abs_t' de l'échantillon et du contrôle mesurées après 120 min.

5. Activité antibactérienne

5.1. Les souches testées

Les différents extraits (EtOAc, Acétone et MeOH) ont été testés pour leurs effets antibactériens. Pour cela, 4 souches bactériennes ont été utilisées : *Bacillus subtilis* ILP1428B, *Staphylococcus aureus* CIP543154 (Gram +) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27653, *Escherichia coli* CIP5412 (Gram -). Les souches utilisées ont été obtenues du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne de la Faculté des Sciences et Techniques de Fès.

5.2. Détermination des CMI et CMB

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée en utilisant la méthode de la microdilution comme décrit précédemment par (Bouhdid et *al.*, 2009 ; Soule et *al.*, 2017) [226], [227], avec de légères modifications. Les souches microbiennes ont été cultivées pendant 24 h à 37°C sur l'agar Luria-Bertani et ajustées à une concentration finale de 10^6 UFC/mL pour être utilisées comme un inoculum. La gélose à 0,15% (m/v) est utilisée comme émulsifiant et la résazurine est un indicateur de croissance bactérienne. Ainsi donc, 50 µL de Luria-Bertani ont été distribués du deuxième au 12^{ème} puits de la plaque de micro-titrage en polypropylène au 96^{ème} puits. 50 µL de la dilution scalaire sont transférés du deuxième au 1^{er} puits. Toutefois, la concentration initiale des différents extraits était de 100 mg/mL dans du DMSO à 2%. Le 12^{ème} puits a été considéré comme un contrôle de la croissance. Ensuite, 50 µL de la suspension bactérienne ont été ajoutés à chaque puits à une concentration finale d'environ 10^6 UFC/mL. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, 10 µL de résazurine ont été ajoutés à chaque puits pour évaluer la croissance bactérienne. La CMI a été déterminée comme étant la plus faible concentration d'extraits de tégument qui empêche un changement de couleur de la résazurine. La croissance bactérienne est détectée par réduction de la résazurine colorante bleue en résorufine rose. La concentration bactéricide minimale (CMB) correspond à la concentration la plus faible des extraits donnant des sous-cultures négatives après incubation à 37°C pendant 24 h. Il est déterminé en repérant 2 µL de puits négatifs sur des plaques LB.

III. Profil antioxydant, activité antioxydante et antibactérienne du TGC

1) Screening phytochimique

Les trois extraits du TGC obtenus par macération ont permis de classer les métabolites secondaires suivant leurs solubilités dans les différents solvants choisis. D'après le [Tableau 12](#), dans les deux extraits d'EtOAc et d'Acétone les métabolites secondaires recherchés ont été détectés, tandis que l'extrait méthanolique a révélé un test négatif pour les alcaloïdes et les flavonoïdes. Par contre, nous remarquons la détection des anthocyanes dans le même extrait méthanolique. Ce qui nous permet de conclure que les tests ne sont pas précis et peuvent ne pas détecter la présence de tous les sous-groupes des métabolites secondaires recherchés. Pour les tanins et les anthocyanes, ils sont présents dans les trois extraits.

Tableau 12 : Screening phytochimique des extraits de macération des téguments des graines de caroube dont (+) présence et (-) absence du groupe chimique.

	Alcaloïdes	Tanins	Flavonoïdes	Anthocyanes
EtOAc	+	+	+	+
Acétone	+	+	+	+
MeOH	-	+	-	+

2) Dosages quantitatifs

2.1. Dosage des polyphénols totaux

Le screening phytochimique des trois extraits a révélé la présence des polyphénols. Le [Tableau 13](#) reporte la teneur en polyphénols totaux estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'extrait d'acétone renferme la teneur la plus élevée en polyphénols totaux de (95,73 mg EAG/g d'extrait sec) suivi de l'EtOAc avec une teneur de (30,88 mg EAG/g d'extrait sec) et dernièrement l'extrait de MeOH (24,09 mg EAG/g d'extrait sec). Cependant, il faut noter que la teneur reportée par (Albertos et *al.*, 2015) [58] de l'extrait méthanolique des téguments de graines de caroube est de $(1722 \pm 84,4 \text{ mg EAG}/100 \text{ g d'ES})$. Certes, c'est une teneur faible par rapport à celle que nous avons trouvée pour l'ensemble des teneurs des trois extraits, mais la méthode de récupération des téguments n'était pas décrite pour expliquer davantage les résultats trouvés. Dans notre étude, même après une macération successive avec les différents solvants, l'extrait méthanolique a révélé une teneur importante en PT par rapport à celle trouvée par (Albertos et *al.*, 2015) [58] qui a utilisé pour l'extraction des PT seulement le solvant MeOH. D'autres études sur les gousses de caroube ont reporté que l'acétone est le meilleur solvant pour extraire des teneurs élevées en polyphénols et flavonoïdes [29]. Le même protocole de macération des gousses en utilisant quatre solvants de polarité croissante (Chloroforme, hexane, acétate d'éthyle et acétone) a confirmé que l'acétone à 70% permet d'extraire la teneur la plus élevée en PT [228]. Nos résultats sont en accord avec les études précédentes, vu que la teneur la plus élevée en polyphénols totaux était extraite par le solvant acétone à 70%.

Tableau 13 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits des Téguments des graines de caroube en mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait sec.

Extraits	PT en mg EAG/g d'ES
EtOAc	30,88 ± 0,07
Acétone	95,73 ± 0,01
MeOH	24,09 ± 0,11

2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

L'analyse quantitative des flavonoïdes totaux des extraits d'EtOAc, acétone et de MeOH des TGC a été évaluée par la méthode de AlCl_3 et les résultats sont regroupés dans le [Tableau 14](#). La teneur en flavonoïdes totaux a été exprimée en mg équivalent de quercétine EQe/g d'extrait sec (l'équation établie de la courbe standard $y = 1,564x - 0,0145$, $R^2 = 0,995$). La concentration des flavonoïdes totaux dans l'extrait acétonique était la plus élevée (63,08 mg EQe/g d'extrait sec) suivie de celle de l'extrait d'EtOAc avec environ (24,95 mg EQe/g d'extrait sec) et après l'extrait méthanolique avec (11,23 mg EQe/g d'extrait sec). Une étude antérieure de (Gohar et al., 2009) [54] a permis d'isoler et d'identifier six glycosides de flavanols de l'extrait méthanolique des graines de caroube. D'une part, cette étude a été la première de son genre et a investi la poudre de la graine de caroube entière pour l'extraction de ces flavonoïdes. D'autre part, cette étude a démontré la capacité du solvant MeOH à extraire les flavonoïdes. Cependant, dans notre étude l'acétone à 70% a permis de solubiliser une teneur plus importante de flavonoïdes que les autres solvants. Il a été déjà reporté que les flavonoïdes n'ont pas la même solubilité ainsi, des flavonoïdes peuvent être solubles dans des solvants à polarité élevée alors que d'autres peuvent être solubles dans des solvants de faible polarité. Toutefois, la teneur en flavonoïdes ou la composition phytochimique en générale ne dépend pas seulement des facteurs technologiques tels que les méthodes d'extraction et d'analyse, mais aussi de la qualité de la plante d'origine incluant l'origine géographique, les conditions climatiques, de la récolte et du stockage [229]. Dans ce contexte, une étude phytochimique de (Sebai et al., 2013) [230] a confirmé l'influence de la polarité des solvants sur l'extraction des flavonoïdes totaux de la pulpe et des graines de caroube de la Tunisie. Par conséquent, les extraits aqueux et éthanolique des graines ont renfermé les teneurs les plus élevées en FT de (8,63 et 5,81 mg/kg respectivement) que les extraits d'hexane, acétone et de MeOH.

Chapitre III : Profils phytochimiques et activités antioxydantes du tégument et du germe des graines de caroube

Tableau 14 : Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits des téguments des graines de caroube en mg équivalent de quercétine /g d'extrait sec.

Extraits	FT en mg EQe/g d'ES
EtOAc	24,95 ± 0,03
Acétone	63,08 ± 0,05
MeOH	11,23 ± 0,01

2.3. Dosage des tanins condensés

Les résultats de dosage des tanins condensés (TC) des différents extraits des TGC sont reportés dans le [Tableau 15](#). La teneur en TC est estimée en mg équivalent du catéchol ECAT/g d'ES par rapport à la courbe de régression ($y = 0,0007x + 0,012$; $R^2 = 0,995$). Contrairement aux PT et FT, la teneur la plus élevée en TC était renfermé dans l'extrait de MeOH avec (223,93 mg ECAT /g d'extrait). En revanche, les autres extraits d'Acétone et d'EtOAc ont révélé des teneurs modérées de (56,07 et 33,92 mg ECAT/g d'extrait) respectivement par rapport à celle du MeOH. La teneur en tanins est assez élevée dans les TGC, cependant vu que les tanins sont connus par leurs effets monogastriques non-souhaitables, plusieurs recherches ont été élaborées pour les éliminer alors qu'il est plus convenable de déterminer les conditions favorables pour bénéficier de leurs effets gastro-intestinaux [231]. La seule teneur reportée en TC de l'extrait méthanolique des téguments des graines de caroube est de 1350 (± 50) mg équivalent en leucocyanidine/100 g d'extrait sec [58]. Une teneur faible par rapport à celle que nous avons trouvé. Par ailleurs, la teneur en tanins de la filière du caroubier a fait sujet de plusieurs études surtout la partie des gousses dont une teneur de 2,75 mg équivalent (+) catéchine /g d'extrait sec a été reportée [22]. Par conséquent, il faudra noter que l'acétone, à 70%, a été plus efficace pour extraire les tanins que le méthanol à 70% [55]. En revanche, notre étude a confirmé le contraire et le méthanol à 70% était plus efficace pour extraire plus que le triple de la teneur en tanins condensés que les autres solvants.

Tableau 15 : Teneurs en tanins condensés des extraits des téguments des graines de caroube en mg équivalent du catéchol/g d'extrait sec.

Extraits	mg ECAT/g d'ES
EtOAc	33,92 ± 0,03
Acétone	56,07 ± 0,03
MeOH	223,93 ± 1,07

3) Activité antioxydante

3.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité antioxydante des extraits d'acétate d'éthyle, acétone et de MeOH a été évaluée avec le test de piégeage des radicaux libres de DPPH. Les résultats sont représentés dans la [Figure 42](#), les trois extraits des TGC exercent une activité antioxydante importante surtout l'extrait d'acétone qui était le plus efficace avec un pourcentage arrivant à 93% vs. BHT (87%). Ajoutant aussi, la concentration qui inhibe 50% du radical libre de DPPH (IC₅₀) pour l'extrait d'acétone a été plus petite (0,044 mg/mL) que celle du BHT (0,15 mg/mL). Les autres extraits ont été efficaces aussi mais l'extrait acétonique était le plus puissant suivi de l'extrait d'EtOAc puis le MeOH. Comme précédemment reporté, l'extrait d'acétone est très riche en polyphénols et flavonoïdes totaux ce qui argumente la forte activité antioxydante de cet extrait vu que les polyphénols et les flavonoïdes ont déjà confirmé leurs forte activité antioxydante [53], [91].

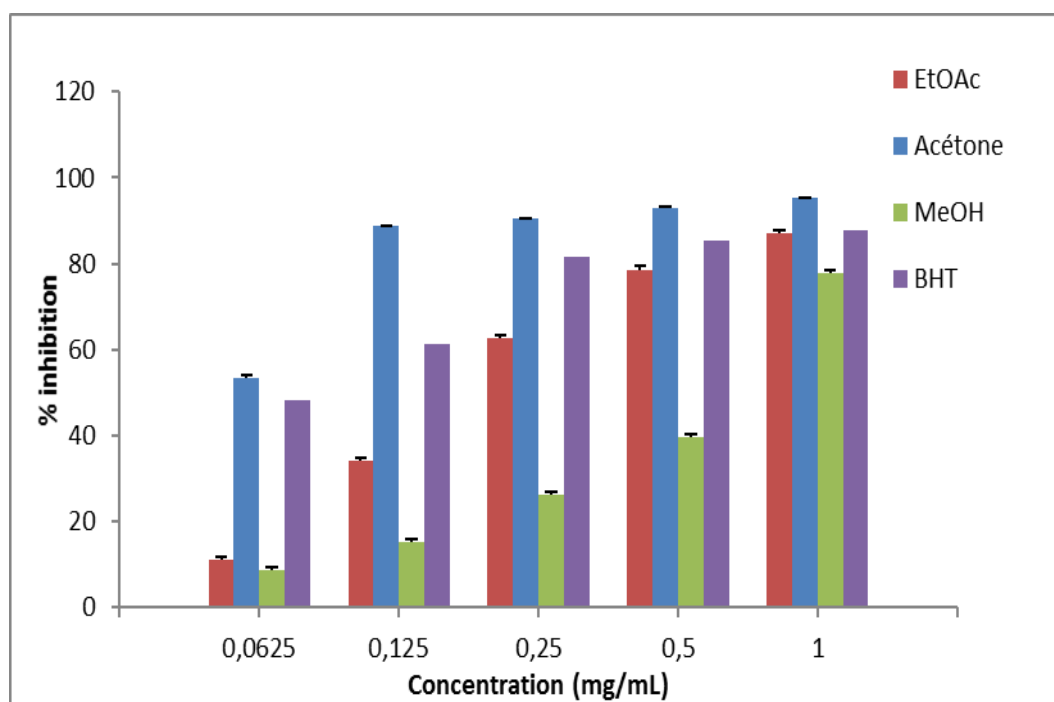


Figure 42 : Activité du piégeage du radical libre DPPH par les extraits des TGC vs. BHT

3.2. Test de la réduction du fer (FRAP)

Dans le test précédent du DPPH, l'extrait d'acétone était le plus puissant entre les trois extraits utilisés. Certes, les trois extraits ont une activité réductrice modérée par rapport aux antioxydants de référence (acide ascorbique et acide gallique) mais les extraits d'EtOAc et de MeOH ont révélé une activité réductrice plus puissante que l'extrait d'acétone. L'activité

antioxydante ou réductrice a été toujours corrélée avec le contenu en métabolites secondaires, c'est-à-dire que plus cet extrait contient des quantités importantes en polyphénols et flavonoïdes plus cet extrait révèle une activité antioxydante et un pouvoir réducteur puissant surtout les flavonoïdes qui sont connus pour leurs effets antioxydants que ce soit de piégeage des radicaux libres ou la complexation des métaux [90], [232]. Cependant, malgré que l'extrait d'acétone contienne la teneur la plus importante en PT et FT son activité réductrice était moins puissante que les autres extraits ([Figure 43](#)). C'est justement pour cette raison que l'activité antioxydante est confirmée par la réalisation de trois différents tests antioxydants ou plus.

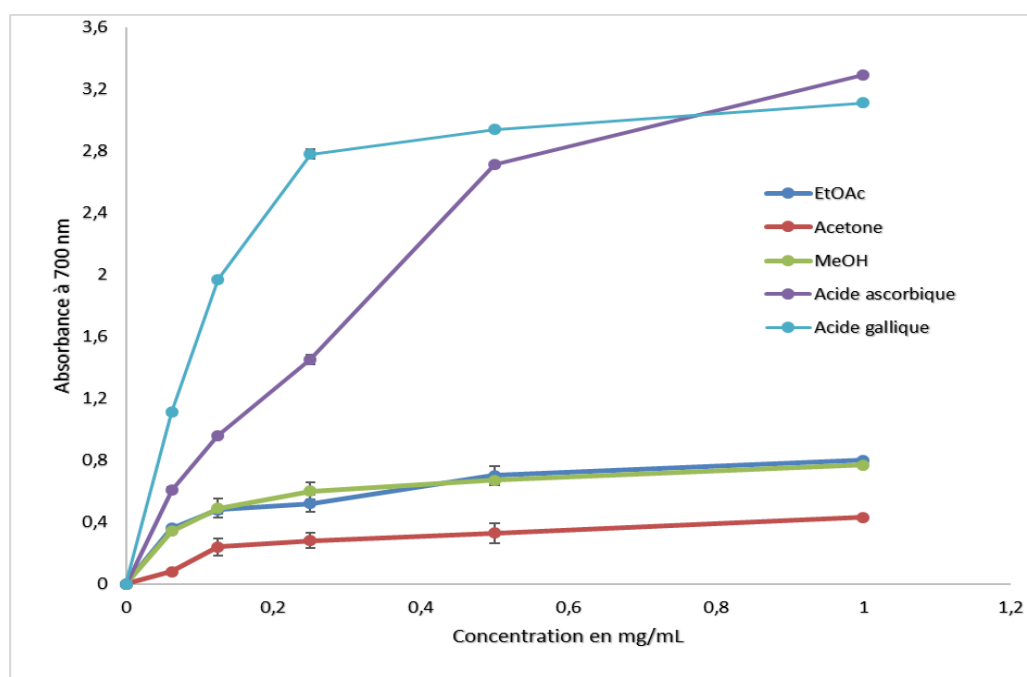


Figure 43 : Pouvoir réducteur des extraits des TGC (EtOAc : acétate d'éthyle, MeOH : Méthanol et Acétone) vs. Acide ascorbique et acide gallique

3.3. Test de phosphomolybdène

La capacité antioxydante des extraits d'EtOAc, acétone et de MeOH des TGC est évaluée par le test de phosphomolybdène. Ce test est basé spécifiquement sur une auto-oxydation durant une période prolongée de 90 min à une température élevée de 95°C [168]. Ce test est exprimé en mg/mL équivalent d'acide ascorbique (équation de la courbe standard : $y = 0,0037x + 0,0343$; $R^2 = 0,991$). Les résultats de la capacité antioxydante totale des extraits d'EtOAc, acétone et de MeOH sont illustrés dans la [Figure 44](#). La capacité antioxydante totale de chacun des extraits a été comparée avec celle de l'acide gallique. Tous les extraits révèlent des capacités antioxydantes importantes mais l'extrait d'acétone exerce une capacité antioxydante importante qui augmente lorsque la concentration augmente. L'extrait d'acétone dans cette étude a confirmé sa capacité réductrice ainsi que sa capacité à piéger les radicaux libres. En effet, les

polyphénols peuvent à la fois réagir comme donneurs d'électrons et comme donneurs d'hydrogènes pour convertir les radicaux libres en radicaux stables et cela a été aussi confirmé par les résultats du test DPPH et par le présent test de phosphomolybdène [233].

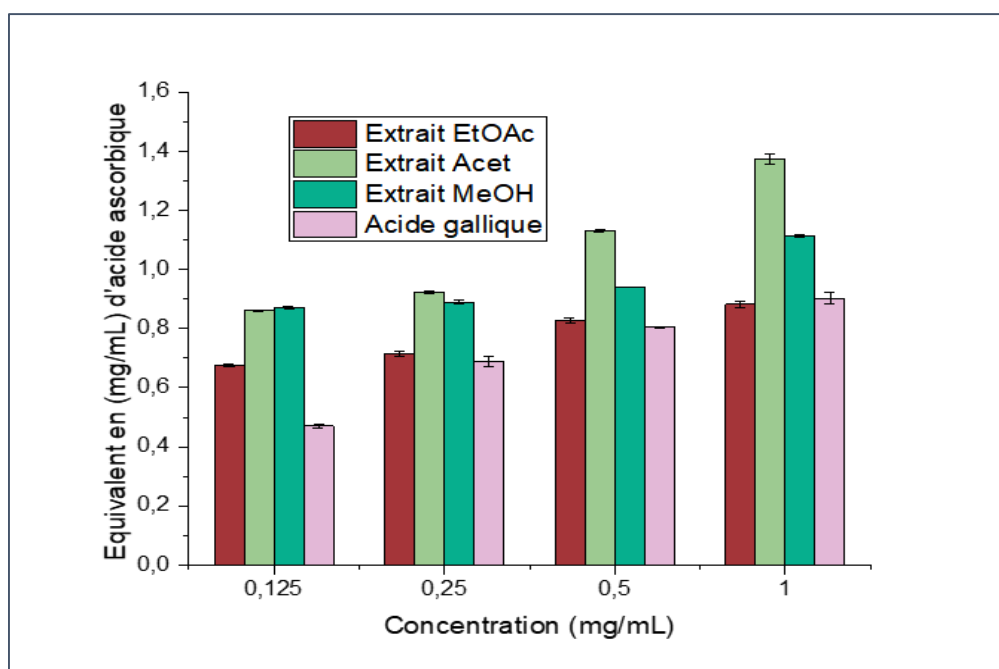


Figure 44 : Capacité antioxydante totale des extraits des TGC (acétate d'éthyle (EtOAc), acétone et méthanol (MeOH)) vs. Acide gallique

3.4. Test de β -carotène

Le β -carotène est un antioxydant important qui joue un rôle crucial dans la protection contre la peroxydation lipidique des tissus. L'effet inhibiteur contre la décoloration du β -carotène est estimé en évaluant l'inhibition des composés organiques volatils et la formation des hydroperoxydes de diènes conjuguées résultant de l'oxydation de l'acide linoléique et qui attaquent le β -carotène et provoquent la disparition de sa coloration jaune caractéristique [234]. Comme indiqué dans la [Figure 45](#), l'extrait d'EtOAc présente une capacité antioxydante élevée par rapport à l'extrait d'acétone et de MeOH. Les résultats ont été analysés en utilisant différentes concentrations de (0,125 à 1 mg/mL). A cette dernière concentration les différents extraits ont présenté des activités antioxydantes assez importantes par les méthodes DPPH, FRAP et PM. De même dans le présent test, les extraits d'EtOAc, d'acétone et de MeOH ont été plus puissants avec un pourcentage moyen d'inhibition de la décoloration du β -carotène d'environ ($58,29 \pm 0,02\%$) supérieur à celui du BHT ($55,45\%$). Ce test vient confirmer d'une part les résultats des précédents tests antioxydants et d'autre part la puissante activité antioxydante du tégument des graines de caroube.

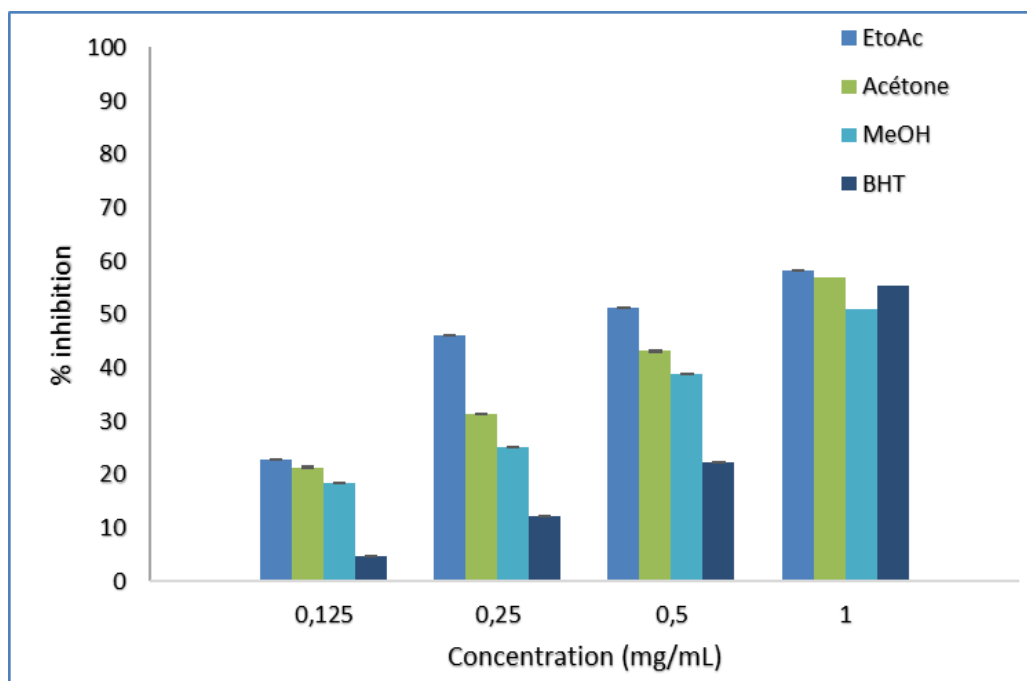


Figure 45 : Pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène/ peroxydation de l'acide linoléique par les extraits des TGC vs. BHT

4) Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des extraits de téguments a été testée contre quatre souches : *Bacillus subtilis* ILP1428B, *Staphylococcus aureus* CIP543154 (Gram +) et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27653, *Escherichia coli* CIP5412 (Gram -). Les résultats de ce test sont reportés dans le [Tableau 16](#). En effet, les métabolites secondaires dont les polyphénols sont inclus jouent un rôle très important dans la lutte contre les pathogènes notamment en inhibant directement la croissance bactérienne par l'inhibition des enzymes dégradant les parois, ou en tant que précurseurs dans la formation de barrières physiques telles que la lignine [235]. Les feuilles de *Ceratonia siliqua* ont été aussi testées précédemment contre 11 microorganismes dont *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Ainsi tous les extraits de feuilles (n-hexane, MeOH, éthanol, EtOAc et eau) ont confirmé une activité inhibitrice importante en raison essentiellement de leurs richesses en polyphénols [40], [236], [237]. D'autre part, tous les extraits du tégument des graines de caroube ont une activité inhibitrice intéressante contre tous les microorganismes à l'exception de *E. coli* qui a été très résistante. Cependant, l'extrait d'EtOAc et d'acétone ont prouvé une activité inhibitrice plus puissante que l'extrait de MeOH surtout l'extrait d'EtOAc qui a justifié une puissante activité inhibitrice contre *B. subtilis* avec une CMI de (1,5 mg/mL). Toutefois, l'extrait d'acétone a aussi exercé une activité importante avec des CMI

Chapitre III : Profils phytochimiques et activités antioxydantes du tégument et du germe des graines de caroube

moyennement faibles en comparaison avec l'extrait de MeOH qui était le moins performant avec des CMI plus grande de (15 mg/mL) contre *P. aeruginosa* et *S. aureus*. En outre, en se référant aux résultats de la CMB des extraits, nous constatons que l'extrait de MeOH n'a été efficace que sur la *S. aureus* mais avec une CMB atteignant les (30 mg/mL). Cette dernière est une concentration très supérieure par rapport à celle de l'extrait d'EtOAc (7,5 mg/mL) et d'acétone (12,5 mg/mL). Les études antérieures ont reportées des CMI de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle des gousses de caroube de (0,62 à 1,25 mg/mL) pour les souches de Gram + et de (1,25 à 2,5 mg/mL) pour les souches de Gram- [8]. Notre étude est d'une très grande importance surtout que *S. aureus* est connue pour sa résistance contre de nombreuses familles phytochimiques [238]. Cette activité est due essentiellement à la richesse des téguments des graines de caroubes en polyphénols et en flavonoïdes qui agissent comme agents bactéricides et bactériostatiques en altérant la synthèse de la membrane cellulaire, l'inhibition de l'acide nucléique et le métabolisme de diverses souches bactériennes [239]. Les antibiotiques, comme la polymyxine utilisée pour le traitement de l'infection bactérienne (Gram-) exerce un effet considérable contre les membranes des cellulaires avec une CMI de 8 µg/mL [226].

Tableau 16 : CMI et CMB des extraits des téguments des graines de caroube

	CMI (mg/mL)			CMB (mg/mL)		
	EtOAc	Acétone	MeOH	EtOAc	Acétone	MeOH
<i>B. subtilis</i>	1,5	3,125	7,5	3	6,25	-----
<i>P. aeruginosa</i>	6	6,25	15	24	50	-----
<i>E. coli</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----
<i>S. aureus</i>	7,5	3,125	15	7,5	12,5	30

IV. Profil phytochimique, activité antioxydante du germe

1. Screening phytochimique du germe

Le screening phytochimique a été réalisé sur le germe des graines de caroube brute. Le [Tableau 17](#) résume la contenance des extraits du germe en métabolites secondaires. D'après les résultats obtenus nous observons que le germe est très riche en molécules bioactives à effet thérapeutique très intéressant à l'exception de quelques sous-familles. Toutes les familles recherchées ont été détectées dans le germe montrant ainsi la diversification et l'importance portée à cette fraction

Chapitre III : Profils phytochimiques et activités antioxydantes du tégument et du germe des graines de caroube

des graines de caroube surtout dans les produits diététiques. Notamment, nous avons détecté la présence des alcaloïdes, flavonoïdes et tanins dans les trois extraits à l'exception des alcaloïdes dans l'extrait d'acétone, et les anthocyanes dans l'extrait méthanolique.

Une étude antérieure a déjà révélé la richesse de l'extrait méthanolique en polyphénols, flavonoïdes et tanins. Aussi bien, elle a révélé la présence de la théophylline comme alcaloïde abondant dans le germe de caroube [80]. La décoction du germe a aussi révélé l'existence des polyphénols et des flavonoïdes dans la décoction du germe de caroube [240].

Tableau 17 : Screening phytochimique des extraits de macération des germes des graines de caroube dont (+) présence et (-) absence du groupe chimique.

	Alcaloïdes	Tannins	Flavonoïdes	Anthocyanes
EtOAc	+	+	+	+
Acétone	-	+	+	+
MeOH	+	+	+	-

2. Dosages quantitatifs

2.1. Les polyphénols totaux

Les résultats du dosage des polyphénols totaux des extraits des germes de caroube sont rapportés dans le [Tableau 18](#). En effet, la quantité la plus élevée en polyphénols totaux a été trouvée dans l'extrait acétonique avec (20,35 mg EAG/g d'ES) suivi de l'extrait d'EtOAc (11,84 mg EAG/g d'ES) ensuite l'extrait de MeOH avec (8,8 mg EAG/g d'ES). La même succession des solvants a été trouvée pour les extraits du tégument. Les teneurs trouvées dans notre étude sont différentes de celles publiées par d'autres études vu qu'elles n'ont pas suivi la même méthode d'extraction ainsi qu'ils n'ont pas utilisé les mêmes solvants. Nous avons choisi de faire une macération successive en utilisant trois solvants de polarités croissantes afin de déterminer le solvant approprié pour extraire la plus grande teneur en polyphénols. En comparant avec une étude antérieure réalisée sur l'extrait méthanolique du germe de caroube du Portugal, une teneur en PT de (32,9 mg EAG/g d'extrait sec) a été reporté par (Custódio et al., 2011) [80]. Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons trouvé de la teneur des PT dans l'ensemble des extraits étudiés (41 mg EAG/g d'extrait sec).

Chapitre III : Profils phytochimiques et activités antioxydantes du tégument et du germe des graines de caroube

Tableau 18 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits des germes des graines de caroube en mg équivalent d'acide gallique/g d'extrait sec.

Extraits	mg EAG/g d'ES
EtOAc	11,84 ± 0,03
Acétone	20,35 ± 0,02
MeOH	8,8 ± 0,02

2.2. Les flavonoïdes totaux

Les résultats des teneurs en flavonoïdes totaux des extraits des germes de caroube sont reportés dans le Tableau 19. L'extrait d'acétone a révélé la teneur la plus élevée en flavonoïdes totaux avec (22,63 mg EQe/g d'extrait sec) suivi de l'extrait de MeOH (19,02 mg EQe/g d'extrait sec) puis après l'extrait d'acétate d'éthyle avec (10,13 mg EQe/g d'extrait sec). En comparaison avec les résultats trouvés du dosage des flavonoïdes totaux des extraits de tégument, nous n'avons pas trouvé la même succession des solvants d'extraction des FT des extraits du germe de caroube. La présence d'une aussi grande quantité de flavonoïdes totaux dans le germe que dans le tégument laisse à conclure qu'une partie importante des flavonoïdes déjà identifiée dans les graines de caroube appartient à la fraction du germe surtout que ces flavonoïdes ont été extraits par le méthanol [54] qui renferme dans notre étude aussi une teneur appréciable en FT. Par conséquent, nous pouvons argumenter les différentes utilisations du germe dans différents produits diététiques et thérapeutiques par l'importance nutritive et thérapeutique des flavonoïdes.

Tableau 19 : Teneurs en flavonoïdes totaux des extraits des germes des graines de caroube en mg équivalent de quercétine/g d'extrait sec.

Extraits	mg EQe /g d'ES
EtOAc	10,13 ± 0,2
Acétone	22,63 ± 0,3
MeOH	19,02 ± 0,01

2.3. Les tanins condensés

Les résultats obtenus des absorbances des tanins condensés des différents extraits ont été exprimés en mg équivalent du catéchol par g d'extrait sec (mg ECAT/g d'ES). Conformément

aux résultats du [Tableau 20](#), les teneurs en TC extraites par les trois solvants ont été très proches surtout ceux de l'extrait d'acétate d'éthyle et du MeOH avec respectivement (73,30 mg ECAT/g d'ES) et (71,25 mg ECAT/g d'ES). Certes, nos résultats sont en cohérence avec ceux obtenus par (Avallone et *al.*, 1997) [22] qui a mentionné l'efficacité de l'acétone avec (70%) pour l'extraction des tanins vu qu'une teneur importante aussi a été extraite par l'acétone avec (60,53 mg ECAT/g d'ES). En outre, la teneur en tanins condensés reportée du germe de caroube est de 16,2 mg/g d'extrait sec en équivalent à la (+) catéchine [53]. Les tanins du germe ont fait l'objet de plusieurs études vu qu'il a été approuvé qu'ils peuvent réduire l'activité du trypsine ainsi qu'ils peuvent réduire la digestibilité des protéines en se liant directement à certaines parties de la molécule de protéine ou en inhibant de façon non compétitive des enzymes digestives [15], [241]. Ajoutant à celles-ci que les tanins contenus dans le germe de caroube peuvent créer des problèmes d'appétence en raison de leur goût astringent réduisant ainsi son utilisation directe dans les aliments. En revanche, il est suggéré d'appliquer un chauffage à 121°C pendant 25 min permettant ainsi la désactivation des substances anti-nutritives du germe de caroube [51].

Tableau 20 : Teneurs en tanins condensés des extraits des germes des graines de caroube en mg équivalent du catéchol/g d'ES.

Extraits	mg ECAT/g d'ES
EtOAc	73,30 ± 0,4
Acétone	60,53 ± 0,1
MeOH	71,25 ± 0,1

3. Activité antioxydante

3.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

Les extraits du germe de caroube ont été testés pour leurs activités anti-radicalaire en utilisant le test de piégeage du radical libre DPPH. Les résultats de ce test sont illustrés sur la [Figure 46](#) montrant le pourcentage d'inhibition du radical DPPH par les extraits du germe de différentes concentrations. Les extraits d'Acétone et de MeOH ont été les plus performants en comparaison avec l'antioxydant de référence utilisé dans ce test le BHT. Cependant, l'activité antioxydante de l'extrait d'EtOAc était modérée vu que même avec 1 mg/mL, l'inhibition du DPPH n'a pas achevé les 50%. L'activité antioxydante des deux extraits d'acétone et de MeOH revient

essentiellement à leur haute contenance en métabolites secondaires surtout ceux dosés dans cette étude. Le pourcentage d'inhibition de l'extrait d'acétone à 1 mg/mL atteint 85% est très proche de celui du BHT à la même concentration (87%). En revanche, l'extrait méthanolique du germe était très puissant dans une étude récente de (Rico et *al.*, 2019) [81] inhibant ainsi le radical libre de DPPH à (92,59%). La différence peut être expliquée par l'extraction successive par les différents solvants épuisant ainsi l'extrait méthanolique des molécules bioactives.

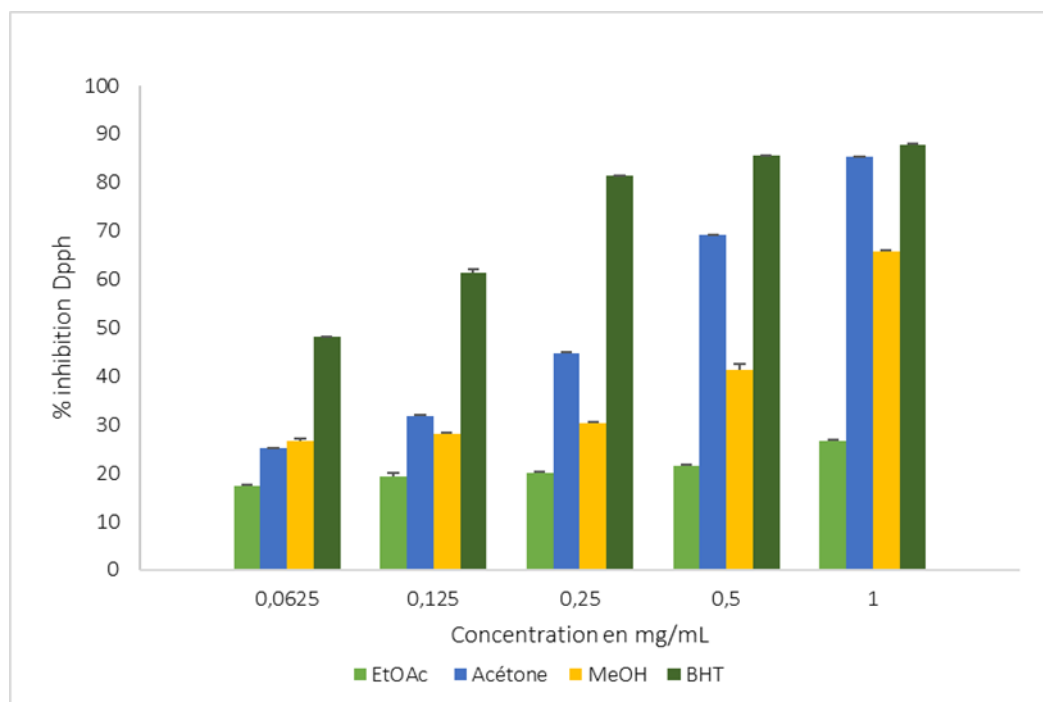


Figure 46 : Activité du piégeage du radical libre DPPH par les extraits des germes de graines de caroube vs. BHT

3.2. Test de la réduction du fer (FRAP)

L'activité réductrice des trois extraits des germes a été réalisée par le test de FRAP dont les résultats sont rapportés sur la [Figure 47](#). L'acide gallique a été pris comme antioxydant de référence, ainsi nous observons clairement son pouvoir réducteur. Les trois extraits du germe montrent une activité réductrice du Fer importante dont l'extrait d'acétone a montré une activité plus puissante que les autres extraits d'EtOAc et de MeOH. Cela est en accord avec les autres études investies sur l'extrait méthanolique du germe et de l'étude réalisée sur l'extrait aqueux du germe qui a montré une activité réductrice importante du germe en utilisant la même méthode [81,117]. Par conséquent, cette activité est expliquée par la corrélation positive entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante. En outre, certaines synergies entre les

composés phénoliques d'un extrait naturel peuvent être responsables de l'activité antioxydante exercée par le germe de caroube [240]. En effet, nous avons choisi ce test pour sa rapidité et sa simplicité de réalisation, et la réaction est reproductible et liée linéairement à la concentration de ou des antioxydants présents [164]. Toutefois, d'autres tests ont été réalisés pour confirmer les propriétés antioxydantes du germe de caroube.

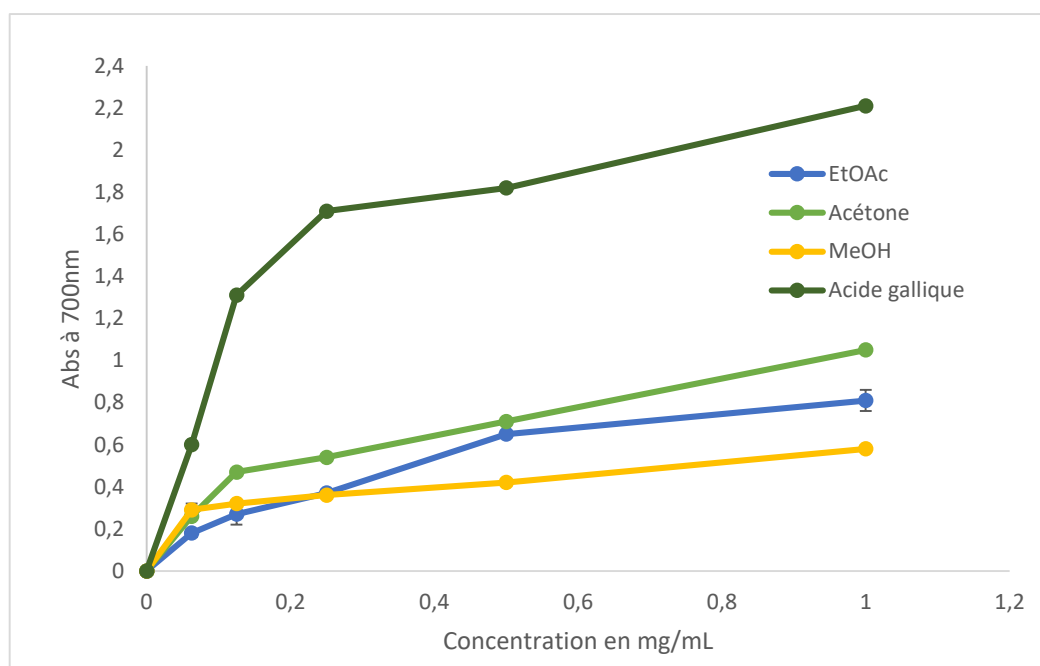


Figure 47 : Pouvoir réducteur des extraits des germes de caroube (EtOAc : acétate d'éthyle, MeOH : Méthanol et Acétone) vs. Acide gallique.

3.3 Test de phosphomolybdène

La capacité antioxydante totale des extraits d'EtOAc, acétone et de MeOH des germes de caroube est représentée dans la [Figure 48](#) en comparaison avec le BHT, et exprimée en mg/mL équivalent d'acide ascorbique (AA). Tous les extraits révèlent des capacités antioxydantes importantes cependant l'extrait méthanolique a exercé la plus importante capacité antioxydante qui augmente en augmentant la concentration. Effectivement, l'extrait d'acétone vu sa richesse en molécules bioactives a aussi montré une capacité antioxydante puissante par rapport à l'antioxydant de référence mais celui du MeOH avait un effet plus marquant dans ce test. Les extraits d'acétone et de MeOH ont confirmé la capacité antioxydante du germe déjà observée avec le test de DPPH. En effet, lorsqu'un extrait a un pouvoir réducteur puissant ceci indique qu'il est un donneur d' e^- , ainsi pouvant réduire les oxydants intermédiaires dans le processus de

la peroxydation des lipides [163]. Donc, cela confirme la capacité antioxydante du germe de caroube.

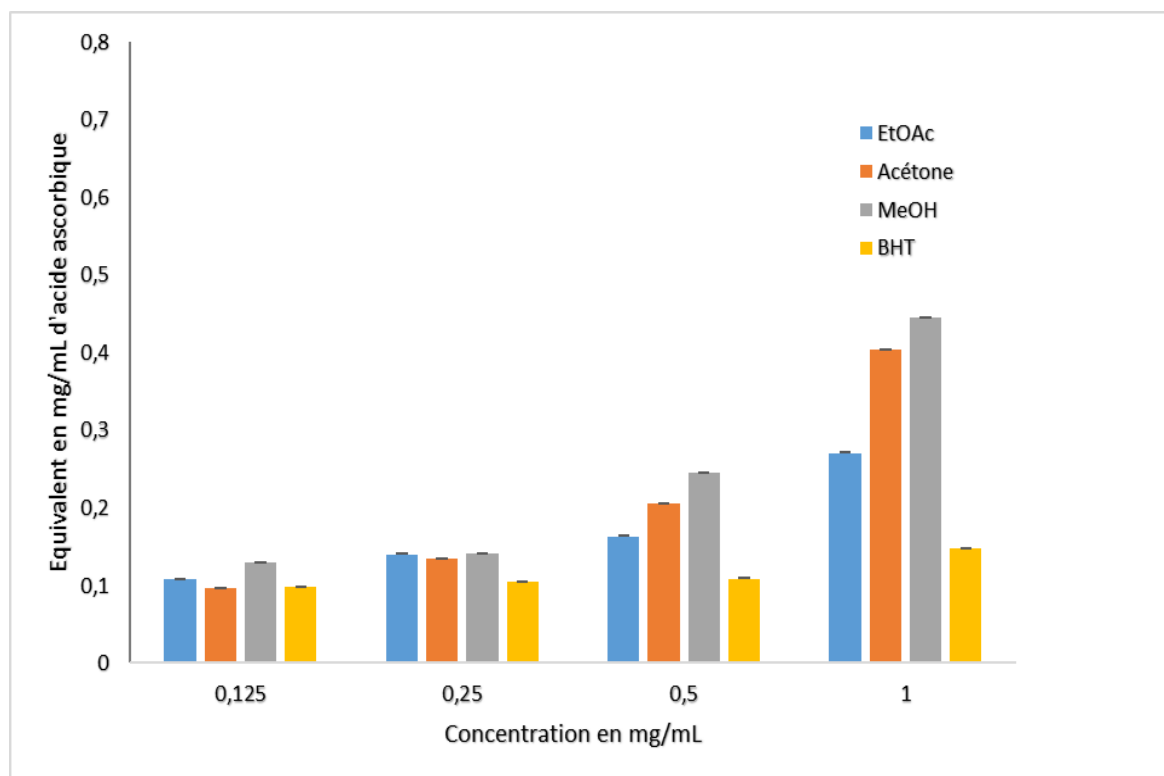


Figure 48 : Capacité antioxydante totale des extraits des germes de caroube vs. BHT. Les résultats sont présentés en mg/mL équivalent d'acide ascorbique.

3.4 Test de β -carotène

La [Figure 49](#) illustre l'effet inhibiteur contre la décoloration du β -carotène des trois extraits des germes de caroube en comparaison avec le BHT. En effet, l'extrait d'EtOAc, d'acétone et de MeOH ont été plus performants contre la décoloration du β -carotène que le BHT. L'extrait d'acétone était plus efficace à des concentrations minimales mais avec l'augmentation de la concentration, les trois extraits ont exprimé une activité inhibitrice aux alentours des (60%). En outre, en raison de ses onze paires de doubles liaisons, qui sont extrêmement sensibles à l'oxydation, le β -carotène est extrêmement sensible à l'oxydation induite par les radicaux libres produits de l'oxydation de l'acide linoléique [242]. Par contre, les extraits du germe de caroube ont confirmé une capacité antioxydante très importante faisant de cette fraction un composé antioxydant puissant pouvant ainsi prévenir et remédier à plusieurs maladies chroniques liées au stress oxydatif.

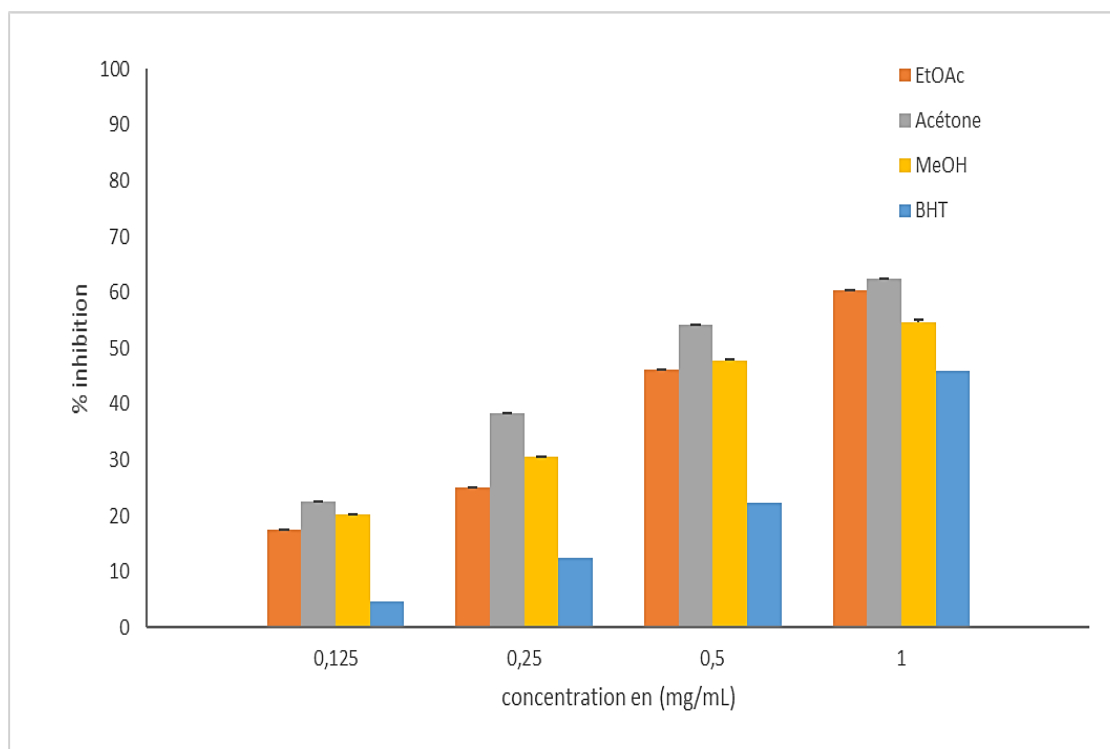


Figure 49 : Pourcentage d'inhibition de la décoloration du β -carotène/ peroxydation de l'acide linoléique par les extraits des germes de caroube (EtOAc : Acétate d'éthyle, Acétone et Méthanol : MeOH) vs. BHT.

IV. Isolement des molécules bioactives du TGC

La méthode utilisée pour l'extraction des différents composants des TGC est la méthode utilisant l'appareil Soxhlet. En effet, cette méthode en plus de son efficacité, permet d'obtenir un rendement élevé en extrait vu que l'appareil permet d'extraire les constituants de la poudre d'une manière continue [243]. Le procédé général repose sur la mise en contact du condensat de différents solvants à polarité différentes avec un échantillon en poudre (placée dans une cartouche en papier filtre). La condensation des vapeurs du solvant d'extraction chauffé est effectuée grâce à un réfrigérant à eau. Le retour du liquide dans le ballon du solvant permet son enrichissement en composants solubles. Ce cycle est répété pendant plusieurs heures (de 6 à 48 h) jusqu'à épuisement totale du solide.

1. Préparation des extraits

100 g de la poudre des TGC ont été soumis à une extraction solide-liquide par un appareil Soxhlet en utilisant trois solvants de polarités différentes. Les solvants utilisés sont l'hexane, l'acétate d'éthyle et le méthanol (500 mL) pendant des cycles d'extraction de 24 à 48 h. Par

ailleurs, l'extrait d'Hexane a été directement évaporé à sec. Alors que les extraits d'EtOAc et de MeOH ont été filtrés avant évaporation à sec ($T = 40-50^{\circ}\text{C}$). Ces derniers contiennent des précipités notés P1 d'une masse de $m = 0,21\text{ g}$ et P2 d'une masse de $m = 1,22\text{ g}$ des extraits d'EtOAc et de MeOH respectivement.

2. Extraction des alcaloïdes totaux

Après évaporation à sec, l'extrait méthanolique a été soumis à d'autres étapes afin d'extraire les alcaloïdes totaux (AT). Sur le marc récupéré après extraction avec le solvant éthylique, nous avons ajouté 15 mL d'ammoniaque NH_4OH à 25%. Cette étape permet essentiellement de libérer les alcaloïdes contenus dans la poudre qui sont sous forme de sels. Ces alcaloïdes libérés sont récupérés avec un solvant organique (CH_2Cl_2 , EtOH ou MeOH) qui est dans notre cas le MeOH. Avant évaporation à sec, l'extrait méthanolique a été filtré. Un précipité noir a été récupéré et noté (P2). Le filtrat a été concentré par évaporation à sec à 40°C . L'extrait sec a été solubilisé dans une solution d'acide chlorhydrique à 5% ($\text{pH} = 1-2$). Une étape de filtration a été effectuée permettant d'obtenir la phase aqueuse acidifiée contenant les sels d'alcaloïdes. Par la suite, nous avons effectué un lavage avec l'hexane ($\times 3$) afin d'éliminer les produits non désirés. Une basification avec l'ammoniaque à 25% à un pH de (9-10) a été effectuée en présence d'un solvant organique non miscible avec l'eau. La phase organique du dichlorométhane (CH_2Cl_2) est récupérée, séchée avec le sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis l'extrait est évaporé à 40°C . L'extrait sec obtenu, est celui des alcaloïdes totaux (AT) du TGC. L'ensemble des étapes suivies sont illustrées sur la [Figure 50](#). Le rendement en alcaloïdes totaux est de 1,64%.

Chapitre III : Profils phytochimiques et activités antioxydantes du tégument et du germe des graines de caroube

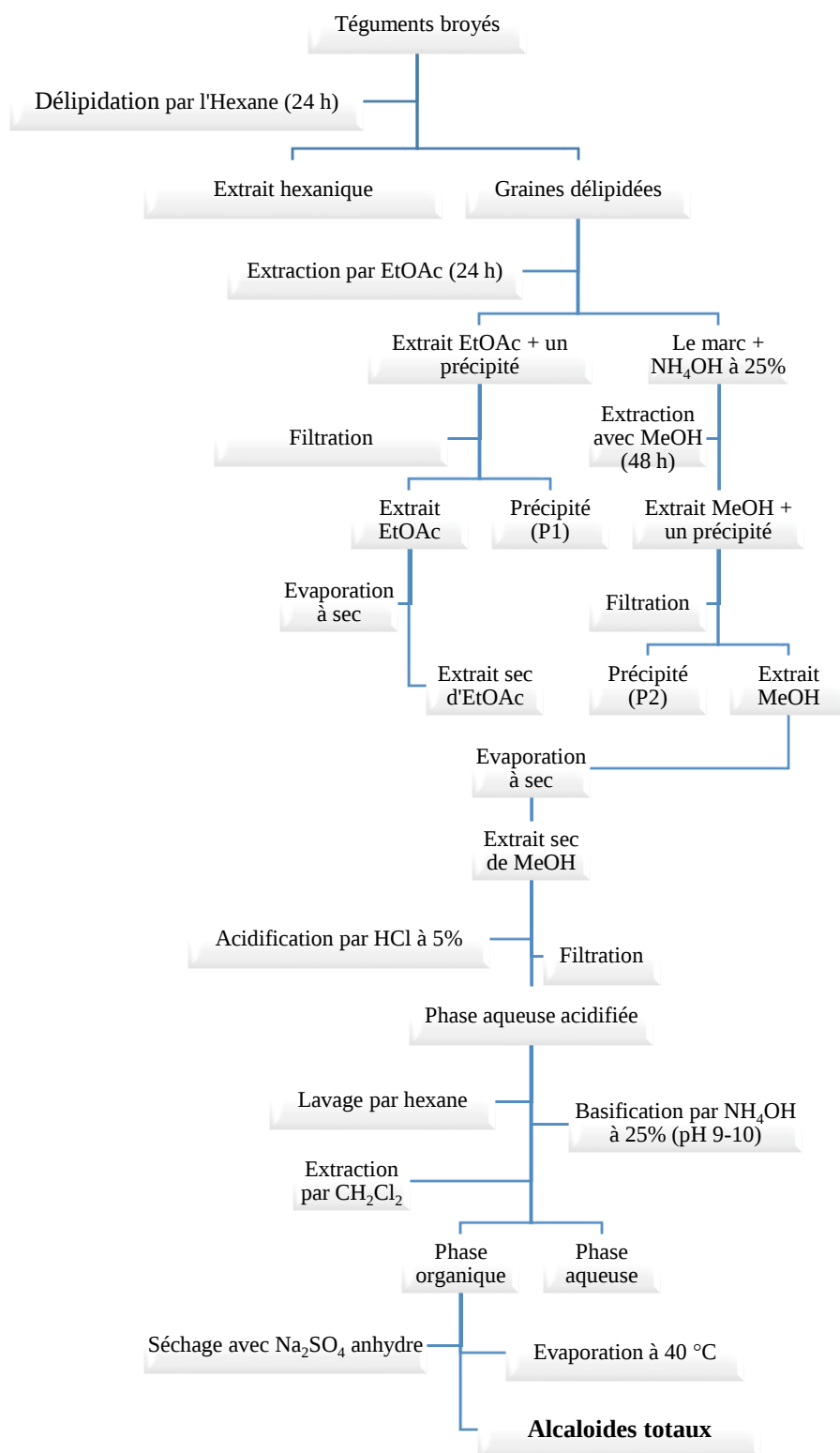


Figure 50 : Schéma des différentes étapes de préparation des extraits par appareil Soxhlet et d'extraction des alcaloïdes totaux en milieu alcalin.

3. Chromatographie Liquide à Haute Performance (HPLC)

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée pour déterminer la pureté des fractions isolées. La chaîne HPLC utilisée est de marque Shimadzu, équipée d'une pompe quaternaire, détecteur DAD dont la phase mobile est constituée du mélange A : Méthanol/ acétonitrile 50/50 et du mélange B : eau acidifiée par 0,2% acide ortho phosphorique ([Figure 51](#)). Cette analyse a été effectuée au Laboratoire de Biotechnologie, Environnement, Agroalimentaire et Santé de la Faculté des Sciences de Fès.

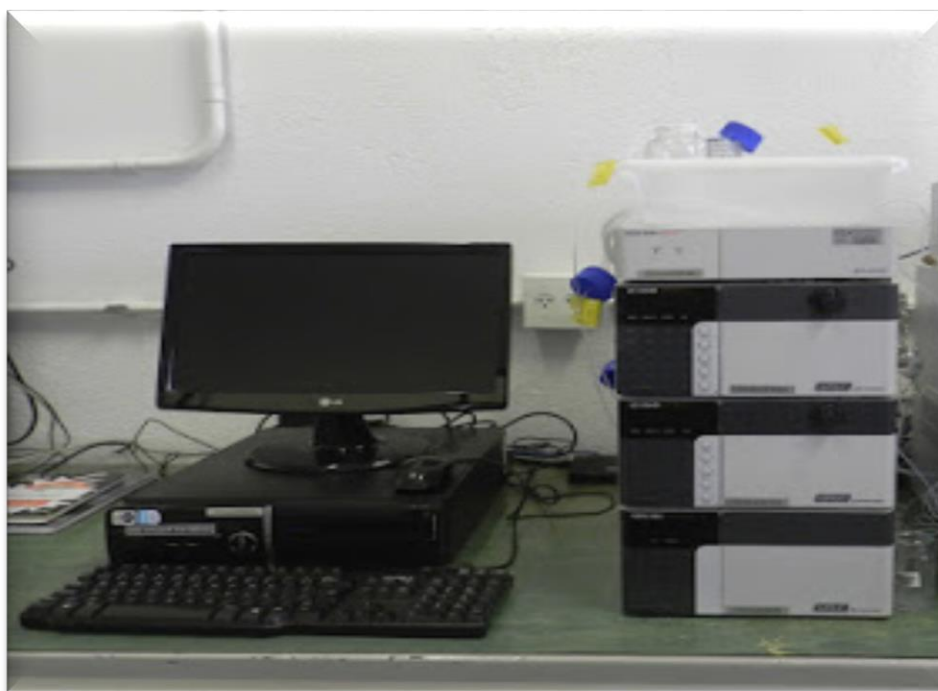


Figure 51 : Image de l'appareil de chromatographie liquide à haute performance (HPLC).

L'analyse chromatographique se fait en mode gradient pendant 35 min (Tableau 21) selon le schéma suivant : L'injecteur est de type manuel avec une boule d'injection de 20 μL qui correspond au volume d'échantillon injecté dans l'appareil pour analyse. L'enregistrement du signal et l'intégration se font à l'aide du logiciel Labsolutions®. La colonne de séparation chromatographique est de type Wakosil C18 à phase inversée dont les dimensions sont 150 mm $\times$ 6 mm $\times$ 5 μm . Les solvants chimiques utilisés sont de grade HPLC, Sigma Aldrich.

Tableau 21 : Gradient d'élution en HPLC

Temps (min)	Debit (mL/min)	Phase mobile A (%) MeOH/CH ₃ CN	Phase mobile B (%) (eau acidifiée)
0	1	4	96
10	1	50	50
15	1	60	40
20	1	100	0
30	1	100	0
32	1	4	96

4. Chromatographie sur couche mince

Une analyse chromatographique sur couche mince (CCM) sur des plaques de gel de silice MERCK 60 F₂₅₄ a été réalisée sur les deux extraits hexanique et méthanolique, en utilisant différents systèmes d'élution. La détection des spots a été effectuée par observation sous lumière UV (254/365 nm).

5. Etude de l'extrait hexanique du TGC

La séparation du mélange de l'extrait hexanique (m = 0,22 g) est effectuée par chromatographie sur colonne (CC) utilisant comme phase stationnaire (55g) du gel de silice (SiO₂) GF₂₅₄ placée dans une colonne en verre de dimension (40×2 cm). L'élution est effectuée avec l'hexane dont on a augmenté la polarité par addition du CH₂Cl₂ (100/0 à 0/100). L'identification des fractions récupérées par CCM a été réalisée au même temps avec la séparation sur colonne de silice et les fractions semblables ont été regroupées. Par conséquent, ces différentes séparations effectuées nous ont permis d'obtenir 8 fractions dont trois pures identifiées par CCM :

- Fraction I : Un seul produit à 100/0 du mélange (Hexane/CH₂Cl₂), R_f = 0,7
- Fraction II : Un seul produit à 90/10 du mélange (Hexane/CH₂Cl₂), R_f = 0,64
- Fraction III : Un seul produit à 10/90 du mélange (Hexane/CH₂Cl₂), R_f = 0,3

6. Etude de l'extrait méthanolique du TGC

a. Chromatographie sur couche mince et par HPLC

L'extraction des alcaloïdes totaux à partir de l'extrait méthanolique du tégument des graines de caroube a donné un rendement de 1,64%. L'élution est effectuée en premier lieu avec le dichlorométhane. Après, on augmente la polarité par l'addition de l'acétate d'éthyle (100/0 à 0/100), puis par un gradient d'acétate d'éthyle dans le méthanol (100/0 à 100). Plusieurs tâches ont été détectées dont plus de 10 fractions qui ont été isolées. En utilisant la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), nous avons observé la présence de plusieurs produits présentés par des pics sur la [Figure 52](#). En effet, plusieurs études ont été effectuées pour la séparation et l'identification des composés bioactifs des parties de la filière du caroubier, mais à notre connaissance, aucune étude sur l'identification des alcaloïdes du tégument des graines de caroube n'a été réalisée. Seule la théophylline a été identifiée présente abondamment dans le germe et les gousses de caroube [80], [244]. En outre la théophylline a été identifiée par [245] à un temps de rétention de 4,532 min alors que selon [246], elle a été identifiée à un temps de rétention de 5,891 min. De ce fait, la présence de la théophylline dans le TGC est possible.

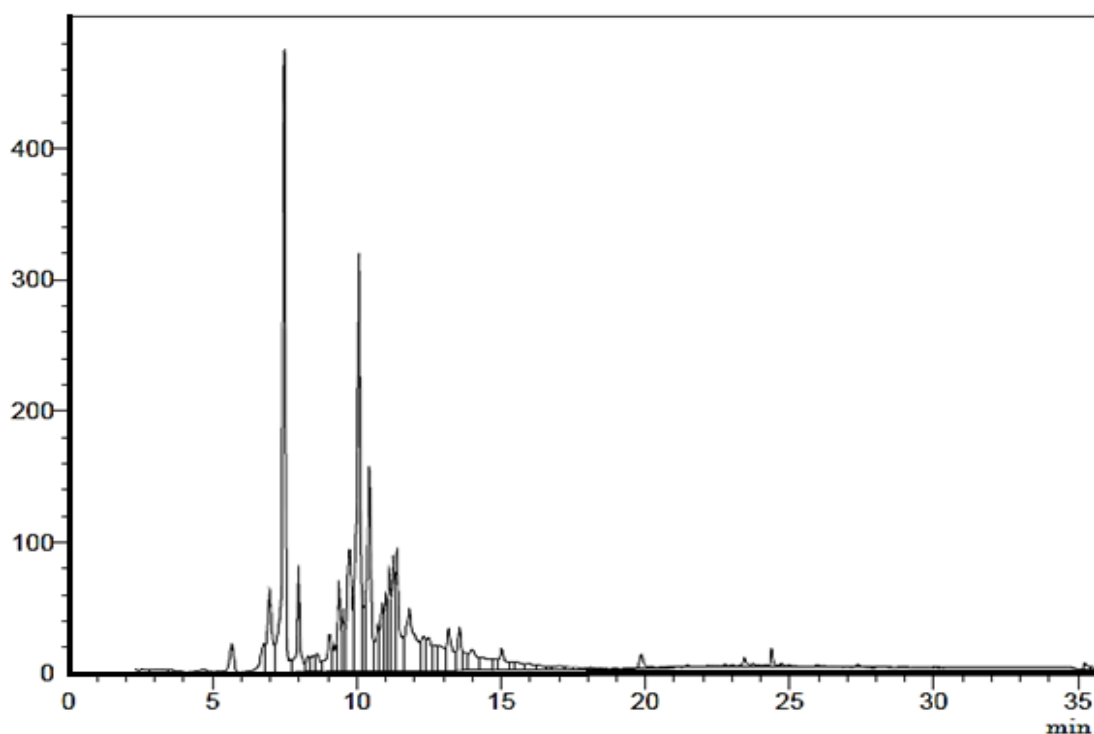


Figure 52 : Chromatogramme HPLC des alcaloïdes totaux des téguments de graines de caroube (révélation à 254 nm).

b. Chromatographie sur colonne

150 g de silice ont été utilisés dans une colonne en verre de dimension de (50×3 cm) pour séparer le mélange des alcaloïdes du TGC. Les plus importantes fractions ont été séparées avec des proportions de solvants de :

- Fraction I : deux produits avec (CH₂Cl₂/EtOAc) à 100/0. ($R_f = 0,89$; $R_f = 0,52$)
- Fraction II (CF2) : un seul produit (une tâche sur CCM) avec (CH₂Cl₂/EtOAc) à 99/1. ($R_f = 0,72$)
- Fraction III : deux produits avec (CH₂Cl₂/EtOAc) à 90/10. ($R_f = 0,62$; $R_f = 0,45$)
- Fraction IV : deux produits avec (CH₂Cl₂/EtOAc) à 85/15. ($R_f = 0,35$; $R_f = 0,22$)

6.1. Etude du précipité P2

Le précipité P2 récupéré de l'extrait méthanolique a été aussi soumis aux différentes étapes d'extraction des alcaloïdes totaux. Cette extraction a permis l'obtention d'une poudre de couleur claire après évaporation à sec de l'extrait de CH₂Cl₂ récupéré. Ce produit a été noté (P3, m = 0,763 g) et n'est soluble complètement que dans le DMSO ou dans un mélange (MeOH/ H₂O).

Conclusion

L'élaboration du profile phytochimique du tégument a montré sa richesse en métabolites secondaires aux effets thérapeutiques et médicinaux importants. En effet, l'extrait d'acétone a renfermé la plus haute teneur en PT et FT. Donc, la teneur en composés phénoliques dépend essentiellement de la polarité des solvants utilisés.

La présence des teneurs élevées de composés bioactifs dans le TGC suggère des propriétés antioxydantes importantes de ce composé naturel. Ainsi, le test DPPH a confirmé que le tégument exerce un effet inhibiteur des radicaux libres très intéressant dont l'IC₅₀ est de 0,044 mg/mL de l'extrait acétonique, plus efficace que celle de l'antioxydant de référence le BHT (0,15 mg/mL). En outre, le TGC a été aussi performant dans les autres tests utilisés dont le test FRAP, PM et β -carotène. Par ailleurs, le TGC a démontré une activité antibactérienne importante contre les trois souches *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* par contre la souche *Escherichia coli* a montré une forte résistance.

Chapitre III : Profils phytochimiques et activités antioxydantes du tégument et du germe des graines de caroube

D'autre part, le germe aussi s'est avéré riche en métabolites secondaires ayant des quantités très intéressantes en PT, FT et TC avec une forte activité antioxydante. Ces données confirment l'utilisation de cette partie dans les produits diététiques et surtout comme ingrédient essentiel dans les céréales.

Du reste, les résultats obtenus de la fraction de tégument confirment ses différentes propriétés et ouvrent le potentiel de valoriser cet antioxydant naturel dans différents domaines. De ce fait, l'isolement des différents composés de cette partie a permis essentiellement de récupérer plusieurs fractions qui sont en cours de purification et de caractérisation afin de déterminer leurs structures.



Chapitre IV

Effet du tégument des graines de caroube sur les maladies neuropsychiatriques



I. Introduction

Les maladies neurodégénératives et les troubles psychiatriques sont parmi les pathologies les plus importantes qui conduisent à une morbidité accrue des populations. Généralement, les maladies neurodégénératives sont celles qui sont liées à un dysfonctionnement du système nerveux y compris les neurones incluant ainsi la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (PD), la maladie de Huntington (HD), etc. Quant aux troubles ou maladies neuropsychiatriques, ils ont été définis par l'organisation mondiale de la santé comme étant l'ensemble de « problèmes de santé mentale », qui se caractérisent par des anomalies de la pensée, des émotions, du comportement et des relations avec les autres. Ces maladies affectent toutes les catégories de personnes, de race, de sexe et d'âge et handicapent la personne concernée ainsi que les personnes de son cercle. Parmi ces maladies, les troubles d'humeur (anxiété et dépression) et la schizophrénie ont été étudiées dans ce travail. En effet, à l'échelle mondiale, le nombre total de personnes souffrant de dépression a été estimé à plus de 300 millions en 2015 et près de ce nombre souffre d'une gamme de troubles anxieux [247]. En particulier, en 2019, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a publié un rapport sur les troubles mentaux mettant le point sur la dépression et la schizophrénie. Ce rapport a confirmé que la dépression touche plus de 264 millions de personnes de tout âge dans le monde et plus que 23 millions de personnes souffrant de la schizophrénie [248]. Au Maroc, 40% de la population souffrent de troubles mentaux dont 26% sont atteints de la dépression et 1% de la schizophrénie révélant ainsi une situation alarmante de la santé mentale au Maroc mettant en cause essentiellement la pression croissante de la vie moderne [249], [250]. Par ailleurs, diverses causes ont été reportées comme des causes favorisant le développement des maladies neuropsychiatriques parmi eux, citant les causes environnementales, les altérations génétiques, moléculaires et biochimiques. Certes, des études récentes ont montré que le stress oxydatif (SO) est fortement lié au développement de ces maladies dont les troubles d'humeur (anxiété et dépression), la schizophrénie, l'Alzheimer, la maladie de Parkinson [251].

Des thérapies par la méditation, la musique, les médicaments, la rééducation et l'intervention familiale peuvent jouer un rôle important dans l'amélioration des symptômes des troubles d'humeur et des maladies neuropsychiatriques plus sévères notamment la schizophrénie. Cependant, l'utilisation de nombreuses molécules psychoactives synthétiques telles que les neuroleptiques, les antidépresseurs, les anxiolytiques dans la médecine moderne reste obligatoire. Toutefois, ces traitements modernes sont chers, complexes et ont des effets secondaires qui peuvent des fois être très graves. D'ailleurs, des études ont révélé la prise de

poids, l'obésité, le diabète comme des effets négatifs de quelques médicaments utilisés dans le traitement des maladies neuropsychiatriques [155]. Par conséquent, ces raisons appuient le recours à l'utilisation d'antioxydants naturels trouvés abondamment dans les plantes. Et cela, argumente le nombre élevé des publications sur le potentiel antioxydant des plantes.

Les études faites sur l'effet de la filière du caroubier sur les maladies neuropsychiatriques sont restreintes. D'une part, on trouve l'étude menée par (Agrawal et *al.*, 2011) [34] qui montre l'effet antidépresseur des gousses de caroube, évalué par les deux tests de nage forcé et de suspension.

D'autre part, des études récentes ont prouvé l'effet intéressant des gousses de caroubier sur l'empêchement des dommages oxydatifs liés à la mémoire à court terme faisant ainsi la corrélation entre la richesse des gousses en composés phytochimiques à effet antioxydant intéressant et le stress oxydatif causé par la 6-hydroxydopamine causant ainsi des troubles de la mémoire des poissons zèbres [252,253].

Dans ce chapitre nous allons tester l'effet des deux extraits de TGC qui sont l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait de l'acétone principalement sur les troubles d'humeur des animaux modèles de l'anxiété et la dépression ainsi que sur les animaux modèle des symptômes de la schizophrénie induite par l'administration de la méthionine. Pour ces deux objectifs, plusieurs tests comportementaux ont été réalisés notamment le test de labyrinthe en Y et le test de labyrinthe en croix surélevé pour le screening de différents comportement et fonctions cognitives notamment la mémoire à court-terme, le niveau d'exploration des nouvelles espaces, ainsi que l'anxiété. En outre, nous avons utilisé le test de nage forcée pour l'effet antidépresseur et d'autres outils tels que le test en champ ouvert et le test de reconnaissance des nouveaux objets pour tester la mémoire à long terme, l'attention, l'exploration et l'anxiété. Ces tests ont été spécifiquement élaborés pour le screening et le développement de nouvelles drogues à effet anxiolytique et antidépresseur et aussi pour évaluer leurs capacités à améliorer les troubles cognitifs et comportementaux liés aux différentes maladies neuropsychiatriques. Vu l'hypothèse de la corrélation entre les dommages oxydatifs et les maladies neuropsychiatriques, l'analyse des enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la malondialdéhyde (MDA) a été établie pour prouver ladite hypothèse. De plus, la détermination des activités de ces enzymes antioxydantes va aussi confirmer l'effet des TGC sur leurs régulations qui sont étroitement liées au développement des symptômes sévères des maladies neuropsychiatriques dont la schizophrénie.

L'ensemble des tests présentés dans ce chapitre ont été réalisés dans le cadre d'un stage de mobilité Erasmus+ à l'Université d'Alexandru Ioan Cuza en Roumanie.

II. Matériels et méthodes

1. Préparation des extraits

Les extraits utilisés dans cette étude sont les extraits d'EtOAc et d'Acétone de TGC récupérés par macération. L'utilisation de ces deux extraits revient essentiellement à leurs pouvoirs antioxydant élevés ainsi qu'à leur richesse en métabolites secondaires. Les doses utilisées sont (50 et 100 mg/Kg) solubilisées dans l'eau distillée.

2. Préparation des animaux

30 souris mâles (6 souris par groupe) pesant de 20 à 27 g au début de l'expérience ont été utilisées. Les animaux ont été hébergés dans une pièce à température et lumière contrôlées (22°C, un cycle de 12 heures commençant à 08h00) et ont été nourris et autorisés à boire de l'eau. Les souris ont été traitées conformément aux directives de bioéthique animale de la loi sur l'expérimentation animale et la loi sur la santé et le bien-être des animaux de Roumanie et toutes les procédures étaient conformes à la directive du Conseil Européen du 24 novembre 1986 (86/609/CEE) et ont été approuvées par les Comités Locaux sous le numéro d'enregistrement 3473/2017.

3. Les modèles animaux des troubles d'humeur

Les animaux ont été répartis en 5 groupes de 6 souris par groupe : groupe témoin (traité avec une solution saline uniquement), groupe EtOAc 50 et Acet 50 (exposés au stress chronique et traités avec une dose de 50 mg/Kg des extraits d'acétate d'éthyle et d'acétone), EtOAc 100 et Acet 100 (exposés au stress chronique et traités avec une dose de 100 mg/Kg des extraits d'acétate d'éthyle et d'acétone). Les doses ont été sélectionnées sur la base de recherches antérieures de (Rtibi et *al.*, 2017) [35] portées sur l'effet de l'extrait aqueux de gousses de caroube sur la régulation de la glycémie. Toutes les évaluations comportementales ont été effectuées entre 10h00 et 14h00. En effet, tous les groupes ont été soumis à la privation d'eau et de nourriture. Toutefois, les souris ont été gardées séparément les unes des autres par conséquent, la restriction de se déplacer librement et d'explorer les espaces est connue comme une méthode répandue d'induction du stress [254–256]. La réponse établie de l'induction du stress génère des comportements liés à l'anxiété et la dépression (troubles d'humeur). Après 7 jours d'administration des extraits, nous avons testé la mémoire à court terme et l'anxiété avec les tests du labyrinthe en Y et du labyrinthe élevé pendant 3 jours. Le test de nage forcée a été réalisé pendant 2 jours (1^{er} jour pour l'habituation et 2^{ème} jour pour le test), ces mêmes conditions ont été réalisées pour le test en plein champ.

4. Les modèles animaux des symptômes de la schizophrénie

Les animaux modèles des symptômes de la schizophrénie induite par l'administration de la méthionine sont un modèle qui repose sur une réaction d'hyperméthylation. En effet, la méthionine, un acide aminé essentiel, est un précurseur de la S-adénosylméthionine ou SAM qui est un principal donneur du groupe méthyl aux différentes réactions de méthylation [257]. Le processus de méthylation affecte différents substrats dont les protéines, les phospholipides, les polysaccharides, l'ARN et l'ADN [258]. Par conséquent, différents processus biologiques et métaboliques impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie ainsi que d'autres fonctions cellulaires sont affectés [259,260]. Un déficit ou une consommation excessive de cet acide aminé provoque des troubles dans différents systèmes de l'organisme. D'une part, un déficit chronique en méthionine influence la méthylation de la cytosine de l'ADN des rats et souris [261,262]. D'une autre part une administration répétée de la méthionine des rats et souris provoque une hyperméthylation de certains promoteurs de gènes et affecte les fonctions neurologiques et le comportement [263,264]. Par ailleurs, des études antérieures ont confirmé que l'administration de la méthionine à des patients atteints de schizophrénie intensifie les symptômes psychotiques à savoir les Hallucinations, les changements d'humeur, la détérioration de la mémoire et des fonctions cognitives [265–267].

Pratiquement, les animaux ont été divisés en 6 groupes :

- Le Groupe 1 a reçu la solution saline et soumis à des tests comme groupe contrôle normal.
- Le Groupe 2 est administré avec 50 µL de méthionine (37,5 mg/mL) et a servi de groupe modèle des symptômes de la schizophrénie.

Les 4 autres groupes ont reçu une injection de 50 µL de méthionine (37,5 mg/mL) (Sigma, USA) pendant 7 jours. A partir du 8^{ème} jour d'injection de méthionine, les groupes d'EtOAc 50 et d'Acet 50 ont reçu une dose de 50 mg/Kg des extraits d'acétate d'éthyle et d'acétone, et les groupes d'EtOAc 100 et d'Acet 100 ont reçu une dose de 100 mg/Kg des extraits d'acétate d'éthyle et d'acétone.

La méthode utilisée pour la durée du traitement et le temps d'administration avant le test a été sélectionnée à l'aide des études pilotes effectuées au sein du Laboratoire de Biologie Animale à Iasi et des rapports publiés précédemment concernant les modèles animaux des symptômes de la schizophrénie [258,268].

5. Tests comportementaux

5.1. Labyrinthe en Y

Ce test est utilisé pour évaluer la mémoire à court-terme en évaluant le pourcentage d'alternances spontanées. L'appareil utilisé consiste en trois bras croisés (35 cm de long, 25 cm de haut et 10 cm de large) en forme de (Y) avec un centre triangulaire équilatéral et en attribuant à chaque bras une lettre ([Figure 53](#)). Après 7 jours d'administration des extraits, l'animal est placé à l'extrémité de l'un des bras pour se déplacer librement entre chaque bras pendant 8 min [150]. Cependant, l'entrée dans le bras n'est comptée que lorsque les pattes postérieures de l'animal sont à l'intérieur du bras. Donc, le comportement d'alternance spontanée a été défini comme l'entrée dans les trois bras sur des choix consécutifs. Ainsi, le pourcentage des alternances spontanées est calculé en suivant la formule 1 :

$$\% \text{ d'alternances spontanées} = \frac{(\text{alternances spontanées})}{(\text{nombre total d'entrées} - 2)} \times 100 \quad \text{Formule 1}$$



Figure 53 : Image du labyrinthe en forme de (Y).

5.2. Test de labyrinthe en croix surélevé (EPM)

Le test du labyrinthe surélevé (EPM) est essentiellement utilisé pour étudier les médicaments anxiolytiques et les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété se basant sur la peur naturelle des allées ouvertes et fermées. La [Figure 54](#) représente l'image de L'EPM qui se compose de

quatre bras, 49 cm de long et 10 cm de large, élevés à 50 cm du sol avec deux bras fermés par des murs de 30 cm de haut et deux autres bras ouverts. L'animal a été placé à la jonction des quatre bras du labyrinthe, face à un bras ouvert, et le temps passé sur ces bras a été enregistré au cours d'un test de 5 minutes, comme décrit précédemment par (Komada et *al.*, 2008 ; Ciobica et *al.*, 2011a) [269], [270]. Les variables qui sont enregistrées et sont fortement liées à l'anxiété sont : le nombre d'entrées dans les bras ouverts, le temps passé dans les bras ouverts, le pourcentage d'entrées sur les bras ouverts / total et le pourcentage de temps sur les bras fermés [271]. Après chaque essai, le labyrinthe a été soigneusement nettoyé avec un chiffon humide. Le nombre d'entrées et le temps passé sur chaque bras, et surtout le temps passé dans les bras ouverts est enregistré et sert comme indice d'anxiété.



Figure 54 : Image du labyrinthe en croix surélevé (Elevated plus maze)

5.3. Test de nage forcée (Forced Swimming Test)

Dans le présent test, nous évaluons l'effet antidépresseur des extraits de TGC adoptant la procédure décrite par (Detke et *al.*, 1995 ; Petit-Demouliere et *al.*, 2005) [272,273]. Le premier jour de l'expérience (séance de pré-test), les souris ont été placées individuellement dans des récipients cylindriques (diamètre 30 cm, hauteur 59 cm) contenant 25 cm d'eau à $26 \pm 1^\circ\text{C}$ et ont été laissées nager pendant 6 minutes avant d'être retirés, séchés et remis dans leurs cages.

La procédure a été répétée de la même manière 24 h plus tard pour une durée de 6-min. Les réponses comportementales suivantes ont été enregistrées : le temps d'immobilité (l'animal reste flottant en gardant seulement la tête hors de l'eau) et le temps de mobilité ou de nage active ([Figure 55](#)).

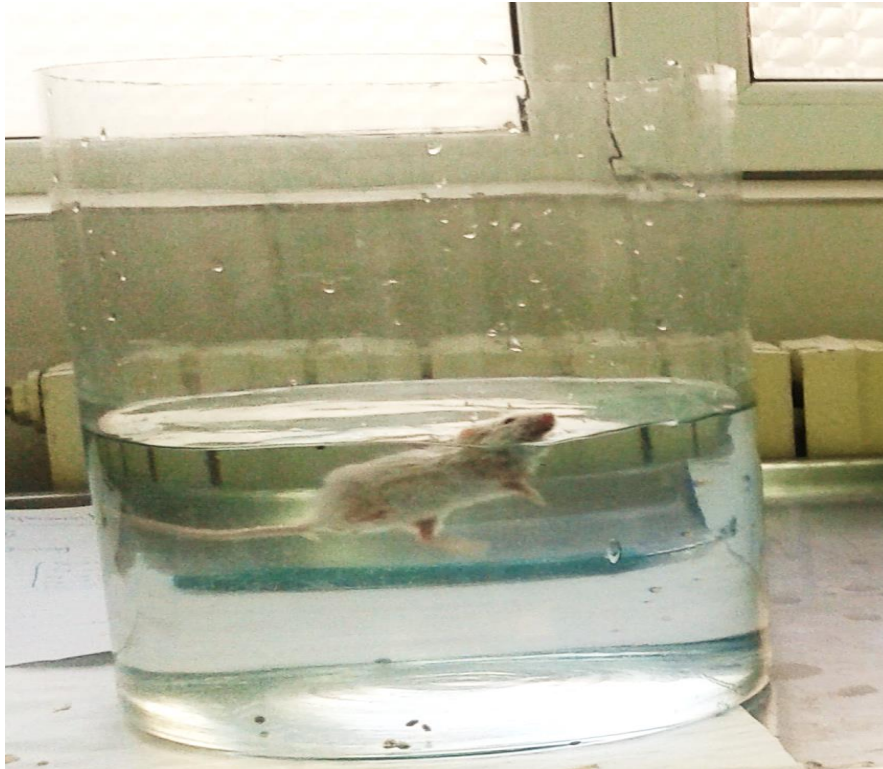


Figure 55 : Image du test de nage forcée (Forced swimming test)

5.4. Test en champ ouvert (Open Field test)

Le test en champ ouvert est largement utilisé pour mesurer l'anxiété, l'activité locomotrice et comportementale des souris [274]. La procédure consiste à placer l'animal dans une chambre d'essai (une boîte comme dans la [Figure 56](#)) contenant plusieurs lignes avec un carré au centre. La session d'habituation des animaux est effectuée pendant une durée de 10 min un jour avant la session effective du test. Différents paramètres sont enregistrés durant 7 min le nombre de lignes passées, la durée passée au centre, le temps d'étirement et de congélation et le nombre de défécation [275]. Cependant le nombre de défécation est considéré comme étant indice de timidité.

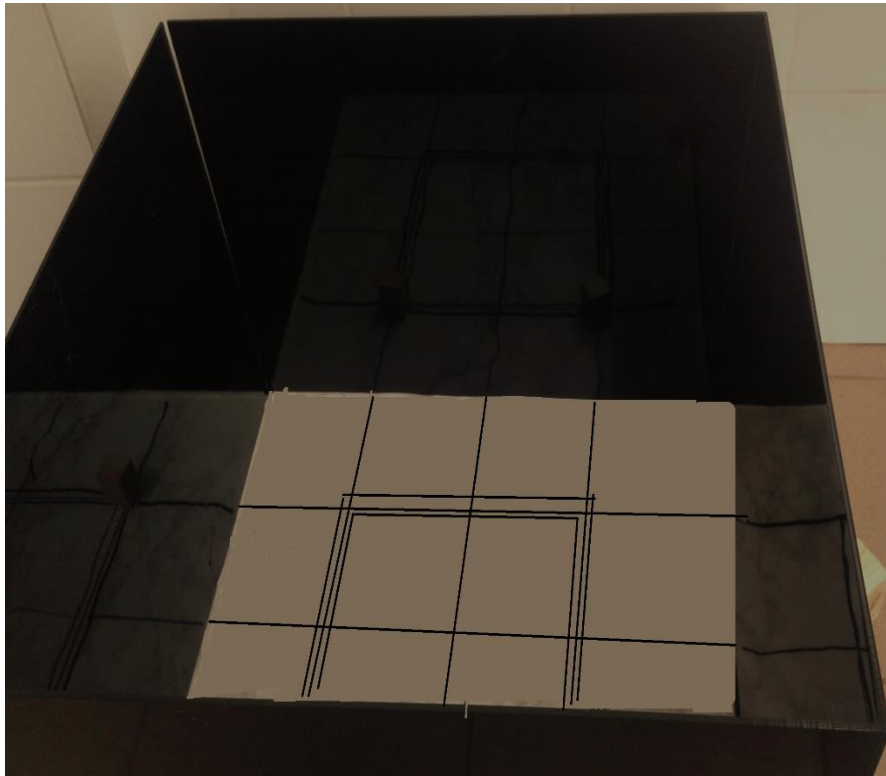


Figure 56 : Image de la chambre utilisée dans le test en champ ouvert (Open field test)

5.5. Test de reconnaissance des nouveaux objets (Novel Object Recognition test)

Le test de reconnaissance des nouveaux objets (NOR) consiste à mesurer l'exploration d'un nouvel objet métallique par rapport à un objet familier en bois de même taille ([Figure 57](#)). Ce test permet de tester l'altération de la mémoire et de l'apprentissage, ainsi que de mesurer l'anxiété et la préférence pour la nouveauté chez les rongeurs [267]. Après deux jours d'habituation avec deux objets identiques pendant une durée de 10 min, le troisième jour les souris ont été placées dans un appareil en présence des deux objets : le familier et le nouveau. La préférence du nouvel objet a été évaluée en enregistrant le temps passé à explorer les objets nouveaux et familiers.



Figure 57 : Image de la chambre utilisée pour le test de reconnaissance des nouveaux objets (Novel object recognition)

6. Collecte des tissus

Après les tests de comportement, tous les rats ont été anesthésiés, décapités rapidement et le cerveau entier a été retiré. Les lobes temporaux ont été collectés. Chacun des échantillons de tissus temporels a été pesé et homogénéisé avec un homogénéisateur Potter couplé au mélangeur Cole-Parmer Servodyne dans de l'eau bidistillée (1 g de tissu/10 mL d'eau bidistillée). Les échantillons ont été centrifugés 15 min à 3000 tr/min. Après centrifugation, le surnageant a été séparé et pipeté dans des tubes.

7. Analyse des enzymes antioxydantes

7.1. Activité de la superoxyde dismutase (SOD)

L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) a été mesurée par le pourcentage du taux d'inhibition de la réaction de l'enzyme avec le substrat WST-1 (un colorant tétrazolium soluble dans l'eau) et la xanthine oxydase en utilisant un kit de dosage SOD (Fluka, numéro de produit : 19160) suivant les instructions du fabricant. Chaque essai du point final a été contrôlé par spectrophotométrie UV-visible à une absorbance de 450 nm (la longueur d'onde du produit coloré de la réaction WST-1 avec du superoxyde) après 20 min et à 37°C. Le pourcentage d'inhibition a été normalisé par mg de protéine et présenté sous forme d'unité d'activité SOD [276,277].

7.2. Activité de la glutathion peroxydase

L'activité de la glutathion peroxydase (GPX) a été mesurée en utilisant le kit de test d'activité cellulaire GPX CGP-1 (Sigma Chemicals). Ce kit utilise une méthode indirecte, basée sur l'oxydation du glutathion (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) catalysé par GPX, qui est ensuite couplé avec le recyclage de GSSG en GSH en utilisant la glutathion réductase (GR) et le NADPH. La diminution du NADPH à 340 nm pendant l'oxydation du NADPH en NADP indique une activité GPX [276,277].

7.3. Dosage du malondialdéhyde

Les niveaux de malondialdéhyde (MDA) ont été déterminés par le dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBAR). 200 µL de surnageant ont été ajoutés et brièvement mélangés avec 1 mL d'acide trichloracétique à 50%, 0,9 mL de Tris-HCl (pH 7,4) et 1 mL d'acide thiobarbiturique 0,73%. Après mélange au vortex, les échantillons ont été maintenus à 100°C pendant 20 min. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 3000 tr/min pendant 10 min et l'absorbance du surnageant a été mesurée à 532 nm. Le signal a été lu par rapport à une courbe standard MDA et les résultats ont été exprimés en nmol/mg de protéine [276,277].

8. Analyse statistique

Les résultats comportementaux ont été analysés par un test ANOVA unidirectionnel. Tous les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type. Seules les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

III. Résultats et discussion

1. Effet des TGC sur les troubles d'humeur

1.1. Tests comportementaux

Seuls les extraits d'acétate d'éthyle et d'acétone ont été utilisés dans l'évaluation de l'effet des TGC sur les maladies neuropsychiatriques. Cela revient premièrement au rendement de l'extrait méthanolique qui était très faible par rapport aux autres extraits et aussi de l'activité antioxydante qui était plus puissante dans les extraits d'EtOAc et d'acétone que dans l'extrait de MeOH.

1.1.1 Test de labyrinthe en Y

Les extraits d'EtOAc et d'acétone ont été utilisés dans l'évaluation de la mémoire à courte durée et l'effet anxiolytique en utilisant le test de labyrinthe en forme de Y. L'administration des extraits de TGC (50 et 100 mg/Kg) durant 7 jours consécutifs a montré une légère modification dans les alternations spontanées. D'après la [Figure 58](#), le pourcentage des alternations spontanées n'a subi presque aucune modification significative par rapport aux extraits administrés ($62,57\% \pm 2,57$, $p > 0,05$). Par contre, une légère augmentation a été remarquée dans les alternations spontanées correctes dans le groupe administré avec l'EtOAc. Cependant il n'y avait pas de différence entre les doses ($67,26 \pm 1,28 \%$) contre ($64,78 \pm 2,14 \%$, $p > 0,05$) pour le groupe contrôle. Ceci peut être expliqué par la courte durée d'administration des extraits (7 jours) qui n'a pas permis d'observer des changements dans le cerveau [278]. Par ailleurs, une diminution inattendue a été détectée dans le pourcentage d'alternations spontanées pour les deux doses d'extraits d'acétone ($56,77 \pm 2,52 \%$) contre ($64,78 \pm 2,14 \%$, $p > 0,05$), ce qui suggère un effet négatif ou bien une altération des performances de la mémoire à court terme des souris.

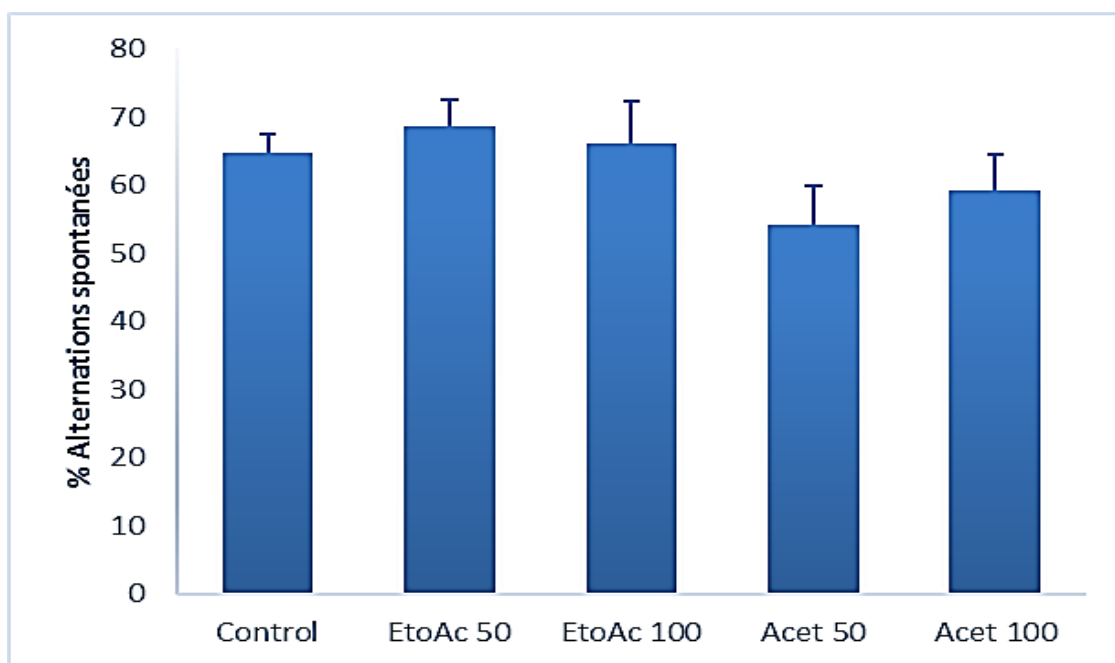


Figure 58 : Effet de l'administration des extraits des TGC (50 and 100 mg/kg) sur le pourcentage des alternations spontanées dans le test de labyrinthe en Y contre le groupe contrôle.

1.1.2 Test de Labyrinthe en croix surélevé (EPM)

Les résultats obtenus du test de labyrinthe en croix surélevé sont présentés dans la [Figure 59](#). Le labyrinthe en croix surélevé est un modèle d'anxiété largement utilisé pour le screening des

nouvelles drogues anxiolytiques ainsi que pour tester le niveau d'exploration des nouveaux espaces. Dans le présent test, les facteurs indiquant le niveau d'anxiété sont surtout les activités ou les comportements des souris dans les deux bras comme par exemple le nombre de défécations, d'étirement ainsi que de blocage lorsque l'animal ne bouge pas. L'effet anti-anxiété est indiqué par contre par un nombre d'entrée dans les bras ouverts élevé [279]. Comme indiqué dans la Figure 7B, l'extrait d'EtOAc (50 mg/Kg) exerce un effet anti-anxiété détecté par un temps passé dans les bras ouverts significatif ($50 \pm 12,42$ contre $34,75 \pm 11,09$ du contrôle). Cependant, une dose plus élevée de l'extrait d'EtOAc diminue significativement le temps passé dans les bras ouverts ($16,25 \pm 5,48$ s contre $50 \pm 12,42$ s, $p=0,008$) comparé avec le groupe recevant une dose de (50 mg/ Kg). Contrairement à l'extrait d'EtOAc, l'extrait d'acétone a montré un effet anti-anxiété significatif pour une dose de (100 mg/Kg) avec un temps passé dans les bras ouverts de ($36,66 \pm 14,32$ s contre $34,75 \pm 11,09$, $p=0,18$ pour le contrôle). Une dose de (50 mg/Kg) n'a pas donné un effet significatif sur le temps passé dans les bras ouverts. Ce test confirme que chaque extrait a une dose spécifique à administrer mettant en évidence la composition des deux extraits et leurs richesses en composés phénoliques. D'autres études doivent être réalisées pour déterminer les composés spécifiquement responsables de l'effet anti-anxiété ainsi que les doses à appliquer. Les mêmes remarques ont été élaborées pour le nombre d'entrée dans les bras fermés (Figure 7A). En effet, les souris ayant reçues les doses de 50 et 100 mg/Kg des extraits d'EtOAc et d'acétone n'ont pas montré une différence significative dans le nombre d'entrée dans les bras fermés soit ($8,83 \pm 1,07$ pour EtOAc 50 et $8,83 \pm 1,62$ pour Acet 100 contre $7,5 \pm 0,95$, $p> 0,05$ pour le contrôle).

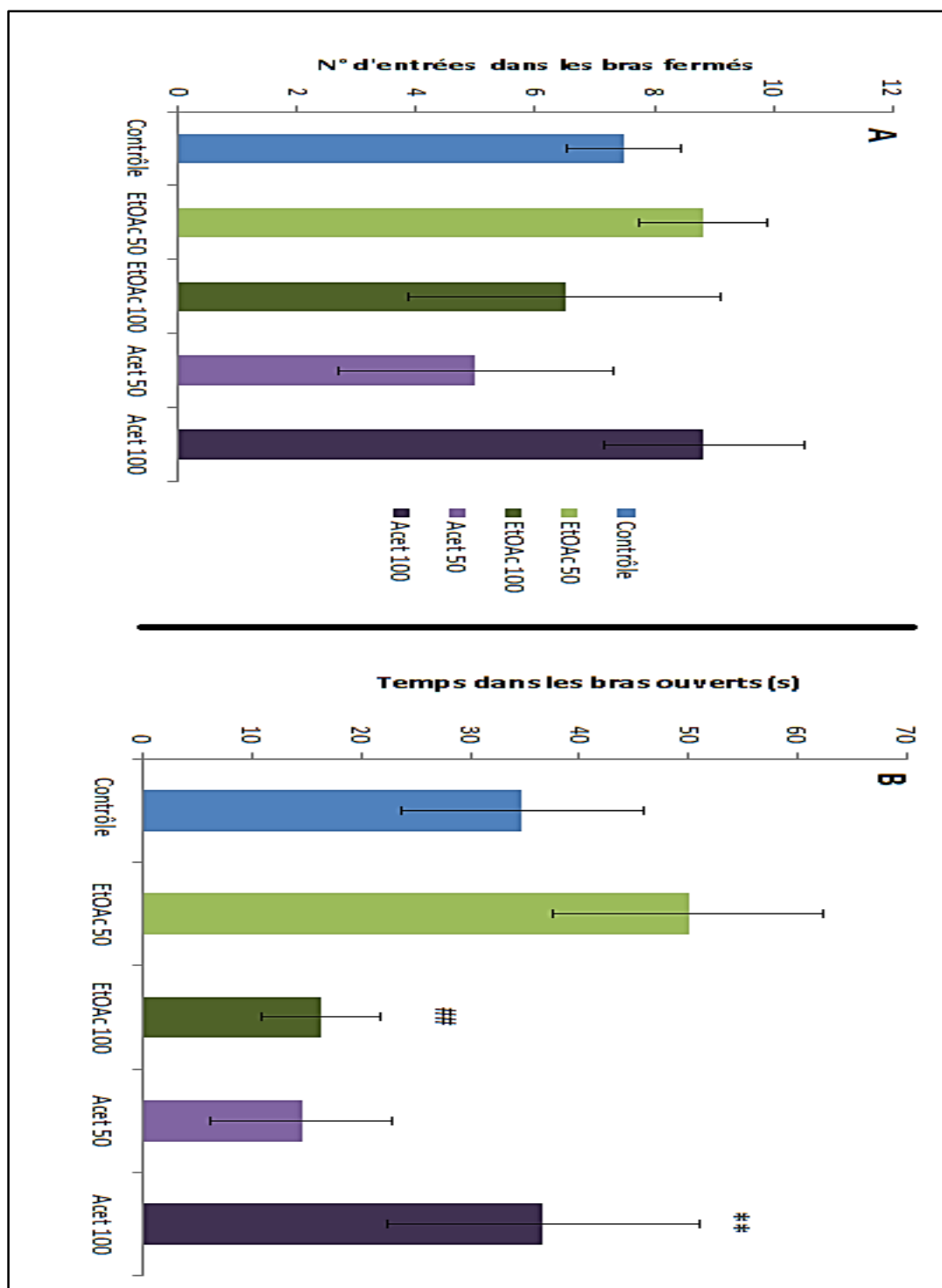


Figure 59 : Effet des extraits des TGC (EtOAc et acétone 50 and 100 mg/Kg) sur le nombre d'entrées dans les bras fermés (A) et sur le temps passé dans les bras ouverts (B) des souris contre le groupe contrôle. Les résultats sont présentés sous forme des moyennes

1.1.3 Test de la nage forcée (FST)

Le test de la nage forcée est parmi les tests les plus exploités dans l'évaluation des drogues à effet antidépresseur. La [Figure 60](#), représente l'effet antidépresseur des extraits de TGC en comparaison avec un groupe contrôle. Par rapport au groupe contrôle, nous observons une diminution du temps d'immobilité et une augmentation du temps de nage dans tous les groupes avec différentes doses (50 and 100 mg/Kg). L'extrait d'acétone a réduit significativement le temps d'immobilité ($p \leq 0,04$) par rapport au groupe contrôle à une dose minimale de (50 mg/Kg). L'extrait d'EtOAc a été aussi efficace que l'extrait d'acétone mais la dose de 100 mg/Kg était plus efficace que la dose de 50 mg/Kg vu qu'elle a augmenté le temps de mobilité des souris. Donc, d'après les résultats obtenus, nous pouvons conclure que les extraits des TGC exercent un effet antidépresseur. Conformément aux antidépresseurs usuels, nos résultats sont en totale cohérence juste que ces antidépresseurs usuels réduisent la durée de l'immobilité non juste pendant 5 min, mais peuvent aller jusqu'à 25 min. Cependant, l'étude a confirmé que 5 min est suffisante pour déterminer l'effet antidépresseur d'une drogue [280]. En outre, nos résultats sont en accord aussi avec l'étude de (Agrawal et *al.*, 2011) [34] qui a confirmé l'effet antidépresseur de l'extrait aqueux des gousses du caroube. Et vu, l'activité antioxydante et la richesse des gousses en polyphénols, nous admettons la corrélation entre ces paramètres et leurs effets positifs sur les maladies neuropsychiatriques et spécifiquement la dépression.

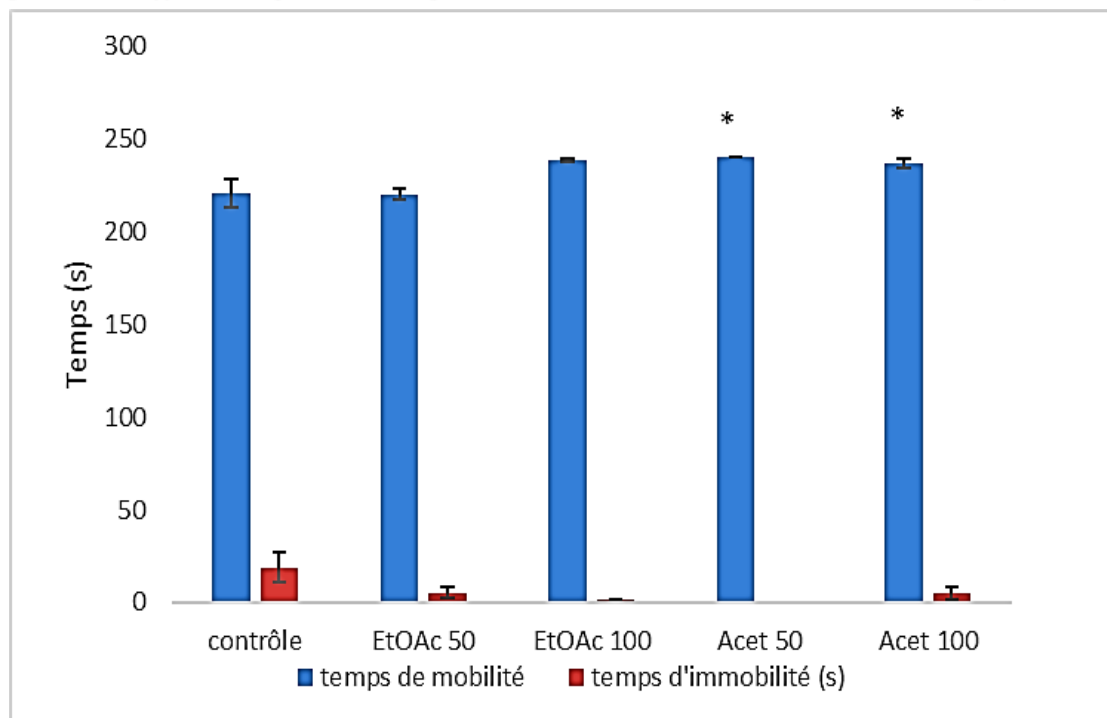


Figure 60 : Effet antidépresseur des extraits des TGC des différentes doses (50 et 100 mg/Kg) sur le temps d'immobilité et de mobilité des souris. ($n = 6$ souris/ groupe) contre le groupe contrôle.

1.14 Test en champ ouvert (open field test)

Ce test permet la mesure de l'anxiété, l'activité locomotrice et exploratrice des rongeurs [281]. Le nombre de lignes passées par chaque groupe a été mesuré et comparé avec celui du groupe contrôle. Comme le montre la [Figure 61](#), l'activité locomotrice n'a pas été améliorée par les extraits administrés. Par conséquent, l'extrait d'acétate d'éthyle et d'acétone ont diminué le nombre de lignes passées sans aucun changement détecté dans les doses administrées. Contrairement à l'inefficacité des extraits pour améliorer l'activité locomotrice, nous avons observé une diminution du nombre d'étirements à une dose de 100 mg/Kg pour l'acétate d'éthyle et l'extrait d'acétone respectivement ($18,5 \pm 4,5$ et $15,5 \pm 2,4$ contre $24,25 \pm 7,35$ dans le groupe contrôle). En effet, un nombre élevé d'étirement indique un niveau d'anxiété plus élevé. Ainsi, nous pourrions suggérer que les extraits avec des doses différentes présentent un effet anxiolytique. De plus, le temps de blocage ou d'immobilité (où l'animal ne bouge pas de sa place) de tous les groupes administrés avec les extraits de TGC a été réduit par rapport au groupe contrôle. De même, le nombre de toilettage, le temps passé au centre sont aussi des indices du

stress élevé. Ainsi, les groupes administrés avec le TGC ont montré un nombre réduit de ces indices par rapport au groupe contrôle suggérant l'effet anxiolytique des TGC.

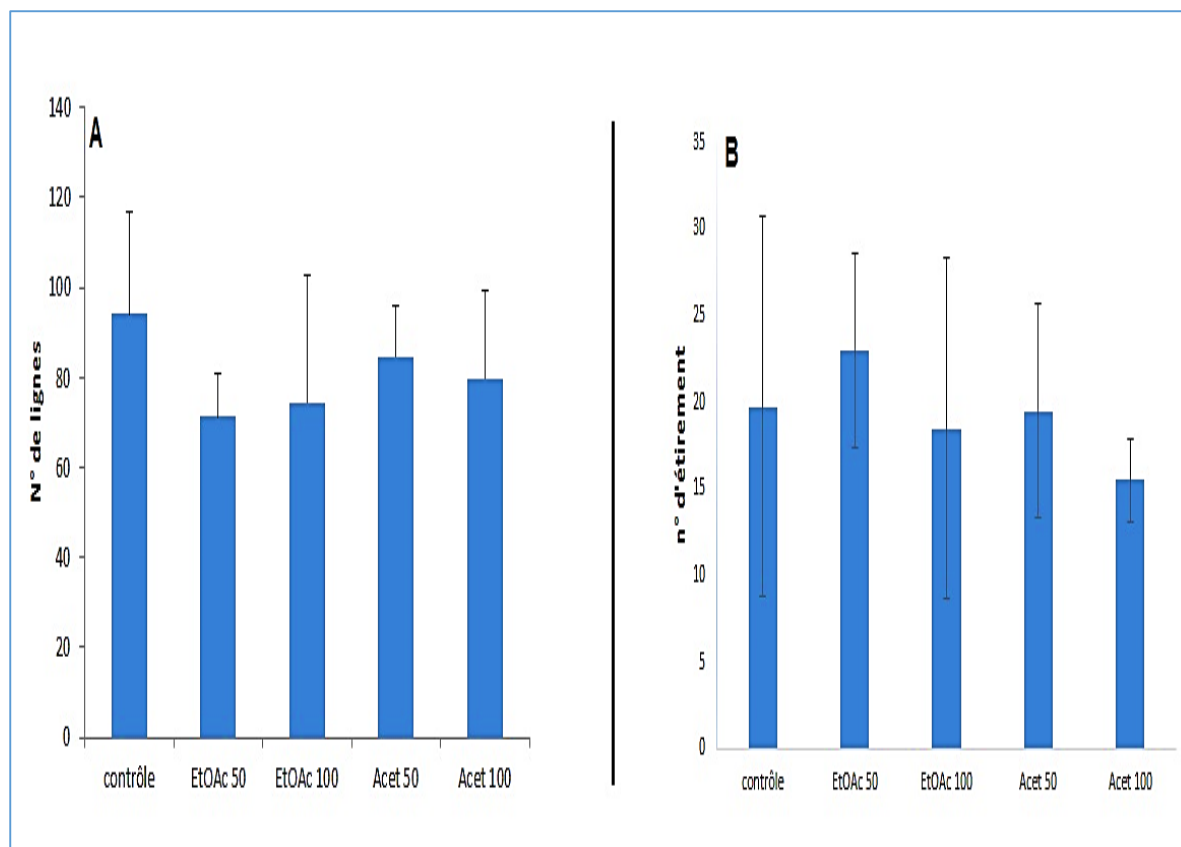


Figure 61 : Effet des extraits des TGC avec différentes doses (50 et 100 mg/Kg) sur l'activité locomotrice et l'anxiété. (A) représente le nombre d'étirement et (B) le nombre de lignes passées par les souris (n = 6 souris/ groupe) contre le groupe contrôle

2. Effet des TGC sur les modèles animaux des symptômes de la schizophrénie

L'hypothèse retenue dans cette étude a été déjà introduite anciennement par (Yao et *al.*, 1998) [282] qui a mis en évidence la dysrégulation des enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), glutamate (GPx) et la malondialdéhyde (MDA) des patients schizophréniques. Basé sur cette hypothèse, notre équipe, a adopté une corrélation qui lie les maladies neuropsychiatriques avec le stress oxydatif et la possibilité d'utiliser les produits naturels possédant un effet antioxydant puissant dans la régulation des dommages oxydatifs.

La démence de la schizophrénie (DS) est l'une des maladies neuropsychiatriques des plus sévères et coûteuses dans le monde. La schizophrénie, dans le sens commun, est définie comme étant un trouble mental estimé par des difficultés de parler, de discuter, d'élaborer des idées et de les exprimer. Toutes ces dysfonctions développent des pensées hallucinantes provoquant une scission totale de la réalité [154]. Une étude faite en 2018, a estimé que plus de 20 millions de

personnes vivent avec la schizophrénie dont la majorité des pays sont à revenu faible et intermédiaire [283]. D'où la nécessité d'explorer d'autres traitements plus efficaces et remédiant aux différents symptômes liés à cette démence.

2.1. Les tests comportementaux

2.1.1 Test de labyrinthe en Y

L'administration orale des extraits de TGC avec différentes doses (50 et 100 mg/Kg) durant 7 jours consécutifs aux modèles d'animaux de schizophrénie a permis d'observer une modification positive des alternations spontanées. Ainsi, dans la [Figure 62](#), nous observons que le groupe modèle de la schizophrénie reflète une altération de la mémoire à court-terme exprimée par un niveau faible de pourcentage des alternations spontanées comparé avec celui du groupe contrôle ($p < 0,002$). Quant aux extraits, nous remarquons que tous les extraits de TGC augmentent significativement le pourcentage des alternations spontanées et plus considérablement l'extrait d'EtOAc qui a augmenté significativement le pourcentage des alternations spontanées à une dose de 100 mg/Kg plus que la moitié de la dose ($p = 0,001$) comparé avec le groupe méthionine. En effet, la dose de 100 mg/Kg de l'extrait d'EtOAc a augmenté remarquablement le pourcentage des alternations spontanées de ($84,37 \pm 5,41$) comparé avec la dose de 50 mg/Kg environ ($71,62 \pm 4,78$) et comparé avec le groupe méthionine de ($58,56 \pm 2,30$). De même, l'extrait acétonique a augmenté significativement le pourcentage des alternations spontanées ($p < 0,002$) avec une dose de 100 mg /Kg par rapport à la moitié de la dose ($p \geq 0,2$) confirmant ainsi l'effet positif du TGC sur la mémoire à court-terme.

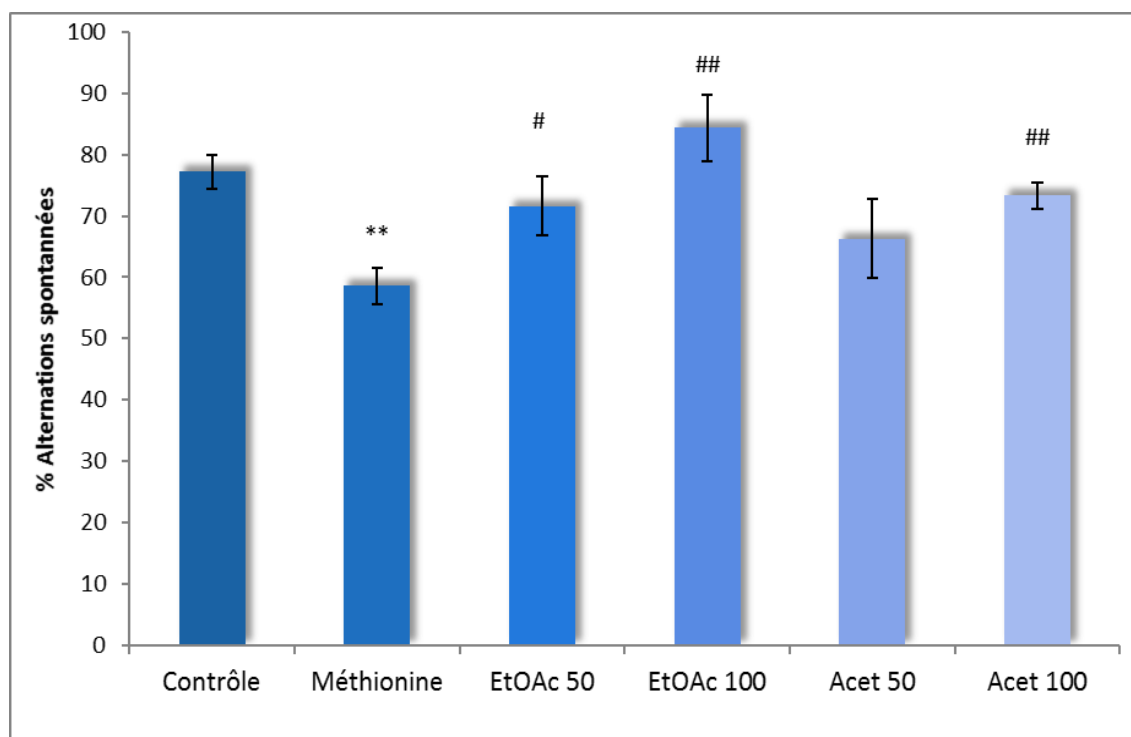


Figure 62 : Effet de l'administration des extraits des TGC (50 and 100 mg/kg) sur le pourcentage des alternations spontanées dans le test de labyrinthe en Y contre le groupe contrôle et le groupe méthionine

2.1.2 Test de labyrinthe en croix surélevé (EPM)

Le test de labyrinthe en croix surélevé a été utilisé pour le screening de l'effet anxiolytique des TGC. De ce fait, dans la [Figure 63](#), nous remarquons que l'administration de la méthionine a impliqué un effet anxieux exprimé par une réduction remarquable du temps passé dans les bras ouverts (4 s) par rapport au groupe contrôle ($19,75 \pm 8,56$ s). Par conséquent, tous les extraits de TGC améliorent le temps passé dans les bras ouverts ($13,29 \pm 2,30$ s). Ainsi, l'administration d'extrait d'acétate d'éthyle (50 mg/Kg) présente un effet de type anxiolytique détecté dans la longue durée passée dans les bras ouverts ($11,83 \pm 6,56$ s). Toutefois, une dose de 100 mg/Kg était moins efficace que la demi-dose ($8,5 \pm 0,2$ s). Les deux extraits (EtOAc, acétone) ont montré les mêmes effets sur le temps passé dans les bras ouverts avec les mêmes observations par rapport aux doses administrées. L'extrait d'acétone à (50 mg/Kg) a été le plus efficace ($19,5 \pm 5,5$ s). Par ailleurs, le test d'anova n'a pas donné une différence statistique significative entre les groupes ($p > 0,05$).

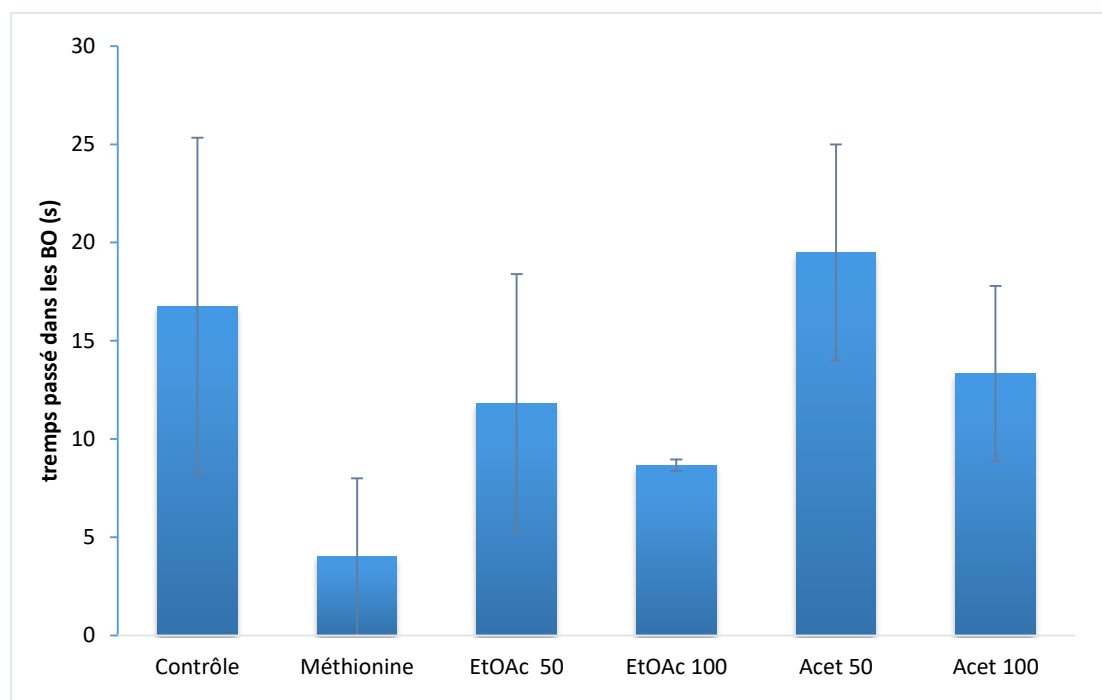


Figure 63 : Effet anxiolytique des extraits des TGC (EtOAc et Acet) avec différentes doses (50 et 100 mg/Kg) sur le temps passé dans les bras ouverts (BO) vs. Groupes contrôle et méthionine.

2.1.3 Test de nage forcée (FST)

Les extraits d'EtOAc et d'acétone de TGC à différentes doses de (50 et 100 mg/Kg) diminuent le temps d'immobilité par rapport au groupe méthionine. L'extrait acétonique réduit considérablement le temps d'immobilité ($14,20 \pm 6,78$ s, $p = 0,05$) à une dose de (50 mg/Kg) suggérant un effet antidépresseur par rapport au groupe méthionine ($60,0 \pm 17,2$ s) ainsi que pour l'extrait d'acétate d'éthyle ($19 \pm 5,87$ et $27 \pm 12,34$ s) respectivement pour 50 et 100 mg/Kg. Par conséquent, avec la dose élevée d'extrait d'EtOAc, un petit changement a été détecté dans le temps d'immobilité ($56,00 \pm 3,34$ s) par rapport au groupe méthionine ($60 \pm 17,2$ s). Néanmoins, une dose de 50 mg/Kg a réduit efficacement le temps d'immobilité suggérant un effet antidépresseur intéressant de l'extrait EtOAc de TGC ([Figure IV.12](#)).

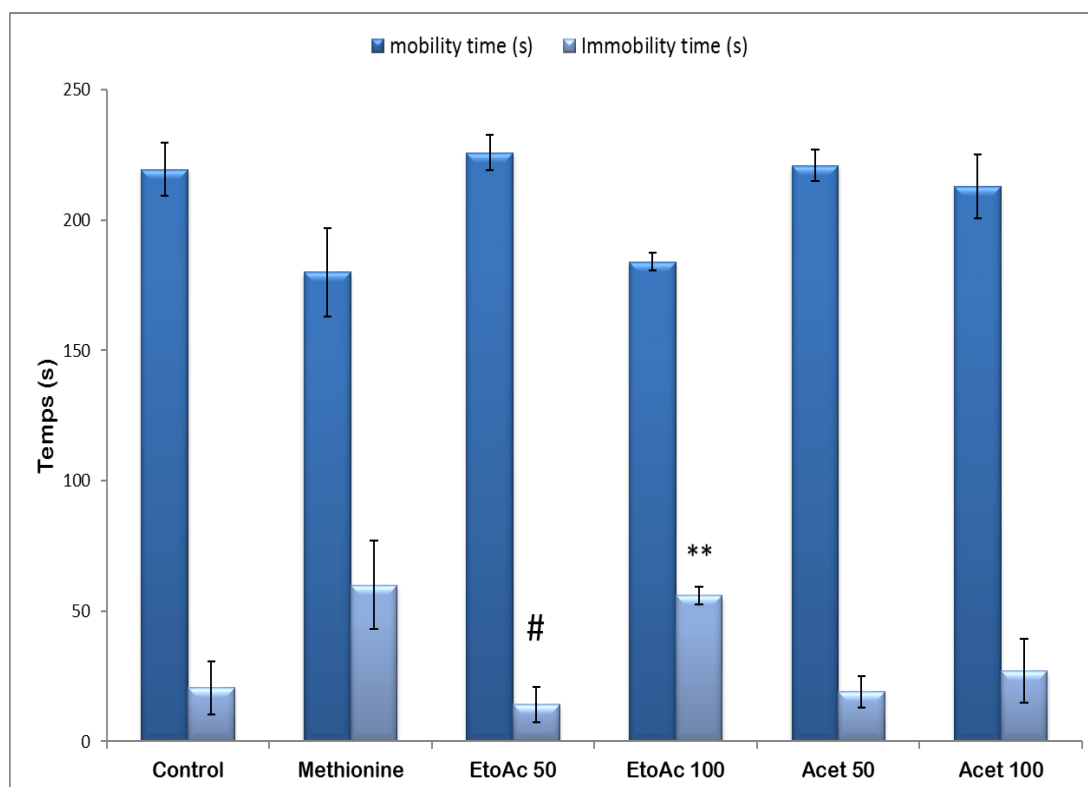


Figure 64 : Effet antidépresseur des extraits des TGC des différentes doses (50 et 100 mg/Kg) sur le temps d'immobilité et de mobilité des souris. ($n = 6$ souris/groupe) contre le groupe contrôle

2.1.4 Test de reconnaissance des nouveaux objets

Le test de reconnaissance des nouveaux objets permet de mesurer en plus du niveau d'exploration de nouveaux objets, la capacité de la mémoire de travail (à court terme), l'attention et l'anxiété. L'exposition à un nouvel espace ou de même à un nouveau objet dérive un niveau de stress élevé provoquant ainsi l'augmentation du taux de corticostérone plasmatique, qui représente un index de stress, appuyant davantage sur l'utilité de ce test [284]. La [Figure 64](#), montre l'effet d'administration de la méthionine sur le pourcentage de préférence qui a été diminué de façon remarquable par rapport au groupe contrôle. En revanche, l'administration des deux extraits a amélioré le temps d'exploration des souris. Néanmoins, L'extrait d'EtOAc avec les deux doses par rapport aux groupes contrôle et méthionine a augmenté de manière significative le temps de préférence pour le nouvel objet ($p = 0,001$ et $p = 0,004$) pour 50 et 100 mg/Kg respectivement. En outre, l'extrait acétonique a amélioré de même la mémoire et le niveau exploratoire du nouvel objet. Cependant, l'extrait le plus remarquable est celui d'EtOAc avec une dose de 50 mg/Kg qui a augmenté significativement le pourcentage de préférence de

l'objet nouveau comparé au groupe témoin ($54,7\% \pm 1,66$, $p = 0,0013$) ainsi que par rapport au groupe méthionine ($p = 0,005$).

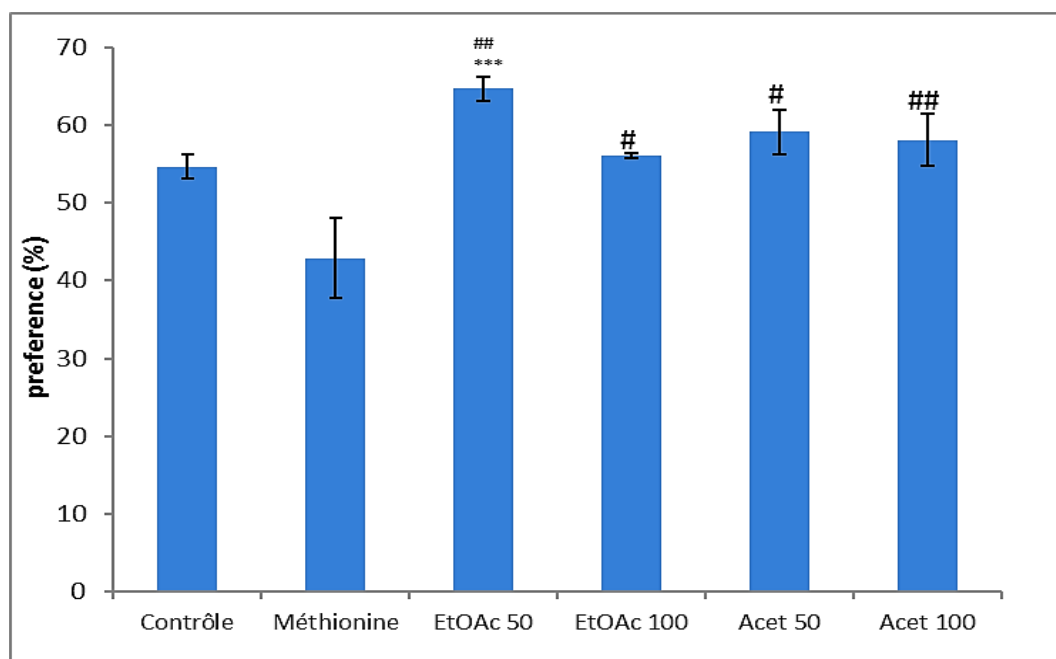


Figure 65 : Effet des extraits des TGC sur le % de préférence entre le nouvel objet et l'objet familier par rapport au groupe contrôle et groupe méthionine.

2.2. Les enzymes antioxydantes

L'évaluation des enzymes antioxydantes dans cette partie a pour objectif crucial de confirmer premièrement l'altération du système oxydatif des animaux modèle des symptômes de la schizophrénie induite par l'administration de la méthionine et deuxièmement pour évaluer l'effet des extraits de TGC sur l'amélioration des dommages oxydatifs liés à la présente démence.

2.2.1 Activité de la superoxyde dismutase (SOD)

Le niveau de SOD a augmenté de façon remarquable et avec une différence significative lorsqu'il est administré avec les extraits d'EtOAc et d'acétone à une dose de 50 mg/Kg respectivement autour de la valeur ($1,93 \pm 0,26$ U/mg ; $1,63 \pm 0,1$ U/mg ; $p \leq 0,02$), par rapport au groupe méthionine ($0,94 \pm 0,22$ U/mg) (Figure 66). Aucune différence n'a été détectée entre les deux doses de l'extrait d'acétone, mais de façon inattendue, une dose de 100 mg/Kg d'EtOAc a diminué l'activité SOD par rapport à la dose de 50 mg/Kg. Par conséquent, tous les extraits ont augmenté l'activité de SOD par rapport au groupe méthionine. Cependant, il convient de noter que l'extrait d'EtOAc à une dose de 50 mg/Kg a montré une activité de SOD la plus élevée par rapport au groupe contrôle ($p = 0,04$). Une étude antérieure de [285] a confirmé que

l'activité de la SOD est réduite chez les patients diagnostiqués schizophrènes. Effectivement, le groupe méthionine a révélé une activité SOD réduite par rapport à celle du groupe témoin. Conformément, le traitement avec la quétiapine et halopéridol (des médicaments antipsychotiques) a révélé une élévation de l'activité de la SOD, suggérant que ceci est dû à la forte activité antioxydante de ces traitements [282,286]. Les gousses du caroubier ont été aussi efficace pour empêcher l'épuisement de l'activité des différentes enzymes antioxydantes dont la SOD par les dommages oxydatifs induits par l'éthanol [31]. Ainsi, vu l'activité antioxydante puissante du TGC, nous confirmons son effet intéressant sur l'amélioration de l'activité de la SOD en proposant ainsi ce composé comme alternative naturelle pour le traitement de la schizophrénie.

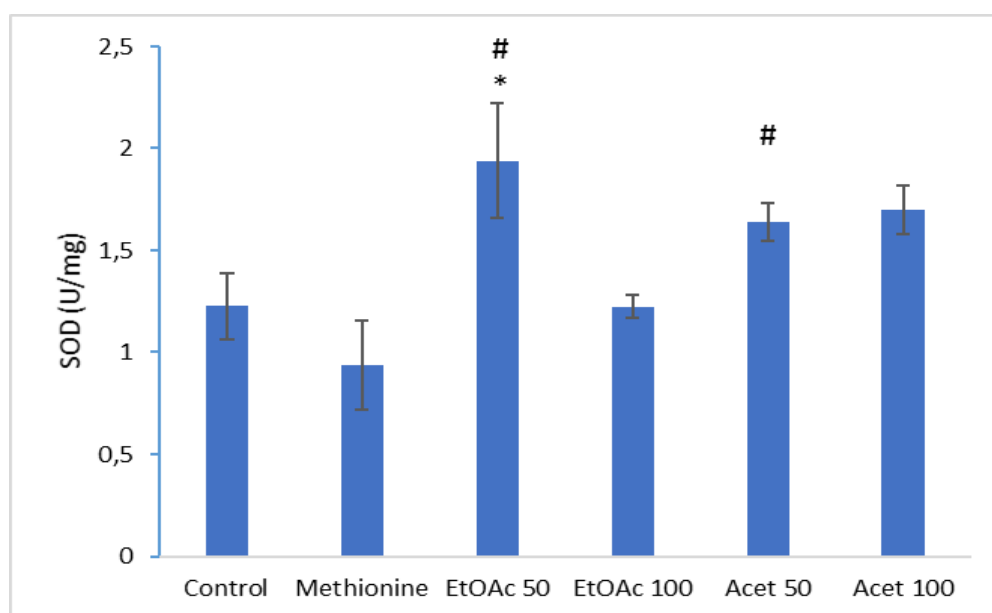


Figure 66 : Effet des extraits d'EtOAc et d'acétone des TGC sur l'activité spécifique de la SOD vs les groupes contrôle et de méthionine

2.2.2 Activité de la glutathion peroxydase (GPx)

Les extraits de TGC ont augmenté significativement l'activité de la GPx chez les souris traitées avec de la méthionine par rapport au groupe méthionine ($p = 0,0015$) qui a diminué significativement l'activité de la GPx par rapport au groupe contrôle ($p \leq 0,005$) (Figure 67). L'extrait d'acétate d'éthyle était remarquablement efficace pour augmenter l'activité spécifique de GPx à une dose de 50 mg/Kg. Une différence de dose de l'extrait acétonique influence positivement l'activité, de façon qu'avec l'augmentation de la dose, l'activité de la GPx a augmenté. Contrairement à l'extrait acétonique, l'extrait d'EtOAc n'a pas montré une amélioration lors de l'administration d'une dose élevée (100 mg /Kg) par rapport au groupe

méthionine ($p \leq 0,01$). Nos résultats sont en accord avec les études précédentes qui ont reporté la diminution de l'activité de la GPx chez les patients avec la schizophrénie ainsi le groupe méthionine a confirmé les résultats déjà reportés [287]. En outre, une diminution inattendue a été reportée chez les patients traités avec l'halopéridol. Cependant, cette diminution a été attribuée à la maladie elle-même et non au type de traitement. Certes, le déficit en GPx a été suggéré être un des symptômes sévères de la maladie, vu que le glutathion joue un rôle important dans la protection des cellules contre les dommages oxydatifs durant le métabolisme de la dopamine. De ce fait, le TGC a prouvé un effet plus puissant que celui déjà reporté des traitements usuels.

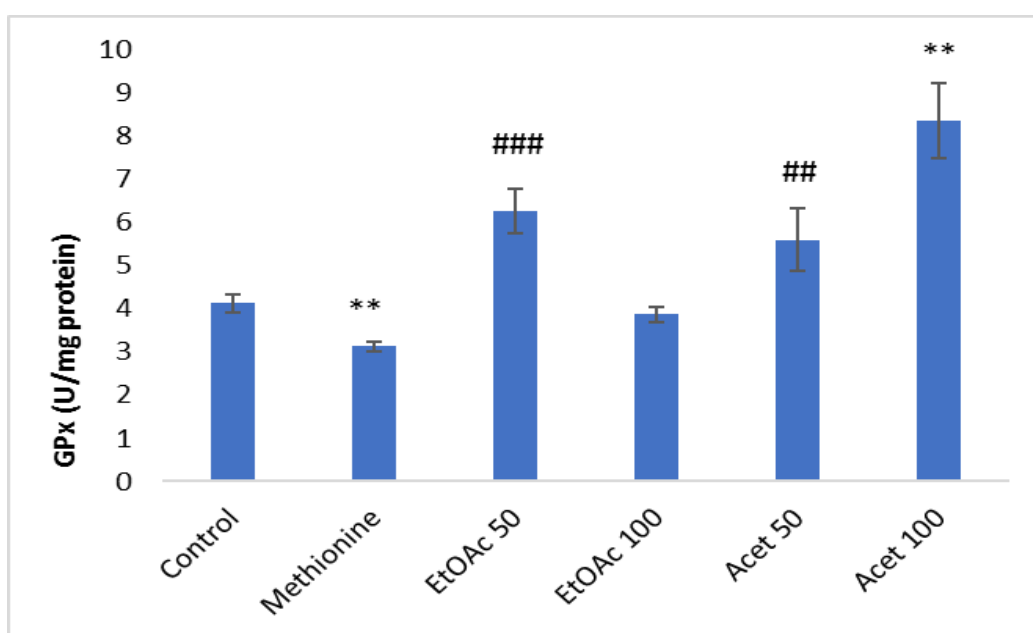


Figure 67 : Effet des extraits des TGC sur l'activité spécifique de GPx par rapport aux groupes contrôle et méthionine. Les données sont présentées (moyenne $\pm$ écart-type). ($n = 4$; 6 par groupe). ** $p \leq 0,01$ vs. Contrôle, ## $p \leq 0,01$ et ### $p \leq 0,001$ vs. Méthionine.

2.2.3 Détermination de la concentration de malondialdéhyde (MDA)

En ce qui concerne la concentration de MDA, nous avons détecté une diminution significative des groupes traités avec de la méthionine et administrés avec les extraits de l'EtOAc et d'acétone ($p \leq 0,04$) par rapport à l'extrait de méthionine. Les groupes traités avec de l'extrait d'acétone ont montré une diminution de la concentration de MDA plus importante par rapport aux groupes de l'EtOAc et même par rapport au groupe témoin. De plus, une diminution significative a été observée avec l'extrait d'acétone à une dose de 100 mg/Kg environ ($p \leq 0,04$) par rapport au groupe méthionine. Contrairement à l'extrait acétonique, une concentration réduite de MDA a

été détectée à une dose de 50 mg/Kg d'extrait d'EtOAc. En effet, la concentration de MDA a été déjà confirmée être élevée chez les patients schizophréniques n'ayant jamais reçus de traitements. Par conséquent, nous observons que la concentration de la MDA du groupe méthionine est supérieure par rapport au groupe contrôle ([Figure 68](#)). Ainsi, des traitements avec les antipsychotiques typiques et atypiques ont été proposés d'avoir un effet normalisant sans apporter une différence significative sur les activités des enzymes surtout la MDA. De ce fait, plusieurs auteurs ont suggéré l'utilisation des antioxydants pour améliorer le traitement des patients schizophrènes [143,288,289]. En ce qui concerne l'effet du TGC, ce composé a prouvé un effet très intéressant dans le traitement de la démence de la schizophrénie.

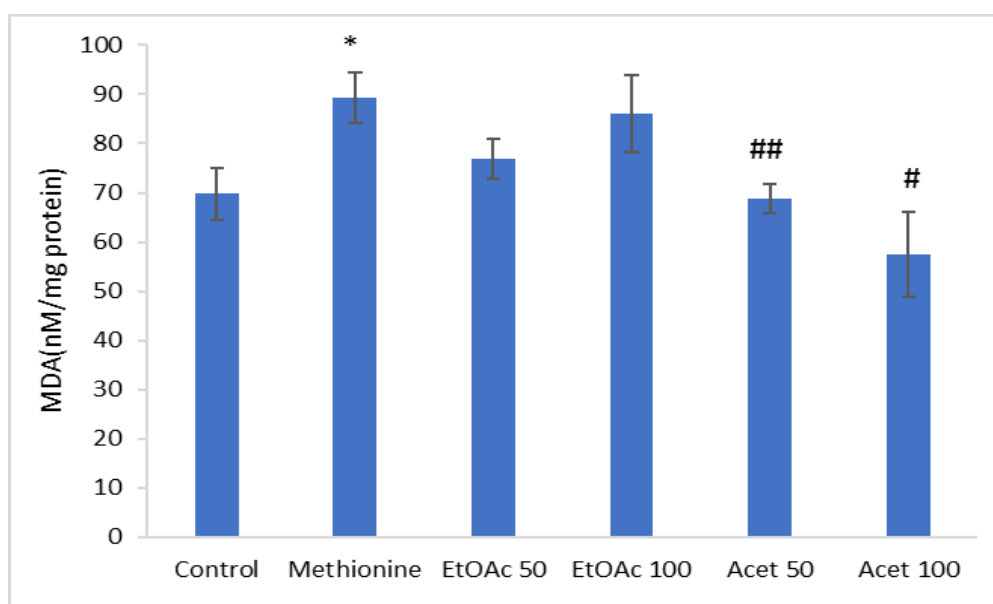


Figure 68 : Effet des extraits des TGC (acétate d'éthyle (50 et 100 mg / kg) et acétone (50 et 100 mg / kg) sur les taux de malondialdéhyde (MDA) par rapport aux groupes contrôle et méthionine.

Conclusion

L'activité antioxydante des téguments de graines de caroube a été révélée puissante dans le chapitre précédent. De ce fait, la valorisation de ce composé s'est orientée vers le domaine pharmacologique et particulièrement vers le traitement des maladies neuropsychiatriques. L'évaluation des effets anxiolytique et antidépresseur ont été réalisés par les tests de labyrinthe en Y, de labyrinthe en croix surélevé ainsi que par le test de nage forcée et le test en champ ouvert. L'effet des extraits du tégument a été révélé bénéfique par tous ces tests déjà cités et suggérés avoir un effet positif sur les troubles de mémoire et des fonctions cognitives et notamment sur les troubles d'humeur telles que l'anxiété et la dépression.

Le stress oxydatif est un élément qui semble constituer un point central où d'autres facteurs de vulnérabilité se rencontrent et leurs interactions pourraient jouer un rôle décisif dans le développement de la schizophrénie. En se basant sur les résultats de l'activité antioxydante et des tests comportementaux, le TGC a été testé aussi pour son effet de remédier aux différents symptômes de la schizophrénie induite par l'injection de la méthionine. Les extraits de TGC ont confirmé leurs effets intéressants sur les troubles cognitifs et sur la mémoire en comparaison avec le groupe méthionine confirmé par les tests de comportements appliqués. La détermination des enzymes antioxydantes dont l'activité de la SOD, GPx et de la MDA a confirmé la corrélation entre la dérégulation des niveaux des enzymes antioxydantes dans le cerveau et la schizophrénie. Par conséquent, le TGC a amélioré l'activité de ces enzymes et a remédié aux symptômes négatifs de la démence de la schizophrénie induite par la méthionine. Ces multiples effets bénéfiques du TGC encouragent son application comme antioxydant naturel à effet thérapeutique contre les troubles mentaux et en particulier la schizophrénie.



Conclusion générale



Conclusion générale

Les graines de caroube représentent la partie la plus précieuse du fruit du caroubier du fait qu'elles contiennent la gomme de caroube appelée aussi additif alimentaire E410. Cette gomme est utilisée comme agent stabilisant, épaississant et gélifiant dans la plupart des domaines industriels. De ce fait, le développement d'une méthode innovante de l'extraction de cette gomme était l'un des principaux volets de cette thèse. Les différentes méthodes classiques de décorticage et d'extraction de la gomme de caroube (méthodes acide et thermique) ont été effectuées en premier lieu afin de s'en servir comme substrat de comparaison.

- La gomme de caroube obtenue par la méthode acide était de couleur blanchâtre avec un rendement de 34-42%.
- La gomme de caroube extraite par la méthode thermique permet de récupérer une gomme de couleur jaunâtre et avec un rendement supérieur de 55-59%.

La méthode inventée repose sur l'utilisation des enzymes cellulases afin d'hydrolyser le tégument dur renfermant l'endosperme qui constitue la matière de base de la gomme de caroube. La méthode d'hydrolyse enzymatique est une méthode écologique et prometteuse permettant de récupérer la gomme de caroube avec un rendement élevé tout en préservant l'environnement et la structure du substrat. L'extraction par les enzymes cellulases de la gomme de caroube a été réalisée sur les graines de caroube entières ainsi que sur les graines broyées. Le décorticage des graines de caroube entières a été réalisé par hydrolyse enzymatique en utilisant les enzymes cellulases couplées par une déstabilisation dans un bain ultrasons. Après application des paramètres optimisés (un substrat de 1-5 g et concentration d'enzyme de 5-10U durant 2 h à un pH de 4,8), les graines ont été faciles au décorticage manuel permettant la récupération de la fraction d'endosperme, du germe et du tégument.

Le procédé d'extraction de la gomme de caroube par hydrolyse enzymatique a été optimisé par la méthodologie des plans d'expériences en utilisant un modèle de surface de réponse. Effectivement, la validation du modèle a permis d'obtenir des points optimums des différents facteurs de contrôle de la réaction d'hydrolyse enzymatique ($T^{\circ} = 50^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,8$, $t = 3\text{h}$ et $S = 9,2\%$ avec $E = 2,98\text{ U}$). Par ailleurs, d'autres étapes ont été élaborées pour récupérer une gomme de qualité supérieure. Après hydrolyse enzymatique de toute la quantité des graines broyées, des étapes de centrifugation et de séparation sont effectuées pour récupérer les trois parties de la graine puis une dernière étape de lyophilisation permettant ainsi de sécher la poudre de caroube extraite.

Le screening phytochimique et l'évaluation de l'activité antioxydante des deux fractions du germe et tégument ont permis de déterminer la richesse de ces deux parties en métabolites secondaires aux effets pharmacologiques importants. L'utilisation des méthodes du DPPH, FRAP, PM et du β -carotène ont confirmé une activité antioxydante puissante. En effet, le TGC présente une capacité à inhiber les radicaux libres du DPPH importante avec une IC_{50} de 0,044 mg/mL, plus efficace que celle de l'antioxydant de référence le BHT (0,15 mg/mL). Le TGC a aussi présenté une activité antibactérienne intéressante contre *Bacillus subtil*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. En outre, le germe a également exercé une activité antioxydante importante vu sa contenance en majorité des métabolites secondaires recherchés.

Le stress oxydatif joue un rôle principal dans le développement de nombreuses maladies chroniques incluant le cancer, le diabète, les maladies cardiovasculaires ainsi que les maladies neuropsychiatriques. L'hypothèse de la corrélation entre le stress oxydatif et la détérioration des fonctions cognitives sur le développement des différents troubles neuropsychiatriques a été adoptée dans cette étude contre particulièrement l'anxiété, la dépression et la schizophrénie. Le TGC a été utilisé comme un antioxydant naturel pouvant traiter les troubles cognitifs liés à l'anxiété et à la dépression. En plus, il peut remédier aux symptômes liés à la schizophrénie induite par la méthionine. Les différents tests comportementaux à savoir le labyrinthe en Y, le labyrinthe en croix surélevé, le test de nage forcée, le test en champ ouvert et de reconnaissance des nouveaux objets ont permis d'estimer l'efficacité du traitement des troubles neuropsychiatriques par les antioxydants naturels et particulièrement le TGC. De plus, la détermination des activités des enzymes antioxydantes (SOD, GPx et MDA) a permis de corréler le déséquilibre de ces activités avec le développement de la démence de la schizophrénie ainsi que d'admettre la capacité du TGC comme antioxydant naturel capable d'améliorer l'activité de ces enzymes et de remédier aux troubles cognitifs liés aux maladies neuropsychiatriques.



Perspectives



- ✓ L'optimisation de l'hydrolyse enzymatique par les cellulases de *Trichoderma reesei* dans ce travail a été effectuée par un plan composite (surface de réponse), par conséquent d'autres modèles de la méthodologie des plans d'expériences peuvent être utilisés avec d'autres sources d'enzymes cellulases qui sont économiquement moins coûteuses.
- ✓ Etude de l'optimisation des procédés d'hydrolyse enzymatique sur des quantités plus grandes de graines de caroube en réalisant une nouvelle optimisation du prétraitement des graines. Cette étape permettra de déterminer les contraintes industrielles qui peuvent influencer l'application des présents prétraitements proposés.
- ✓ Séparation du mélange de l'extrait d'acétate d'éthyle. Purification, identification et caractérisation des produits séparés des extraits hexanique et méthanolique du TGC.
- ✓ Réalisation des tests *in vivo* des produits purs des extraits du TGC sur des modèles animaux des maladies neuropsychiatriques surtout de la schizophrénie.
- ✓ Suivi des étapes d'élaboration d'un médicament (cela peut prendre plusieurs années) par la synthèse du produit pur révélé capable de remédier aux symptômes liés à la schizophrénie.



Références bibliographiques



- [1] N. Gharnit, A. Ennabili, and E. El Hamdouni, "Inventory and social interest of medicinal, aromatic and boney-plants from Morkrisset region (NW of Morocco)," *Stud. Bot.*, no. 19, pp. 57–74, 2000.
- [2] A. Azab, "CAROB (*Ceratonia siliqua*): Health, Medicine, Chemistry," *Eur. Chem. Bull.*, vol. 6, no. 10, p. 456, 2017.
- [3] A. Sassi, I. Bouhleb, N. Mustapha, I. M. Bzeouich, K. Ghedira, and L. Chekir-ghedira, "Assessment in vitro of the genotoxicity, antigenotoxicity and antioxidant of *Ceratonia siliqua* L. extracts in murine leukaemia cells L1210 by comet assay," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, pp. 1–30, 2016.
- [4] W. Aidi Wannes, M. Saidani Tounsi, and B. Marzouk, "A review of Tunisian medicinal plants with anticancer activity," *J. Complement. Integr. Med.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–35, 2018.
- [5] N. Lachkar *et al.*, "Anti-inflammatory and antioxidant effect of *Ceratonia siliqua* L. methanol barks extract," *J. Chem. Pharm. Res.*, vol. 3, no. 8, pp. 202–210, 2016.
- [6] K. Nagib, O. A. Eldahshan, and W. F. A. M. El-Khatib, "Promising antioxidant and cytotoxic activities of the aqueous ethanolic extract of carob leaves," *African J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 4, no. 6, pp. 330–334, 2010.
- [7] I. Batlle and J. Tous, "Carob Tree. (*Ceratonia Siliqua*, L.)," *Bull. Misc. Inf. (Royal Gard. Kew)*, no. 140, p. 184, 1997.
- [8] A. Ben Hsouna, M. Trigui, R. Ben Mansour, R. M. Jarraya, M. Damak, and S. Jaoua, "Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 148, no. 1, pp. 66–72, 2011.
- [9] K. Hammer, H. Knüpffer, and P. Laghetti, G and Perrino, *Seeds from the Past: A Catalogue of Crop Germplasm in South Italy and Sicily*. Bari: Consiglio Nazionale delle Ricerche (Italia). Istituto del Germoplasma, 1992.
- [10] R. M. Polhill, P. H. Raven, and C. H. Stirton, "Evolution and systematics of the Leguminosae," *Adv. Legum. Syst.*, vol. 1, p. Pp. 1-26, 1981.
- [11] P. Goldblatt, "Cytology and the phylogeny of the Leguminosae," *Adv. Legum. Syst.*, vol. 2, p. Pp. 427-464, 1981.
- [12] I. KONATE, "Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) et des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées," UNIVERSITE MOHAMMED

V-AGDAL FACULTE DES SCIENCES RABAT, 2007.

- [13] A. Aafi, “Note technique sur le caroubier (*Ceratonia siliqua* L.),” *Cent. Natl. la Rech. For. Rabat (Maroc)*, p. 10p, 1996.
- [14] M. Ait Chitt, M. Belmir, and A. Lazrak, “Production de plants sélectionnés et greffés de caroubier,” *Program. Natl. Transf. Technol. en Agric.*, vol. 153, pp. 77–80, 2007.
- [15] A. Haddarah, “L’influence des cultivars sur les propriétés fonctionnelles de la caroube Libanaise,” Université de Lorraine Et Université Libanaise, 2013.
- [16] K. Mitrakos, “Temperature Germination Responses In Three Mediterranean Evergreen Sclerophylls,” in *Components of Productivity of Mediterranean-Climate Regions _ Basic and Applied Aspects*, the hague/Boston/London: Dr W. Junk Publishers, 1981, pp. 277–279.
- [17] FAOSTAT, “Food and Agriculture Organisation of the United Nations,” 2018. <http://www.fao.org/faostat>.
- [18] N. Mustapha and S. Lahssini, “La filière caroubier au service du développement socio-économique des territoires forestiers de montagne,” 2015.
- [19] H. El Batal, A. Hasib, A. Ouatmane, A. Boulli, F. Dehbi, and A. Jaouad, “Yield and composition of carob bean gum produced from different Moroccan populations of carob (*Ceratonia siliqua* L.),” *J. Mater. Environ. Sci.*, vol. 4, no. 2, pp. 309–314, 2013.
- [20] M. Khelifa, A. Bahloul, and S. Kitane, “Determination of chemical composition of carob pod (*Ceratonia siliqua* L) and its morphological study,” *J. Mater. Environ. Sci.*, vol. 4, no. 3, pp. 348–353, 2013.
- [21] E. Albanell, G. CAJA, and J. Plaixats, “Characteristics of Spanish carob pods and nutritive value of carob kibbles,” *Options Méditerranéennes*, no. N° 16, pp. 135–136, 1991.
- [22] R. Avallone, M. Plessi, M. Baraldi, and A. Monzani, “Determination of Chemical Composition of Carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, Fat, Carbohydrates, and Tannins,” *J. food Compos. Anal.*, vol. 10, no. 2, pp. 166–172, 1997.
- [23] S. Kumazawa, M. Taniguchi, Y. Suzuki, M. Shimura, M. S. Kwon, and T. Nakayama, “Antioxidant activity of polyphenols in carob pods,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 2, pp. 373–377, 2002.
- [24] F. A. Ayaz *et al.*, “Determination of chemical composition of anatolian carob pod (*Ceratonia siliqua* L.): Sugars, amino and organic acids, minerals and phenolic compounds,” *J. Food Qual.*, vol. 30, no. 6, pp. 1040–1055, 2007.
- [25] H. Torun, F. A. Ayaz, N. Colak, J. Grúz, and M. Strnad, “Phenolic Acid Content and

- Free Radical-Scavenging Activity of Two Differently Processed Carob Tree (*Ceratonía siliqua* L.) Pod,” *Food Nutr. Sci.*, vol. 04, no. 05, pp. 547–553, 2013.
- [26] H. El Batal, A. Hasib, A. Ouattmane, F. Dehbi, A. Jaouad, and A. Boulli, “Sugar composition and yield of syrup production from the pulp of Moroccan carob pods (*Ceratonía siliqua* L.),” *Arab. J. Chem.*, vol. 9, pp. S955–S959, 2016.
- [27] H. El Hajaji *et al.*, “Etude comparative de la composition minérale des constituants de trois catégories de *Ceratonía siliqua* L.,” *J. Mater. Environ. Sci.*, vol. 4, no. 2, pp. 165–170, 2013.
- [28] L. B. Roseiro *et al.*, “Supercritical, ultrasound and conventional extracts from carob (*Ceratonía siliqua* L.) biomass: Effect on the phenolic profile and antiproliferative activity,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 47, pp. 132–138, 2013.
- [29] D. P. Makris and P. Kefalas, “Carob pods (*Ceratonía siliqua* L.) As a source of polyphenolic antioxidants,” *Food Technol. Biotechnol.*, vol. 42, no. 2, pp. 105–108, 2004.
- [30] H. Suzek, I. Celik, and A. Dogan, “Nephroprotective Hepatoprotective Potential and Antioxidant Role of Carob Pods (*Ceratonía siliqua* L .) against Carbon Tetrachloride-induced Toxicity in Rats,” *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, vol. 51, no. 2, pp. 312–320, 2017.
- [31] K. Rtibi *et al.*, “Gastroprotective effect of carob (*Ceratonía siliqua* L.) against ethanol-induced oxidative stress in rat,” *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–8, 2015.
- [32] K. Rtibi *et al.*, “Preventive effect of carob (*Ceratonía siliqua* L.) in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in rat,” *RSC Adv.*, vol. 6, no. 24, pp. 19992–20000, 2016.
- [33] A. Macho-González *et al.*, “Carob-fruit-extract-enriched meat modulates lipoprotein metabolism and insulin signaling in diabetic rats induced by high-saturated-fat diet,” *J. Funct. Foods*, no. September, p. 103600, 2019.
- [34] A. Agrawal *et al.*, “Antidepressant activity of *Ceratonía siliqua* L. fruit extract, a source of polyphenols,” *Nat. Prod. Res.*, vol. 25, no. 4, pp. 450–456, 2011.
- [35] K. Rtibi *et al.*, “Chemical constituents and pharmacological actions of carob pods and leaves (*Ceratonía siliqua* L.) on the gastrointestinal tract: A review,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 93, pp. 522–528, 2017.
- [36] F. Fadel, S. Fattouch, S. Tahrouch, R. Lahmar, A. Benddou, and A. Hatimi, “Les composés phénoliques des pulpes et des graines de *Ceratonía siliqua*,” *J. Mater. Environ.*

- Sci.*, vol. 2, no. 3, pp. 285–292, 2011.
- [37] S. M. Nasar-Abbas, Z. E-Huma, T. H. Vu, M. K. Khan, H. Esbenshade, and V. Jayasena, “Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 15, no. 1, pp. 63–72, 2016.
 - [38] L. Corsi, R. Avallone, F. Cosenza, F. Farina, C. Baraldi, and M. Baraldi, “Antiproliferative effects of *Ceratonia siliqua* L. on mouse hepatocellular carcinoma cell line,” *Fitoterapia*, vol. 73, no. 7–8, pp. 674–84, 2002.
 - [39] R. W. Owen *et al.*, “Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 41, no. 12, pp. 1727–1738, 2003.
 - [40] K. Rtibi *et al.*, “*Ceratonia siliqua* L. (immature carob bean) inhibits intestinal glucose absorption, improves glucose tolerance and protects against alloxan-induced diabetes in rat,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 97, no. 8, pp. 2664–2670, 2017.
 - [41] I. Hamid and K. H. Janbaz, “Ethnopharmacological basis for antispasmodic, antidiarrheal and antiemetic activities of *Ceratonia siliqua* pods,” *Bangladesh J. Pharmacol.*, vol. 12, no. 4, p. 384, 2017.
 - [42] E. Nachtomi and E. Alumot, “Tannins and polyphenols in carob pods (*Ceratonia siliqua*),” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 14, no. 7, pp. 464–468, 1963.
 - [43] S. H. K. Kumazawa, M. A. S. A. T. Aniguchi, Y. A. S. Uzuki, M. A. S. Himura, M. I. U. N. K. Won, and T. S. N. Akayama, “Antioxidant Activity of Polyphenols in Carob Pods,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, pp. 373–377, 2002.
 - [44] C. Bengoechea *et al.*, “Composition and structure of carob (*Ceratonia siliqua* L.) germ proteins,” *Food Chem.*, vol. 107, no. 2, pp. 675–683, 2008.
 - [45] Ł. Sęczyk, M. Wiecek, and U. Gawlik-Dziki, “Effect of carob (*Ceratonia siliqua* L.) flour on the antioxidant potential, nutritional quality, and sensory characteristics of fortified durum wheat pasta,” *Food Chem.*, vol. 194, pp. 637–642, 2016.
 - [46] L. Inserra *et al.*, “Effect of including carob pulp in the diet of fattening pigs on the fatty acid composition and oxidative stability of pork,” *Meat Sci.*, vol. 100, pp. 256–261, 2015.
 - [47] E. Yatmaz and I. Turhan, “Carob as a carbon source for fermentation technology,” *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 16, no. August, pp. 200–208, 2018.
 - [48] H. El Batal, A. Hasib, A. Bacaoui, F. Dehbi, A. Ouattmane, and A. Jaouad, “Syrup of natural carob sugars and a process for its production using Response Surface Methodology,” *Chem. Process Eng. Res.*, vol. 10, pp. 44–51, 2013.
 - [49] A. Hasib and H. El Batal, “Optimization of Production of Carob Pulp Syrup from Different Populations of Moroccan Carob (*Ceratonia siliqua* L.),” *Int. J. Emerg.*

- Technol. Adv. Eng.*, vol. 4, no. 3, pp. 855–863, 2014.
- [50] L. A. Turnbull, L. Santamaria, T. Martorell, J. Rallo, and A. Hector, “Seed size variability: From carob to carats,” *Biol. Lett.*, vol. 2, no. 3, pp. 397–400, 2006.
 - [51] P. A. Dakia, *Carob (Ceratonia siliqua L.) Seeds, Endosperm and Germ Composition, and Application to Health*. Elsevier Inc., 2011.
 - [52] M. K. E. Youssef, M. M. El-Manfaloty, and H. M. Ali, “Assessment of proximate chemical composition, nutritional status, fatty acid composition and phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.),” *Food Public Heal.*, vol. 3, no. 6, pp. 304–308, 2013.
 - [53] I. J. Stavrou, A. Christou, and C. P. Kapnissi-Christodoulou, “Polyphenols in carobs: A review on their composition, antioxidant capacity and cytotoxic effects, and health impact,” *Food Chem.*, vol. 269, no. March, pp. 355–374, 2018.
 - [54] A. Gohar, S. R. Gedara, and H. N. Baraka, “New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua* L. seeds,” *J. Med. Plants Res.*, vol. 3, no. 5, pp. 424–428, 2009.
 - [55] A. Mekhoukhe *et al.*, “Antioxidant activity of carob seeds and chemical composition of their bean gum by-products,” *J. Complement. Integr. Med.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–11, 2019.
 - [56] P. A. Dakia, C. Blecker, C. Robert, B. Wathelet, and M. Paquot, “Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment,” *Food Hydrocoll.*, vol. 22, no. 5, pp. 807–818, 2008.
 - [57] H. R. Oziyici *et al.*, “Mineral composition of pods and seeds of wild and grafted carob (*Ceratonia siliqua* L.) fruits,” *Sci. Hortic. (Amsterdam)*, vol. 167, pp. 149–152, 2014.
 - [58] I. Albertos, I. Jaime, A. María Diez, L. González-Arnaiz, and D. Rico, “Carob seed peel as natural antioxidant in minced and refrigerated (4°C) Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*),” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 64, no. 2, pp. 650–656, 2015.
 - [59] P. A. Dakia, M. Michel, A. Combo, B. M. Yapo, D. Kouakou, and M. Paquot, “Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Seed Tegument Separation and Analysis : Comparison with Locust Bean Gum Hot-Water-Insoluble Residue Monosaccharide ’ s Composition,” *Int. J. New Technol. Res.*, vol. 3, no. 11, pp. 30–35, 2017.
 - [60] G. Thoorens, F. Krier, B. Leclercq, B. Carlin, and B. Evrard, “Microcrystalline cellulose , a direct compression binder in a quality by design environment — A review,” *Int. J. Pharm.*, vol. 473, no. 1–2, pp. 64–72, 2014.
 - [61] J. C. Ogier, D. Ballerini, J. P. Leygue, L. Rigal, and J. Pourquié, “Production d’éthanol à partir de biomasse lignocellulosique,” *Oil Gas Sci. Technol.*, vol. 54, no. 1, pp. 67–94, 1999.

- [62] S. Puspawati, Wagiman, M. Ainuri, D. A. Nugraha, and Haslianti, "The Production of Bioethanol Fermentation Substrate from *Eucheuma cottonii* Seaweed through Hydrolysis by Cellulose Enzyme," *Agric. Agric. Sci. Procedia*, vol. 3, pp. 200–205, 2015.
- [63] H. Myeong, S. Gon, S. Jung, Y. Song, and H. Bae, "Bioresource Technology Efficient approach for bioethanol production from red seaweed *Gelidium amansii*," *Bioresour. Technol.*, vol. 175, pp. 128–134, 2015.
- [64] S. K. Jha, H. R. Singh, and P. Prakash, *Dietary Fiber and Human Health: An Introduction*. Elsevier Inc., 2017.
- [65] H. Palonen, "Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose," 2004.
- [66] M. Tanahashi, S. Takada, T. Aoki, T. Goto, T. Higuchi, and S. Hanai, "Characterization of Explosion Wood: 1. Structure and Physical Properties," *Wood Res. Bull. Wood Res. Inst. Kyoto Univ.*, vol. 69, pp. 36–51, 1983.
- [67] J. A. Lopes da Silva and M. P. Gonçalves, "Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol," *Top. Catal.*, vol. 4, no. 4, pp. 277–287, 1990.
- [68] B. M. Smith, S. R. Bean, T. J. Schober, M. Tilley, T. J. Herald, and F. Aramouni, "Composition and Molecular Weight Distribution of Carob Germ Protein Fractions," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, pp. 7794–7800, 2010.
- [69] M. Samil K  k, "A comparative study on the compositions of crude and refined locust bean gum: In relation to rheological properties," *Carbohydr. Polym.*, vol. 70, no. 1, pp. 68–76, 2007.
- [70] S. Gillet, M. Simon, M. Paquot, and A. Richel, "Synthèse bibliographique de l' influence du procédé d' extraction et de purification sur les caractéristiques et les propriétés d' une gomme de caroube," *Biotechnol. Agron. Société Environ.*, vol. 18, no. 1, pp. 97–107, 2014.
- [71] M. A. Cerqueira *et al.*, "Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources," *Carbohydr. Polym.*, vol. 75, no. 3, pp. 408–414, 2009.
- [72] W. C. Wielinga and A. G. Meyhall, "Galactomannans," in *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*, 2009, pp. 228–251.
- [73] S. Barak and D. Mudgil, "Locust bean gum: Processing, properties and food applications-A review," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 66, pp. 74–80, 2014.
- [74] D. Mudgil, S. Barak, and B. S. Khatkar, "Guar gum: Processing, properties and food applications - A Review," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 51, no. 3, pp. 409–418, 2014.

- [75] N. Mathur, "Tara Gum," *Ind. Galactomannan Polysaccharides*, no. July, pp. 129–134, 2011.
- [76] Y. Kawamura, "CAROB BEAN GUM Chemical and Technical Assessment (CTA)," *69th JECFA*, vol. 1, no. 6, pp. 1–6, 2008.
- [77] L. R. Ferguson and P. J. Harris, "Dietary fibres and human health," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 49, no. 6, p. 517, 2005.
- [78] P. A. Dakia, B. Wathelet, and M. Paquot, "Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ," *Food Chem.*, vol. 102, no. 4, pp. 1368–1374, 2007.
- [79] J. K. Stechmiller, B. Childress, and L. Cowan, "Arginine supplementation and wound healing," *Nutr. Clin. Pract.*, vol. 20, no. 1, pp. 52–61, 2005.
- [80] L. Custódio *et al.*, "Phytochemical Profile, Antioxidant and Cytotoxic Activities of the Carob Tree (*Ceratonia siliqua* L.) Germ Flour Extracts," *Plant Foods Hum. Nutr.*, vol. 66, no. 1, pp. 78–84, 2011.
- [81] D. Rico *et al.*, "In vitro approach for evaluation of carob by-products as source bioactive ingredients with potential to attenuate metabolic syndrome (MetS)," *Heliyon*, vol. 5, no. 1, 2019.
- [82] J. B. Harborne, *Phytochemical Methods; A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, vol. 3. LONDON NEW YORK CHAPMAN AND HALL, 1998.
- [83] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, "Polyphenols: Food sources and bioavailability," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, pp. 727–747, 2004.
- [84] G. Ma and Y. Chen, "Polyphenol supplementation benefits human health via gut microbiota: A systematic review via meta-analysis," *J. Funct. Foods*, vol. 66, p. 103829, 2020.
- [85] I. Ignat, I. Volf, and V. I. Popa, "A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables," *Food Chem.*, vol. 126, no. 4, pp. 1821–1835, 2011.
- [86] M. D'Archivio, C. Filesi, R. Di Benedetto, R. Gargiulo, C. Giovannini, and R. Masella, "Polyphenols, dietary sources and bioavailability," *Ann. Ist. Super. Sanita*, vol. 43, no. 4, pp. 348–361, 2007.
- [87] K. B. Pandey and S. I. Rizvi, "Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2, no. 5, pp. 270–278, 2009.
- [88] K. Pyrzynska and M. Biesaga, "Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey," *Trends Anal. Chem.*, vol. 28, no. 7, pp. 893–902, 2009.
- [89] F. Fusi, A. Trezza, M. Tramaglino, G. Sgaragli, S. Saponara, and O. Spiga, "The

- beneficial health effects of flavonoids on the cardiovascular system: Focus on K⁺ channels,” *Pharmacol. Res.*, vol. 152, no. January, p. 104625, 2020.
- [90] O. M. Andersen and K. R. Markham, *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. 2006.
- [91] Z. Xu and L. R. Howard, *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*. 2012.
- [92] S. J. Maleki, J. F. Crespo, and B. Cabanillas, “Anti-inflammatory effects of flavonoids,” *Food Chem.*, vol. 299, no. March, 2019.
- [93] A. De Villiers, P. Venter, and H. Pasch, “Recent advances and trends in the liquid-chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1430, pp. 16–78, 2015.
- [94] R. Pei, X. Liu, and B. Bolling, “Flavonoids and gut health,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 61, pp. 153–159, 2020.
- [95] G. D’Andrea, “Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications?,” *Fitoterapia*, vol. 106, pp. 256–271, 2015.
- [96] P. Aiello *et al.*, “Dietary flavonoids: Nano delivery and nanoparticles for cancer therapy,” *Semin. Cancer Biol.*, no. July, pp. 1–16, 2019.
- [97] F. Zhu, “Anthocyanins in cereals: Composition and health effects,” *Food Res. Int.*, vol. 109, no. April, pp. 232–249, 2018.
- [98] H. Khan *et al.*, “Flavonoids nanoparticles in cancer: Treatment, prevention and clinical prospects,” *Semin. Cancer Biol.*, no. July, 2019.
- [99] Y. Shirmohammadli, D. Efhamisisi, and A. Pizzi, “Tannins as a sustainable raw material for green chemistry: A review,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 126, no. October, pp. 316–332, 2018.
- [100] Y. T. Deng *et al.*, “Condensed tannins from *Ficus altissima* leaves: Structural, antioxidant, and antityrosinase properties,” *Process Biochem.*, vol. 51, no. 8, pp. 1092–1099, 2016.
- [101] A. Cano, M. Andres, A. Chiralt, and C. González-Martínez, “Use of tannins to enhance the functional properties of protein based films,” *Food Hydrocoll.*, vol. 100, no. October 2019, p. 105443, 2020.
- [102] P. L. de Hoyos-Martínez, J. Merle, J. Labidi, and F. Charrier – El Bouhtoury, “Tannins extraction: A key point for their valorization and cleaner production,” *J. Clean. Prod.*, vol. 206, pp. 1138–1155, 2019.
- [103] A. P. Laddha and Y. A. Kulkarni, “Tannins and vascular complications of Diabetes: An update,” *Phytomedicine*, vol. 56, no. October 2018, pp. 229–245, 2019.

- [104] K. Macáková *et al.*, *Tannins and their Influence on Health*, vol. 1. 2014.
- [105] D. A. Kirke, T. J. Smyth, D. K. Rai, O. Kenny, and D. B. Stengel, "The chemical and antioxidant stability of isolated low molecular weight phlorotannins," *Food Chem.*, vol. 221, pp. 1104–1112, 2017.
- [106] Y. X. Li, I. Wijesekara, S. K. Kim, and Y. Li, "Phlorotannins as bioactive agents from brown algae," *Process Biochem.*, vol. 46, no. 12, pp. 2219–2224, 2011.
- [107] K. K. A. Sanjeewa, E. A. Kim, K. T. Son, and Y. J. Jeon, "Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review," *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 162, pp. 100–105, 2016.
- [108] T. Richard, H. Temsamani, J. Delaunay, S. Krisa, and J. Mérillon, "Stilbènes : de la chimie à la neuroprotection & Stilbenes : From chemistry to neuroprotection," *Prat. Psychol.*, pp. 1–8, 2014.
- [109] J. Chong, A. Poutaraud, and P. Hugueney, "Metabolism and roles of stilbenes in plants," *Plant Sci.*, vol. 177, no. 3, pp. 143–155, 2009.
- [110] M. Yousuf, S. Jinka, S. S. Adhikari, and R. Banerjee, "Methoxy-enriched cationic stilbenes as anticancer therapeutics," *Bioorg. Chem.*, vol. 98, p. 103719, 2020.
- [111] A. G. M. R. Imando, M. U. C. Uendet, C. R. D. Esmarchelier, R. A. G. M. Ehta, J. O. H. N. M. P. Ezzuto, and S. T. O. D. Uke, "Cancer Chemopreventive and Antioxidant Activities of Pterostilbene , a Naturally Occurring Analogue of Resveratrol," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, pp. 3453–3457, 2002.
- [112] J. A. Baur and D. A. Sinclair, "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence," vol. 5, no. June, 2006.
- [113] J. Slanina and Z. Glatz, "Separation procedures applicable to lignan analysis," *J. Chromatogr. B*, vol. 812, pp. 215–229, 2004.
- [114] S. Shao, X. Qi, H. Sun, and S. Li, "Fitoterapia Hepatoprotective lignans and triterpenoids from the roots of *Kadsura longipedunculata*," *Fitoterapia*, vol. 142, no. 2, p. 104487, 2020.
- [115] X. U. Xin-ya *et al.*, "Anti-HIV lignans from *Justicia procumbens*," *Chin. J. Nat. Med.*, vol. 17, no. 12, pp. 945–952, 2019.
- [116] A. A. Dar and N. Arumugam, "Lignans of sesame: Purification methods, biological activities and biosynthesis - A review," *Bioorg. Chem.*, vol. 50, no. April, pp. 1–10, 2013.
- [117] A. Durazzo, V. Turfani, V. Narducci, E. Azzini, G. Maiani, and M. Carcea, "Nutritional characterisation and bioactive components of commercial carobs flours," *Food Chem.*, vol. 153, pp. 109–113, 2014.

- [118] D. B. Maclean and V. Snieckus, "R.H.F. MANSKE: Fifty years of alkaloids chemistry," in *The ALKALOIDS*, vol. 50, Ontario, Canada, 1998, pp. 1–57.
- [119] U. H. Maier, H. Gundlach, and M. H. Zenk, "Seven imidazole alkaloids from *Lepidium sativum*," *Phytochemistry*, vol. 49, no. 6, pp. 1791–1795, 1998.
- [120] C. Liu *et al.*, "Alkaloids from Traditional Chinese Medicine against hepatocellular carcinoma," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 120, no. July, p. 109543, 2019.
- [121] T. Aniszewski, *Definition, typology, and occurrence of alkaloids*, 2nd ed. Elsevier B.V., 2015.
- [122] C. Chini, A. R. Bilia, A. Keita, and I. Morelli, "Protoalkaloids from *Boscia angustifolia*," *Planta Med.*, vol. 58, no. 5, p. 476, 1992.
- [123] E. J. Kyzar *et al.*, "Effects of hallucinogenic agents mescaline and phencyclidine on zebrafish behavior and physiology," *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 37, no. 1, pp. 194–202, 2012.
- [124] Q. W. Shi, T. Oritani, T. Sugiyama, and T. Yamada, "Two novel pseudoalkaloid taxanes from the Chinese yew, *Taxus chinensis* var. *mairei*," *Phytochemistry*, vol. 52, no. 8, pp. 1571–1575, 1999.
- [125] D. Gröger, "Terpenoid and Steroid Alkaloids," *Phytochem. Plant Cell Cult.*, vol. 5, pp. 435–448, 1988.
- [126] J. Beyer, O. H. Drummer, and H. H. Maurer, "Analysis of toxic alkaloids in body samples," *Forensic Sci. Int.*, vol. 185, no. 1–3, pp. 1–9, 2009.
- [127] N. Radulović, N. DorDević, M. Denić, M. M. G. Pinheiro, P. D. Fernandes, and F. Boylan, "A novel toxic alkaloid from poison hemlock (*Conium maculatum* L., Apiaceae): Identification, synthesis and antinociceptive activity," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 50, no. 2, pp. 274–279, 2012.
- [128] X. Li, L. Gu, L. Yang, D. Zhang, and J. Shen, "Aconitine : A potential novel treatment for systemic lupus erythematosus," *J. Pharmacol. Sci.*, vol. 133, no. 3, pp. 115–121, 2017.
- [129] Y. P. Ng, T. C. T. Or, and N. Y. Ip, "Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease," *Neurochem. Int.*, vol. 89, pp. 260–270, 2015.
- [130] P. Gao *et al.*, "Anti-inflammatory quinoline alkaloids from the root bark of *Dictamnus dasycarpus*," *Phytochemistry*, vol. 172, no. January, p. 112260, 2020.
- [131] H. Rasouli, R. Yarani, F. Pociot, and J. Popović-Djordjević, "Anti-diabetic potential of plant alkaloids: Revisiting current findings and future perspectives," *Pharmacol. Res.*, vol. 155, p. 104723, 2020.

- [132] A. Meshram, A. Kumar, N. Srivastava, A. Instrumentation, and N. Delhi, “Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis of alkaloids isolated from *Epipremnum aureum* (Linden and Andre),” vol. 6, no. 02, pp. 337–342, 2015.
- [133] A. Wesolowska, M. Grzeszczuk, J. Wilas, and D. Kulpa, “Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis of indole alkaloids isolated from *catharanthus roseus* (L.) G. don cultivated conventionally and derived from in vitro cultures,” *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*, vol. 44, no. 1, pp. 100–106, 2016.
- [134] E. Chebouat, B. Dadamoussa, A. Kabouche, M. Allaoui, M. Gouamid, and N. Gherraf, “Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of the crude alkaloid extract of *Ziziphus mauritiana* Lam ., grown in Algerian,” *J. Med. Plants Res. Full*, vol. 7, no. 20, pp. 1511–1514, 2013.
- [135] J. Limón-Pacheco and M. E. Gonsebatt, “The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress,” *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 674, no. 1–2, pp. 137–147, 2009.
- [136] P. Rajendran *et al.*, “Antioxidants and human diseases,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 436, pp. 332–347, 2014.
- [137] P. A. Dennery, “Oxidative stress in development: Nature or nurture?,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 49, no. 7, pp. 1147–1151, 2010.
- [138] D. Krishnaiah, R. Sarbatly, and A. Bono, “Phytochemical antioxidants for health and medicine - A move towards nature,” *Biotechnol. Mol. Biol.*, vol. 1, no. 4, pp. 97–104, 2007.
- [139] C. Lauridsen, “From oxidative stress to inflammation: Redox balance and immune system,” *Poult. Sci.*, vol. 98, no. 10, pp. 4240–4246, 2019.
- [140] B. Halliwell, “Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning),” *Free Radic. Res.*, vol. 31, no. 4, pp. 261–272, 1999.
- [141] Y. Taniyama and K. K. Griendling, “Molecular and Cellular Mechanisms,” *Hypertension*, vol. 42, pp. 1075–81, 2003.
- [142] M. Carocho, P. Morales, and I. C. F. R. Ferreira, “Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 71, pp. 107–120, 2018.
- [143] J. Q. Wu, T. R. Kosten, and X. Y. Zhang, “Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia,” *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 46, pp. 200–206, 2013.
- [144] M. Carocho and I. C. F. R. Ferreira, “A review on antioxidants , prooxidants and related

- controversy : Natural and synthetic compounds , screening and analysis methodologies and future perspectives,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 51, pp. 15–25, 2013.
- [145] D. Huang, O. U. Boxin, and R. L. Prior, “The chemistry behind antioxidant capacity assays,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 6, pp. 1841–1856, 2005.
- [146] T. Hennebelle, P. Bailleul, and S. Sahpaz, “Investigation chimique, chimiotaxonomique et pharmacologique de lamiales productrices d’antioxydants : *Marrubium peregrinum*, *Ballota larendana*, *Ballota pseudodictamnus* (Lamiacées) et *Lippia alba* (Verbenacées),” 2006.
- [147] J. Navarro-Yepes *et al.*, “Antioxidant gene therapy against neuronal cell death,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 142, no. 2, pp. 206–230, 2014.
- [148] M. Battino *et al.*, “The roles of strawberry and honey phytochemicals on human health: A possible clue on the molecular mechanisms involved in the prevention of oxidative stress and inflammation,” *Phytomedicine*, no. August 2019, p. 153170, 2020.
- [149] Y. Xu, C. Wang, J. Klabnik, and J. O’ Donnell, “Novel Therapeutic Targets in Depression and Anxiety: Antioxidants as a Candidate Treatment,” *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 12, no. 2, pp. 108–119, 2014.
- [150] L. Hritcu, M. Clicinschi, and T. Nabeshima, “Brain serotonin depletion impairs short-term memory, but not long-term memory in rats,” *Physiol. Behav.*, vol. 91, no. 5, pp. 652–657, 2007.
- [151] P. Kinda, P. Zerbo, S. Guenné, M. Compaoré, A. Ciobica, and M. Kiendrebeogo, “Medicinal Plants Used for Neuropsychiatric Disorders Treatment in the Hauts Bassins Region of Burkina Faso,” *Medicines*, vol. 4, no. 2, p. 32, 2017.
- [152] I. M. Balmus *et al.*, “Oxidative Stress Implications in the Affective Disorders: Main and Antioxidant Approaches,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, no. 3975101, 2016.
- [153] M. Padurariu, A. Ciobica, R. Lefter, and I. L. Serban, “the Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer ’ S Disease,” *Psychiatr. Danub.*, vol. 25, no. 4, pp. 401–409, 2013.
- [154] A. Ciobica, M. Padurariu, I. Dobrin, C. Stefanescu, and R. Dobrin, “Oxidative stress in schizophrenia - Focusing on the main markers,” *Psychiatr. Danub.*, vol. 23, no. 3, pp. 237–245, 2011.
- [155] A. Üçok and W. Gaebel, “Side effects of atypical antipsychotics: A brief overview,” *World Psychiatry*, vol. 7, no. 1, pp. 58–62, 2008.
- [156] R. M. Havinga, A. Hartl, J. Putscher, S. Prehsler, C. Buchmann, and C. R. Vogl, “*Tamarindus indica* L. (Fabaceae): Patterns of use in traditional African medicine,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 127, no. 3, pp. 573–588, 2010.

- [157] G. Samson, I.-M. Balmuş, K. Martin, A. C. Bică, R. Lefter, and D. Timofte, "Possible implications of Chrysanthellum sp. in psychiatric disorders treatment," *Bull. Integr. Psychiatry*, vol. 2, pp. 1–9, 2015.
- [158] X. Y. Zhang, D. F. Zhou, P. Y. Zhang, G. Y. Wu, J. M. Su, and L. Y. Cao, "A double-blind, placebo-controlled trial of extract of Ginkgo biloba added to haloperidol in treatment-resistant patients with schizophrenia," *J. Clinacal Psychiatry*, vol. 62, no. 11, pp. 873–883, 2001.
- [159] M. N. Alam, N. J. Bristi, and M. Rafiquzzaman, "Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity," *Saudi Pharm. J.*, vol. 21, no. 2, pp. 143–152, 2013.
- [160] Z. Akar, M. Küçük, and H. Doğan, "A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 32, no. 1, pp. 640–647, 2017.
- [161] C. Sánchez-Moreno, "Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems," *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 8, no. 3, pp. 121–137, 2002.
- [162] R. Scherer and H. T. Godoy, "Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method," *Food Chem.*, vol. 112, no. 3, pp. 654–658, 2009.
- [163] I. Biskup, I. Golonka, A. Gamian, and Z. Sroka, "Summary Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods," *Postępy Hig. i Med. doświadczalnej*, vol. 67, no. 67, pp. 958–963, 2013.
- [164] I. F. F. Benzie and J. J. Strain, "Ferric reducing (antioxidant) power as a measure of antioxidant capacity: the FRAP assay," *Anal. Biochem.*, vol. 239, pp. 70–76, 1996.
- [165] K. Jomova, S. Baros, and M. Valko, "Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems," *Transit. Met. Chem.*, vol. 37, no. 2, pp. 127–134, 2012.
- [166] A. Pękal and K. Pyrzynska, "Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay," *Food Anal. Methods*, vol. 7, no. 9, pp. 1776–1782, 2014.
- [167] P. Prieto, M. Pineda, and M. Aguilar, "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E," *Anal. Biochem.*, vol. 269, no. 2, pp. 337–341, 1999.
- [168] R. Sharadanand Phatak, A. Subhash Hendre, and C. Rohan Sharadanand Phatak, "Total antioxidant capacity (TAC) of fresh leaves of Kalanchoe pinnata," *J. Pharmacogn. Phytochem. JPP*, vol. 2, no. 25, pp. 32–35, 2014.
- [169] A. P. Miller, J. Coronel, and J. Amengual, "The role of β -carotene and vitamin A in

- atherogenesis: Evidences from pre-clinical and clinical studies,” *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids*, p. 158635, 2020.
- [170] B. J. Burri, “Beta-carotene and human health: A review of current research,” *Nutrition Res.*, vol. 17, no. 3, pp. 547–580, 1997.
- [171] A. Kadri, Z. Zarai, A. Békir, N. Gharsallah, and M. Damak, “Chemical composition and antioxidant activity of *Marrubium vulgare* L. essential oil from Tunisia,” *African J. Biotechnol.*, vol. 10, no. 19, pp. 3908–3914, 2011.
- [172] M. S. Taga, E. E. Miller, and D. E. Pratt, “Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants,” *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 61, no. 5, pp. 928–931, 1984.
- [173] M. A. Prieto, J. A. Vázquez, and M. A. Murado, “ β -carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and pro-oxidant activities in microplate .,” *J. Agric. Food Chem.*, pp. 1–36, 2012.
- [174] B. Vacher, “Procédé de décortilage des graines dures et son application, notamment à l’isolement de polysaccharides purs,” 0145600 B1, 1987.
- [175] R. Ruter and K. Seidel, “Chemical process for the production of husked grain, both germinated and ungerminated,” 2,007,693, 1935.
- [176] N. E. Kıvrak, B. Aşkın, E. Küçüköner, and N. E. Kıvrak, “Comparison of Some Physicochemical Properties of Locust Bean Seeds Gum Extracted by Acid and Water Pre-Treatments,” *Food Nutr. Sci.*, vol. 6, no. 6, pp. 278–286, 2015.
- [177] A. Bahloul, S. Kitane, and M. Khelifa, “Nouveau procédé de traitement et valorisation de graine de caroube par cuisson thermique en autoclave et séparation de l’épluchure par voie mécanique,” WO 2013/129899 A1, 2013.
- [178] J. A. Lopes da Silva and M. P. Gonçalves, “Studies on a purification method for locust bean gum by precipitation with isopropanol,” *Top. Catal.*, vol. 4, no. 4, pp. 277–287, 1990.
- [179] A. Haddarah *et al.*, “The structural characteristics and rheological properties of Lebanese locust bean gum,” *J. Food Eng.*, vol. 120, no. 1, pp. 204–214, 2014.
- [180] J. J. Stickel, R. T. Elander, J. D. Mcmillan, and R. Brunecky, “Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass,” *Bioprocess. Renew. Resour. to Commod. Bioprod.*, pp. 77–103, 2014.
- [181] D. Kumar and G. S. Murthy, *Enzymatic Hydrolysis of Cellulose for Ethanol Production: Fundamentals, Optimal Enzyme Ratio, and Hydrolysis Modeling*. Elsevier B.V., 2016.
- [182] E. T. Reese and M. Mandels, “Stability of the Cellulase of *Trichoderma reesei* under Use Conditions,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 22, pp. 323–335, 1980.

- [183] E. Topakas, G. Panagiotou, and P. Christakopoulos, "Cellulases: Characteristics, Sources, Production, and Applications," *Bioprocess. Technol. Biorefinery Sustain. Prod. Fuels, Chem. Polym.*, pp. 147–166, 2013.
- [184] R. Wahlstrom, "Enzymatic hydrolysis of cellulose in aqueous ionic liquids," 2014.
- [185] Ó. J. Sánchez and C. A. Cardona, "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks," *Bioresour. Technol.*, vol. 99, no. 13, pp. 5270–5295, 2008.
- [186] D. C. Irwin, M. Spezio, L. P. Walker, and D. B. Wilson, "Activity studies of eight purified cellulases: Specificity, synergism, and binding domain effects," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 42, no. 8, pp. 1002–1013, 1993.
- [187] L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. Van Zyl, and I. . Pretorius, "Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 66, no. 4, pp. 506–777, 2002.
- [188] S. I. Mussatto, G. Dragone, M. Fernandes, A. M. F. Milagres, and I. C. Roberto, "The effect of agitation speed, enzyme loading and substrate concentration on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain," *Cellulose*, vol. 15, no. 5, pp. 711–721, 2008.
- [189] V. S. Chang and M. T. Holtzapple, "Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 84, pp. 5–37, 2000.
- [190] D. Koullas, P. Christakopoulos, D. Kekos, B. Macris, and E. Koukios, "Correlating the effect of pretreatment on the enzymatic hydrolysis of straw," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 39, pp. 113–116, 1992.
- [191] R. R. Singhanian, R. K. Sukumaran, and A. Panday, "Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 142, pp. 60–70, 2007.
- [192] W. M. Jurick, I. Vico, B. D. Whitaker, V. L. Gaskins, and W. J. Janisiewicz, "Application of the 2-Cyanoacetamide Method For Spectrophotometric Assay of Cellulase Enzyme Activity," *Plant Pathol. J.*, vol. 11, no. 1, pp. 38–41, 2012.
- [193] S. D. Mansfield, C. Mooney, and J. N. Saddler, "Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis," *Biotechnol Prog*, vol. 15, pp. 804–816, 1999.
- [194] B. Henrissat and A. Bairoch, "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases," *Biochem. J. Lett.*, vol. 316, pp. 695–696, 1996.
- [195] Y. Bourne and B. Henrissat, "Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 11, no. 5, pp. 593–600, 2001.
- [196] K. Ohmiya, K. Sakka, S. Karita, and T. Kimura, "Structure of Cellulases and Their

- Applications,” *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, vol. 14, pp. 365–414, 1997.
- [197] M. Linder and T. T. Teeri, “The roles and function of cellulose-binding domains,” *J. Biotechnol.*, vol. 57, pp. 15–28, 1997.
- [198] M. Quentin, H. van der Valk, J. van Dam, and E. de Jong, *Cellulose-binding domains: tools for innovation in cellulosic fiber production and modification*. Mansfield S and Saddler J (eds), Applications of Enzymes to Lignocellulosics. ACS Symposium Series 855, American Chemical Society, Washington, DC, 2003.
- [199] S. Karita, K. Sakka, and K. Ohmiya, “Cellulose-binding domains confer an enhanced activity against insoluble cellulose to *Ruminococcus albus* endoglucanase IV,” *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 81, pp. 553–556, 1996.
- [200] Z. Xiao, P. Gao, Y. Qu, and T. Wang, “Cellulose-binding domain of endoglucanase III from *Trichoderma reesei* disrupting the structure of cellulose,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 23, no. 9, pp. 711–715, 2001.
- [201] T. K. Ghose, “MEASUREMENT OF CELLULASE ACTIVITIES,” *Pure Appl. Chem.*, vol. 59, no. 2, pp. 257–268, 1987.
- [202] A. S. Bommarius *et al.*, “Cellulase kinetics as a function of cellulose pretreatment,” *Metab. Eng.*, vol. 10, no. 6, pp. 370–381, 2008.
- [203] N. Eloutassi, B. Louaste, L. Boudine, and E. A. Remmal, “Valorisation de la biomasse lignocellulosique pour la production de bioéthanol de deuxième génération,” *Rev. des Energies Renouvelables*, vol. 17, pp. 4–600, 2014.
- [204] P. A. Dakia, B. Wathelet, and M. Paquot, “Isolation and chemical evaluation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) seed germ,” *Food Chem.*, vol. 102, pp. 1368–1374, 2007.
- [205] A. Kurt and T. Kahyaoglu, “Characterization of a new biodegradable edible film made from salep glucomannan,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 104, no. 1, pp. 50–58, 2014.
- [206] M. Tako, Y. Tamaki, and T. Teruya, “Discovery of Unusual Highly Branched Galactomannan from Seeds of *Desmanthus illinoensis*,” *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, vol. 09, no. 02, pp. 101–116, 2018.
- [207] I. Pinto Vieira *et al.*, “Antidiabetic effects of galactomannans from *Adenanthera pavonina* L. in streptozotocin-induced diabetic mice,” *Asian Pac. J. Trop. Med.*, vol. 11, no. 2, pp. 116–122, 2018.
- [208] R. L. Plackett and J. P. Burman, “The Design of Optimum Multifactorial Experiments,” *Biometrika*, vol. 33, no. 4, pp. 305–325, 2018.
- [209] G. E. P. Box and K. . Wilson, “On the experimental attainment of optimum conditions (with discussion),” *J. R. Stat. Soc.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–45, 1951.

- [210] F. Yates, "A new method of arranging variety trials involving a large number of varieties," *J. Agric. Sci.*, vol. 26, no. 3, pp. 424–455, 1936.
- [211] F. Yates, "Complex experiments (with discussion)," *Suppl. to J. R. Stat. Soc.*, vol. 2, no. 2, pp. 181–247, 1935.
- [212] F. Yates, *The design and analysis of factorial experiments*. Technical communication 35. Harpenden: Imperial Bureau of Soil Science, 1937.
- [213] D. R. Cox and N. Reid, "The Theory of the Design of Experiments," in *Monographs on statistics and applied probability*, CRC Press, 2000.
- [214] S. Karam, "Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt," Université de Limoges, 2004.
- [215] J. Goupy, "Les plans d'expériences," *Rev. Moulad*, no. 34, pp. 74–116, 2006.
- [216] Y. Tamaki, T. Teruya, and M. Tako, "The chemical structure of galactomannan isolated from seeds of *Delonix regia*," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 74, no. 5, pp. 1110–1112, 2010.
- [217] O. Aiyegoro and A. Okoh, "Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC.," *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 10, pp. 1–8, 2010.
- [218] Y. Bekro, J. Mamyrbekova, B. Boua, F. Tra Bi, and E. Ehile, "Étude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpinaceae)," *Sci. Nat.*, vol. 4, no. 2, pp. 217–225, 2008.
- [219] V. L. Singleton, R. Orthofer, and R. M. Lamuela-Raventos, "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent," *Methods Enzymol.*, vol. 299, pp. 152–178, 1999.
- [220] I. M. C. Brighente, M. Dias, L. G. Verdi, and M. G. Pizzolatti, "Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species," *Pharm. Biol.*, vol. 45, no. 2, pp. 156–161, 2007.
- [221] M. L. Price, S. Van Scoyoc, and L. G. Butler, "A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Assay for Tannin in Sorghum Grain," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 26, no. 5, pp. 1214–1218, 1978.
- [222] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 28, no. 1, pp. 25–30, 1995.
- [223] M. Oyaizu, "Studies on products of browning reaction," *Japanese J. Nutr. Diet.*, vol. 44, no. 6, pp. 307–315, 1986.
- [224] H. El Hajaji *et al.*, "Antioxidant properties and total phenolic content of three varieties

- of carob tree leaves from Morocco,” *Rec. Nat. Prod.*, vol. 4, no. 4, pp. 193–204, 2010.
- [225] L. Barros, S. Falcão, P. Baptista, C. Freire, M. Vilas-Boas, and I. C. F. R. Ferreira, “Antioxidant activity of *Agaricus* sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays,” *Food Chem.*, vol. 111, no. 1, pp. 61–66, 2008.
- [226] S. Bouhdid, J. Abrini, A. Zhiri, M. J. Espuny, and A. Manresa, “Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 106, no. 5, pp. 1558–1568, 2009.
- [227] H. H. Soule, D. Mrani, H. El Hajaji, A. Elkhamlichi, A. F. Said Hassane Soidrou, and M. Lachkar, “Screening , Total Phenols and Flavonoids Contents , Antioxidant and Antibacterial Activities of *Tambourissa comorensis* Fruit Extracts,” *Der Pharma Chem.*, vol. 11, no. 9, pp. 56–61, 2017.
- [228] S. Ydjedd *et al.*, “Assessment of antioxidant potential of phenolic compounds fractions of Algerian *Ceratonia siliqua* L. pods during ripening stages,” *Int. Food Res. J.*, vol. 24, no. 5, pp. 2041–2049, 2017.
- [229] M. G. Bernardo-Gil, R. Roque, L. B. Roseiro, L. C. Duarte, F. Gírio, and P. Esteves, “Supercritical extraction of carob kibbles (*Ceratonia siliqua* L.),” *J. Supercrit. Fluids*, vol. 59, pp. 36–42, 2011.
- [230] H. Sebai *et al.*, “In vitro and in vivo antioxidant properties of Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.),” *J. Med. Plants Res.*, vol. 7, no. 2, pp. 85–90, 2013.
- [231] Q. Huang, X. Liu, G. Zhao, T. Hu, and Y. Wang, “Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production,” *Anim. Nutr.*, vol. 4, no. 2, pp. 137–150, 2018.
- [232] L. Huo *et al.*, “Antioxidant activity, total phenolic, and total flavonoid of extracts from stems of *Jasminum nervosum* Lour,” *Grasas y Aceites*, vol. 62, no. 2, pp. 149–154, 2011.
- [233] P. Kasangana, P. Haddad, and T. Stevanovic, “Study of Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of *Myrianthus Arboreus* (Cecropiaceae) Root Bark Extracts,” *Antioxidants*, vol. 4, no. 2, pp. 410–426, 2015.
- [234] H. Karaosmanoglu, F. Soyer, B. Ozen, and F. Tokatli, “Antimicrobial and antioxidant activities of turkish extra virgin olive oils,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 58, no. 14, pp. 8238–8245, 2010.
- [235] S. Meziani, B. D. Oomah, F. Zaidi, A. Simon-Levert, C. Bertrand, and R. Zaidi-Yahiaoui, “Antibacterial activity of carob (*Ceratonia siliqua* L.) extracts against phytopathogenic bacteria *Pectobacterium atrosepticum*,” *Microb. Pathog.*, vol. 78, pp.

- 95–102, 2015.
- [236] B. Kivçak and T. Mert, “Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Ceratonia siliqua* L. Extracts,” *Turk J. Biol*, vol. 26, no. July 2001, pp. 197–200, 2002.
- [237] H. El Hajaji *et al.*, “Antioxidant activity, phytochemical screening, and total phenolic content of extracts from three genders of carob tree barks growing in Morocco,” *Arab. J. Chem.*, vol. 4, no. 3, pp. 321–324, 2011.
- [238] M. I. M. Halpin-Dohnalek and E. H. Marth, “*Staphylococcus aureus*: Production of Extracellular Compounds and Behavior in Foods - A Review,” *J. Food Prot.*, vol. 52, no. 4, pp. 267–282, 1989.
- [239] M. Khalid, Saeed-ur-Rahman, M. Bilal, and D. feng HUANG, “Role of flavonoids in plant interactions with the environment and against human pathogens — A review,” *J. Integr. Agric.*, vol. 18, no. 1, pp. 211–230, 2019.
- [240] L. Custódio, J. Patarra, F. Alberício, N. R. Neng, J. M. F. Nogueira, and A. Romano, “In vitro antioxidant and inhibitory activity of water decoctions of carob tree (*Ceratonia siliqua* L.) on cholinesterases, α -amylase and α -glucosidase,” *Nat. Prod. Res.*, vol. 29, no. 22, pp. 2155–2159, 2015.
- [241] M. N. Alexis, “Comparative evaluation of soybean meal and carob seed germ meal as dietary ingredients for rainbow trout fingerlings,” *Aquat. Living Resour.*, vol. 3, no. 3, pp. 235–241, 1990.
- [242] G. W. Burton and K. U. Ingold, “ β -carotene_ an unusual type of lipid antioxidant,” *Science (80-.)*, vol. 224, no. April 1981, 1983.
- [243] P. I. Penchev, “Étude des procédés d’extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions,” Université de Toulouse, 2010.
- [244] A. Ben Hsouna *et al.*, “Characterization of bioactive compounds and ameliorative effects of *Ceratonia siliqua* leaf extract against CCl₄ induced hepatic oxidative damage and renal failure in rats,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 49, no. 12, pp. 3183–3191, 2011.
- [245] B. Srdjenovic, V. Djordjevic-Milic, N. Grujic, R. Injac, and Z. Lepojevic, “Simultaneous HPLC determination of caffeine, theobromine, and theophylline in food, drinks, and herbal products,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 46, no. 2, pp. 144–149, 2008.
- [246] M. A. Korany, R. S. Haggag, M. A. A. Ragab, and O. A. Elmallah, “A validated stability indicating DAD–HPLC method for determination of pentoxifylline in presence of its pharmacopeial related substances,” *Bull. Fac. Pharmacy, Cairo Univ.*, vol. 51, no. 2, pp. 211–219, 2013.

- [247] World Health Organization, “Depression and other common mental disorders: global health estimates,” 2017.
- [248] World Health Organization, “Dépression: principaux repères,” 2020. [Online]. Available: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/depression>.
- [249] M. Lemtiri Chelieh *et al.*, “Mental health and wellbeing among Moroccan medical students: a descriptive study,” *Int. Rev. Psychiatry*, vol. 31, no. 7–8, pp. 608–612, 2019.
- [250] A. Kachouchi *et al.*, “Risk factors related to homicide in Moroccan patients with schizophrenia,” *Encephale*, vol. 44, no. 5, pp. 409–414, 2018.
- [251] L. Mah, C. Szabuniewicz, and A. J. Fiocco, “Review: Can anxiety damage the brain ?,” *Curr. Opin. Psychiatry*, vol. 29, no. 1, pp. 56–63, 2016.
- [252] G. Dumitru *et al.*, “Effect of ceratonia siliqua methanolic extract and 6-hydroxydopamine on memory impairment and oxidative stress in zebrafish (danio rerio) model,” *Rev. Chim.*, vol. 69, no. 12, pp. 3545–3548, 2018.
- [253] K. H. Alzoubi, S. Alibbini, O. F. Khabour, T. El-elimat, M. Al-zubi, and F. Q. Alali, “Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Prevents Short-Term Memory Deficit Induced by Chronic Stress in Rats,” *J. Mol. Neurosci.*, vol. 66, no. 3, pp. 314–321, 2018.
- [254] V. K. Patchev and A. V. Patchev, “Experimental models of stress,” *Dialogues Clin. Neurosci.*, vol. 8, no. 4, pp. 417–432, 2006.
- [255] S. Hogg, “A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety,” *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 54, no. 1, pp. 21–30, 1996.
- [256] W. Sutanto and E. R. de Kloet, “The use of various animal models in the study of stress and stress-related phenomena,” *Lab. Anim.*, vol. 28, no. 4, pp. 293–306, 1994.
- [257] Y. Martínez *et al.*, “The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases,” *Amino Acids*, vol. 49, no. 12, pp. 2091–2098, 2017.
- [258] L. Wang, A. Alachkar, N. Sanathara, J. D. Belluzzi, Z. Wang, and O. Civelli, “A methionine-induced animal model of schizophrenia: Face and predictive validity,” *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, vol. 18, no. 12, pp. 1–11, 2015.
- [259] D. R. & C. Hacker, “Histone methylation during neural development,” *Cell Tissue Res.*, vol. 356, pp. 539–552, 2014.
- [260] H. Wu *et al.*, “Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes,” *Science (80-.)*, vol. 329, no. 5990, pp. 444–448, 2010.
- [261] M. Ehrlich and M. Lacey, “DNA methylation and differentiation: Silencing, upregulation and modulation of gene expression,” *Epigenomics*, vol. 5, no. 5, pp. 553–

568, 2013.

- [262] H. S. Oz, T. S. Chen, and M. Neuman, "Methionine Deficiency and Hepatic Injury in a Dietary Steatohepatitis Model Helieh," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 53, no. 1, pp. 767–776, 2008.
- [263] R. R. Parrish *et al.*, "Methionine increases BDNF DNA methylation and improves memory in epilepsy," *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, vol. 2, no. 4, pp. 401–416, 2015.
- [264] G. Fan *et al.*, "Methionine choline reverses lead-induced cognitive and N-methyl-d-aspartate receptor subunit 1 deficits," *Toxicology*, vol. 272, pp. 23–31, 2010.
- [265] G. G. Brune, H. E. Himwich, and M.D., "Effects of methionine loading on the behavior of schizophrenic patients."
- [266] W. Pollin, P. V. C. Jr.1, and S. S. Kety, "Effects of Amino Acid Feedings in Schizophrenic Patients Treated with Iproniazid," *Science (80-.)*, vol. 133, no. 3446, pp. 104–105, 1961.
- [267] M. Antunes and G. Biala, "The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications," *Cogn. Process.*, vol. 13, no. 2, pp. 93–110, 2012.
- [268] M. Pădurariu *et al.*, "Oxytocin administration improves memory, anxiety and some oxidative stress parameters in a methionine-induced rat model of schizophrenia," *Farmacia*, vol. 66, no. 3, pp. 421–431, 2018.
- [269] M. Komada, K. Takao, and T. Miyakawa, "Elevated Plus Maze for Mice," *J. Vis. Exp.*, no. 22, pp. 1–4, 2008.
- [270] A. Ciobica, V. Bild, L. Hritcu, M. Padurariu, and W. Bild, "Effects of angiotensin II receptor antagonists on anxiety and some oxidative stress markers in rat," *Cent. Eur. J. Med.*, vol. 6, no. 3, pp. 331–340, 2011.
- [271] A. P. M. Cruz, F. Frei, and F. G. Graeff, "Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze," *Pharmacol. Biochem. Behav.*, vol. 49, no. 1, pp. 171–176, 1994.
- [272] M. J. Detke, M. Rickels, and I. Lucki, "Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 121, no. 1, pp. 66–72, 1995.
- [273] B. Petit-Demouliere, F. Chenu, and M. Bourin, "Forced swimming test in mice: A review of antidepressant activity," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 177, no. 3, pp. 245–255, 2005.
- [274] C. Valeria, D. Francesca, B. Emilian, M. Franco, and R. Paolo, "Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice," *Behav. Brain Res.*, vol. 134, no. 1–2, pp. 49–57, 2002.

- [275] R. E. Brown, S. C. Corey, and A. K. Moore, "Differences in measures of exploration and fear in MHC-congenic C57BL/6J and B6-H-2K mice," *Behav. Genet.*, vol. 29, no. 4, pp. 263–271, 1999.
- [276] W. Bild, L. Hritcu, C. Stefanescu, and A. Ciobica, "Inhibition of central angiotensin II enhances memory function and reduces oxidative stress status in rat hippocampus," *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 43, no. 3, pp. 79–88, 2013.
- [277] A. Ciobica, V. Bild, L. Hritcu, M. Padurariu, and W. Bild, "Effects of angiotensin II receptor antagonists on anxiety and some oxidative stress markers in rat," *Cent. Eur. J. Med.*, vol. 6, no. 3, pp. 331–340, 2011.
- [278] K. S. Rai, K. D. Murthy, K. S. Karanth, and M. S. Rao, "Clitoria ternatea (Linn) root extract treatment during growth spurt period enhances learning and memory in rats," *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 45, no. 3, pp. 305–313, 2001.
- [279] a. . Walf and C. Frye, "The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 2, pp. 322–328, 2007.
- [280] Y. Kitada, T. Miyauchi, A. Satoh, and S. Satoh, "Effects of antidepressants in the rat forced swimming test," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 72, no. 2–3, pp. 145–152, 1981.
- [281] R. N. Walsh and R. A. Cummins, "The open-field test: A critical review," *Psychol. Bull.*, vol. 83, no. 3, pp. 482–504, 1976.
- [282] J. K. Yao, R. Reddy, L. G. McElhinny, and D. P. van Kammen, "Effects of haloperidol on antioxidant defense system enzymes in schizophrenia," *J. Psychiatr. Res.*, vol. 32, pp. 385–391, 1998.
- [283] F. J. Charlson *et al.*, "Global Epidemiology and Burden of Schizophrenia : Findings From the Global Burden of Disease Study 2016," *Schizophr. Bull.*, vol. 44, no. 6, pp. 1195–1203, 2018.
- [284] R. A. Bevins, J. Besheer, M. I. Palmatier, H. C. Jensen, K. S. Pickett, and S. Eureka, "Novel-object place conditioning : behavioral and dopaminergic processes in expression of novelty reward," *Behav. Brain Res.*, vol. 129, pp. 41–50, 2002.
- [285] M. Raffa, A. Mechri, L. Ben Othman, C. Fendri, L. Gaha, and A. Kerkeni, "Decreased glutathione levels and antioxidant enzyme activities in untreated and treated schizophrenic patients," *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*, vol. 33, no. 7, pp. 1178–1183, 2009.
- [286] H. Wang, H. Xu, L. E. Dyck, and X. M. Li, "Olanzapine and quetiapine protect PC12 cells from β -amyloid peptide25-35-induced oxidative stress and the ensuing apoptosis," *J. Neurosci. Res.*, vol. 81, no. 4, pp. 572–580, 2005.

- [287] M. Padurariu, A. Ciobica, I. Dobrin, and C. Stefanescu, "Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics," *Neurosci. Lett.*, vol. 479, no. 3, pp. 317–320, 2010.
- [288] M. Padurariu, A. Ciobica, L. Hritcu, B. Stoica, W. Bild, and C. Stefanescu, "Changes of some oxidative stress markers in the serum of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease," *Neurosci. Lett.*, vol. 469, no. 1, pp. 6–10, 2010.
- [289] X. Y. Zhang *et al.*, "The interplay between BDNF and oxidative stress in chronic schizophrenia," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 51, pp. 201–208, 2015.



Annexes



Annexe 1 : Préparation des réactifs

1. Réactif de Dragendorff

- Solution A : Dissoudre 0,85 g de nitrate de bismuth dans 10 mL d'acide acétique glacial et 40 mL d'eau distillée.
- Solution B : Dissoudre 8 g d'iodure de potassium dans 20 mL d'eau distillé. Prélever 5 mL de la solution A et 5 mL de la solution B que l'on met dans un ballon de 100 mL. Ajouter 20 mL d'acide acétique et compléter la solution avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

2. Réactif de Mayer

Déposer 1,355 g de chlorure de mercure et 50 g d'iodure de potassium dans un ballon jaugé de 100 mL. Ajouter de l'eau distillée petit à petit en remuant, puis en ajouter jusqu'au trait de jauge. Prélever dix volumes de la solution ainsi obtenue et ajouter un volume d'acide chlorhydrique 17 %.

3. Réactif DNS

Mélanger de l'eau distillée (1416 mL) avec 10,6 g de l'acide 3,5-dinitrosalicylique et 19,8 g de NaOH. Bien dissoudre puis ajouter 306 g de sel de Seignette avec 7,6 mL de phénol à 50°C et 8,3 g du métabisulfite de sodium.

Protocole pour réaliser la courbe de calibration :

- ✓ A partir de glucose de concentration 4 g/L, on prépare des dilutions pour faire le patron de la courbe, et de l'eau comme étalon.
- ✓ Pour chaque dilution, on prend 50 µL et on ajoute 50 µL de DNS. Agiter tous les échantillons.
- ✓ Mettre à 100°C pendant 10 minutes.
- ✓ Refroidir dans un bain de glace.
- ✓ Lire l'absorbance avec un lecteur de plaques à 540 nm.
- ✓ Réaliser la courbe d'absorbance en fonction de la concentration. Elle doit avoir un coefficient de corrélation compris entre 0,991 et 0,999.

Annexe 2 : Courbes détalonnage

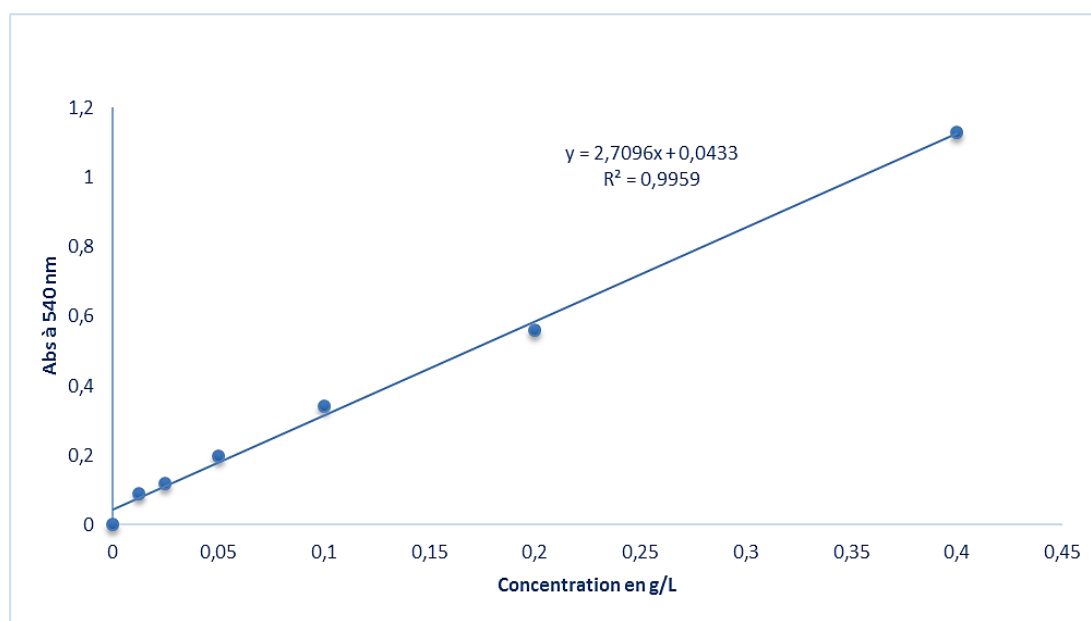


Figure A-1 : Courbe d'étalonnage du glucose par la méthode DNS.

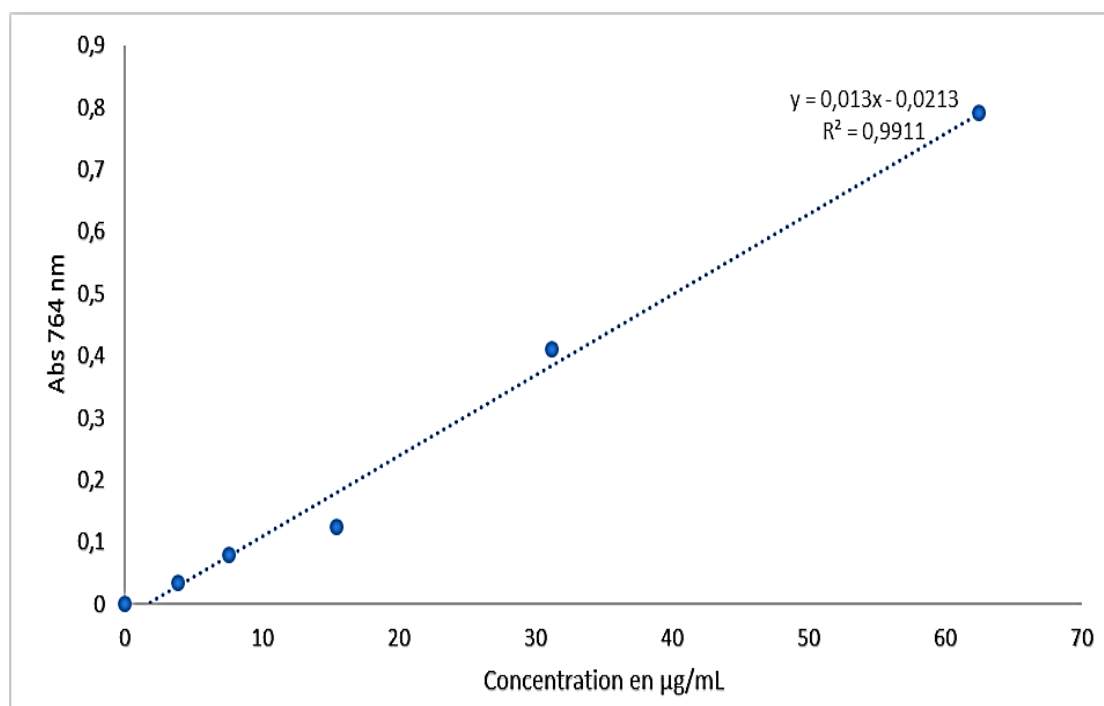


Figure A-2 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

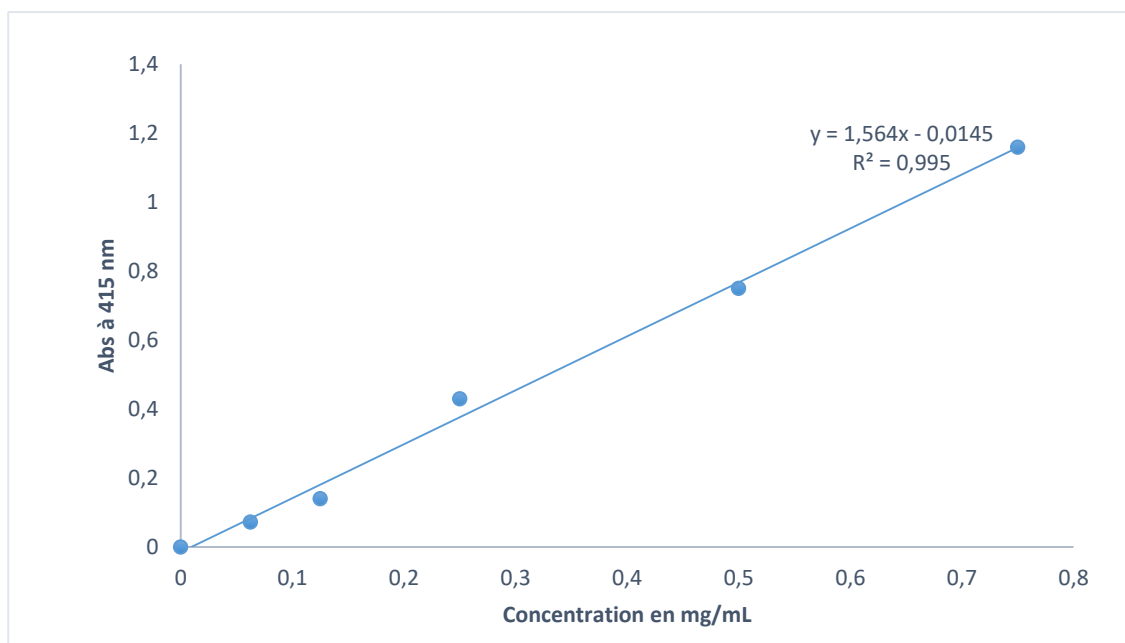


Figure A-3 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux.

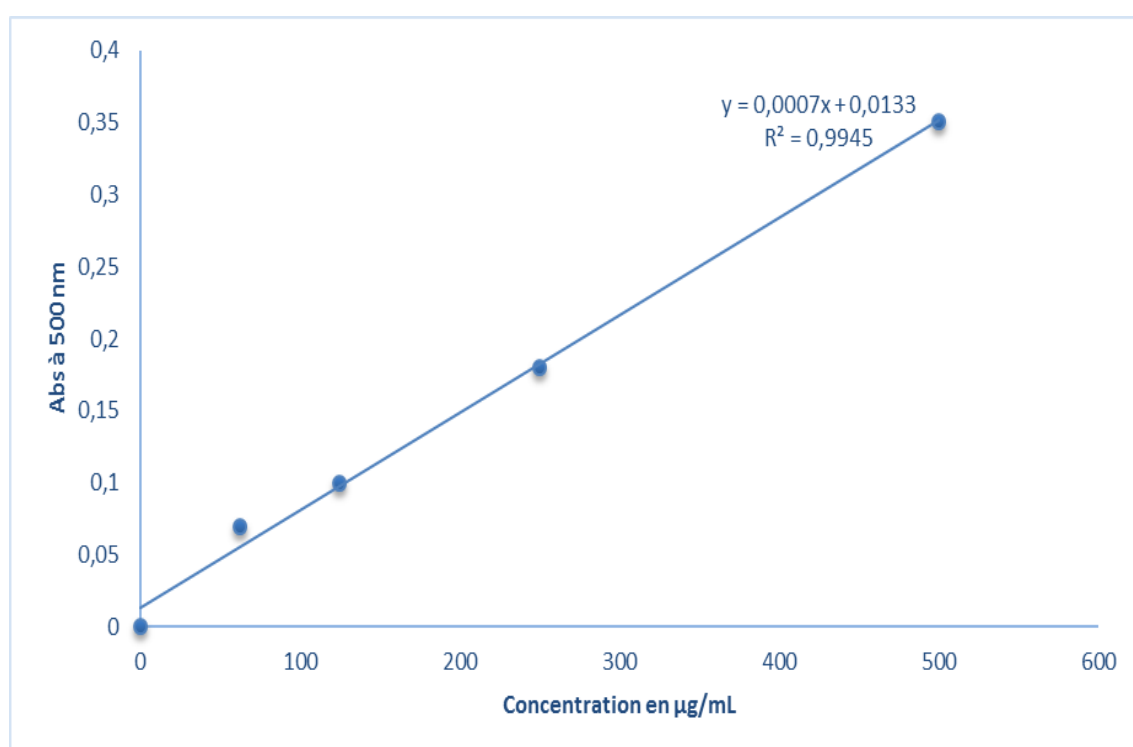


Figure A-4 : Courbe d'étalonnage du catéchol pour le dosage des tanins condensés

